

ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ และฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่  
แยกได้จากดินบ่อน้ำพุร้อนธรรมชาติแจ้ซอน จังหวัดลำปาง  
Antimicrobial activity and phospholipid profile of  
actinomycetes isolated from hot spring soil sample,  
Chae son National Park, Lampang



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2560

ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ และฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่  
แยกได้จากดินบ่อน้ำพุร้อนธรรมชาติแจ้ซอน จังหวัดลำปาง  
Antimicrobial activity and phospholipid profile of  
actinomycetes isolated from hot spring soil sample,  
Chae son National Park, Lampang



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PHOSPHOLIPID PROFILE  
OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM HOT SPRING SOIL  
SAMPLE, CHAE SON NATIONAL PARK, LAMPANG



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACTORY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INTITUTE OF TEACHNOLOGY OF LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงการพิเศษ**

ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ และฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จาก  
ดินบ่อน้ำพุร้อนธรรมชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง

Antimicrobial activity and phospholipid profile of  
actinomycetes isolated from hot spring soil sample, Chae son  
National Park, Lampang

**ชื่อนักศึกษา**

นางสาว อภิญญา พึ่งน้ำ รหัสนักศึกษา 57050917

นางสาว ออริยา กานต์กัณฑ์สกุล รหัสนักศึกษา 57050918

**ปริญญา**

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

**ภาควิชา**

ชีววิทยา

**ปีการศึกษา**

2560

**อาจารย์ที่ปรึกษา**

ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา  
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

| คณะกรรมการสอบ  | ลายมือชื่อ   |
|--|--|
| รศ.ดร. จิตติ ท่าไว<br>ประธานกรรมการ                    |  |
| ดร. วิมลมาศ บุญมี<br>กรรมการ                           |  |
| ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา |  |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|                           |   |                       |
|---------------------------|---|-----------------------|
| <b>หัวข้อโครงการพิเศษ</b> | ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ และฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินบ่อน้ำพุร้อนธรรมชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง                         |                       |
|                           | Antimicrobial activity and phospholipid profile of actinomycetes isolated from hot spring soil sample, Chae son National Park, Lamphang |                       |
| <b>ชื่อนักศึกษา</b>       | นางสาว อภิญญา พึ่งน้ำ   | รหัสนักศึกษา 57050917 |
|                           | นางสาว ออรยา กานต์กัณฑ์สกุล   | รหัสนักศึกษา 57050918 |
| <b>ปริญญา</b>             | วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)  |                       |
| <b>ภาควิชา</b>            | ชีววิทยา  |                       |
| <b>ปีการศึกษา</b>         | 2560  |                       |
| <b>อาจารย์ที่ปรึกษา</b>   | ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์  |                       |

### บทคัดย่อ

คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท 33 ไอโซเลต จากดินบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง 2 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 นำไปให้ความร้อนโดยการต้มด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และวิธีที่ 2 อบตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คัดแยกบน Zhang' Starch Soil Extract agar (ZSSE) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการจัดกลุ่มทั้ง 33 ไอโซเลต ได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะของเส้นใยเหนือผิวอาหารเป็นเกณฑ์ จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดีที่ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น (Pre-test) กับเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 074, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370, *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Candida albicans* ATCC 5239 พบว่าจาก 33 ไอโซเลต มีเพียง 7 ไอโซเลต ยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้นได้ และพบการยับยั้งทั้งในน้ำหมักและตัวเซลล์เล็กน้อยเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและเมทานอล ตามลำดับด้วยวิธี Agar disc diffusion การศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบ ฟ อ ส โ ฟ ลิ ปี ด Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE), Cardiolipin (CL) นอกจากนี้ยังคาดว่าพบ Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylinositol (PI) และอนุพันธ์ของ (PE) ในวันที่ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ในวันที่ 7

**คำสำคัญ :** แอคติโนมัยซีท , ดินน้ำพุร้อน , ฟอสโฟลิปิด , ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>Title</b>         | Antimicrobial activity and phospholipid profile of actinomycetes isolated from hot spring soil sample, Chae son National Park, Lampang |
| <b>Students</b>      | Miss Apinya Pheungnam Student ID 57050917<br>Miss Oraya Kangunsagul Student ID 57050918  |
| <b>Degree</b>        | Bachelor of Science (Industrial Microbiology Program)  |
| <b>Department</b>    | Biology  |
| <b>Faculty</b>       | Science  |
| <b>University</b>    | King Mongkut's Institute of Technology of Ladkrabang   |
| <b>Academic Year</b> | 2017   |
| <b>Advisor</b>       | Dr. Khanungkan Klanbut   |

### Abstract

Thirty three isolates of actinomycetes were isolated from hot spring soil samples, Chae son National Park, Lampang on Zhang's Starch Soil Extract agar (ZSSE) at 45 °C after soils were incubated in two treatments; First soil incubated at 70 °C in water bath for 10 minutes and the second treatment were incubated at 100 °C for 1 hour. These 33 isolates could classified into 7 groups by the color of aerial mycelium by using NBs/ISCC color system. The ability to grow in high temperature experiment was set at 45, 50, 55, 60, 65 and 70 °C and found that at 45 °C was the optimum temperature of this 33 isolates. The preliminary for their antimicrobial activity were examined against microorganism tested *Escherichia coli* ATCC 074, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370, *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 and *Candida albicans* ATCC 5239. There were 7 isolates from 33 isolates that against microorganism with pre-test method and the clear zone with agar disc diffusion method from crude extraction and cellular extraction when using ethylacetate and methanol as solvents were examined respectively. The study of phospholipid profile by thin layer chromatography (TLC); could be found Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE), Cardiolipin (CL) and also Phosphatidylserine (PS) and Phosphatidylinositol (PI) on 7 days plate growth extraction.

**Keywords :** Actinomycetes, Hot spring soil, Phospholipid, antimicrobial activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษ เรื่อง “การคัดเลือก ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ และฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินบ่อน้ำพุร้อนธรรมชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง” สำเร็จลุล่วง เนื่องด้วยความกรุณาจาก ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ซึ่งท่านได้ให้คำปรึกษาข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาในทุกเรื่อง ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งทางคณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ อุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง ที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในเรื่องสถานที่เก็บตัวอย่างตลอดมา

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. จิตติ ท๋าไว และ ดร.วิมลมาศ บุญมี ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการและกรรมการ ซึ่งให้คำแนะนำในการปรับปรุงเล่มโครงการพิเศษนี้จนประสบผลสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ แม่ ผู้ปกครอง ที่คอยให้การสนับสนุนในทุกเรื่อง อีกทั้งยังเป็นกำลังใจสำคัญในการศึกษาเสมอมา จนโครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวภิญญา พึ่งน้ำ  
นางสาวออรยา กานต์กัมภ์สกุล

# สารบัญ

|  | หน้า     |
|--|----------|
| บทคัดย่อ                                     | ก        |
| Abstract                                     | ข        |
| กิตติกรรมประกาศ                              | ค        |
| สารบัญ                                       | ง        |
| <b>บทที่ 1 บทนำ</b>                          | <b>1</b> |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา           | 1        |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ              | 3        |
| 1.3 ขอบเขตโครงการพิเศษ                       | 3        |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ                | 3        |
| <b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> | <b>4</b> |
| 2.1 บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน                      | 4        |
| 2.1.1 ที่ตั้ง                                | 4        |
| 2.1.2 ลักษณะของบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน           | 4        |
| 2.2 แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากน้ำพุร้อน       | 6        |
| 2.3 แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)            | 7        |
| 2.4 นิเวศวิทยาของแอคติโนมัยซีท               | 8        |
| 2.4.1 ดินและต้นพืช                           | 8        |
| 2.4.2 สภาพแวดล้อมที่รุนแรง                   | 8        |
| 2.4.3 การทนความร้อน                          | 8        |
| 2.4.4 ความสามารถในการแข่งขัน                 | 8        |
| 2.5 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยซีท             | 9        |
| 2.5.1 สัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย         | 9        |
| 2.6 การจัดจำแนกประเภทของแอคติโนมัยซีท        | 15       |
| 2.7 แอคติโนมัยซีทหายาก (Rare actinomycetes)  | 16       |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ ( ต่อ )

|  | หน้า |
|--|------|
| 2.7.1 แฟมิลี Micromonosporaceae  | 16   |
| 2.7.2 แฟมิลี Streptosporangiaceae                                      | 17   |
| 2.7.3 แฟมิลี Pseudonocardiaceae  | 17   |
| 2.7.4 แฟมิลี Thermomonosporaceae                                       | 17   |
| 2.7.5 แฟมิลี Other (unclassified) species                              | 17   |
| 2.8 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติโนมัยซีทกับน้ำพุร้อน                       | 17   |
| 2.9 Extremophilic / Extremotolerant actinobacteria                     | 18   |
| 2.10 Thermophilic และ Thermotolerant actinobacteria                    | 18   |
| 2.11 คุณสมบัติลักษณะของ Thermophilic และ Thermotolerant actinobacteria | 19   |
| 2.12 การแยกแอกติโนมัยซีทจากดิน   | 20   |
| 2.12.1 ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงการแยกเชื้อ                                 | 20   |
| 2.13 ประโยชน์และโทษของแอกติโนมัยซีท                                    | 23   |
| 2.13.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีท             | 24   |
| 2.14 โครงสร้างฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีทและแบคทีเรียทั่วไป             | 29   |
| 2.15 ชนิดของฟอสโฟลิปิด   | 31   |
| 2.16 Thin layer chromatography   | 35   |

## สารบัญ ( ต่อ )

|   | หน้า |
|---|------|
| <b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>                            | 36   |
| 3.1 อุปกรณ์   | 36   |
| 3.2 เครื่องมือ  | 37   |
| 3.3 สารเคมี   | 38   |
| 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป                                   | 40   |
| 3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ  | 40   |
| 3.6 การเก็บตัวอย่างดิน การแยกเชื้อและการคัดแยกเชื้อ             | 41   |
| 3.6.1 การเก็บตัวอย่างดิน  | 41   |
| 3.6.2 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท                               | 41   |
| 3.6.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง                  | 42   |
| 3.6.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา                                | 42   |
| 3.6.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ          | 42   |
| 3.6.6 การเตรียม spore suspension                                | 43   |
| 3.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธี Slide culture technique | 43   |
| 3.8 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท               | 44   |
| 3.8.1 การย่อยสลายโปรตีน (Peptonization)                         | 44   |
| 3.8.2 การย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction)                 | 45   |
| 3.8.3 การย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction)                     | 45   |
| 3.8.4 การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)                       | 45   |
| 3.8.5 ความสามารถในการผลิต H <sub>2</sub> S                      | 46   |
| 3.8.6 การตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 5 ชนิด                | 46   |
| ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโตส ไซโลส และแมนนิทอล                   |      |
| 3.9 การศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง                  | 46   |
| 3.10 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์        | 47   |
| เบื้องต้นและการสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ                |      |

## สารบัญ (ต่อ)

|  | หน้า      |
|--|-----------|
| 3.10.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น (Pre-test)                           | 47        |
| 3.10.2 การสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ  | 47        |
| 3.11 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography           | 49        |
| 3.11.1 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography         | 49        |
| <b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล</b>  | <b>50</b> |
| 4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท  | 50        |
| 4.2 การหาคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่าง   | 52        |
| 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อ ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง | 54        |
| 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีเดี่ยวของแอคติโนมัยซีททั้ง 33 ไอโซเลต  | 92        |
| 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท   | 93        |
| 4.6 การศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงที่เหมาะสม   | 100       |
| 4.7 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น   | 104       |
| 4.8 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion            | 110       |
| 4.9 ผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography           | 119       |
| 4.10 รวมผลการทดลองของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 7 ไอโซเลตที่ได้รับการคัดเลือก                                | 125       |

## สารบัญ ( ต่อ )

|  | หน้า |
|--|------|
| <b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>   | 132  |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย   | 132  |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ   | 133  |
| เอกสารอ้างอิง  | 134  |
| ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ   | 142  |
| ภาคผนวก ข กระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/ISCC color system)                                      | 147  |
| ภาคผนวก ค ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่าง   | 169  |
| ภาคผนวก ง ภาพแสดงตัวอย่างผลการทดสอบทางชีวเคมี  | 172  |
| ภาคผนวก จ ผลการทดลอง   | 179  |
| ภาคผนวก ฉ การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5                                     | 188  |
| ภาคผนวก ช เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ สำหรับการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท | 186  |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่  | หน้า |
|---|------|
| 2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ที่ผลิตโดยแอสคิตินอิมยซ์  | 25   |
| 2.2 แสดงชนิดของ Phospholipid ในแอสคิตินอิมยซ์   | 30   |
| 4.1 แสดงหมายเลขไอโซเลตของเชื้อแอสคิตินอิมยซ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินวิธีที่ 1   | 50   |
| 4.2 แสดงหมายเลขไอโซเลตของเชื้อแอสคิตินอิมยซ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินวิธีที่ 2   | 51   |
| 4.3 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแอสคิตินอิมยซ์โดยวิธี ที่ 1   | 52   |
| 4.4 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแอสคิตินอิมยซ์โดยวิธีที่ 2  | 53   |
| 4.5 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิตินอิมยซ์ที่ได้จากการคัดแยกโดยวิธีที่ 1 และ 2 จำนวน 33 ไอโซเลต ด้วยระบบสี The NBS/ISCC Color System | 88   |
| 4.6 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินอิมยซ์ที่ได้จากการคัดแยกโดยวิธีที่ 1 และ 2  | 93   |
| 4.7 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาล 5 ชนิดของเชื้อแอสคิตินอิมยซ์ที่ได้จากการคัดแยกโดยวิธีที่ 1 และ 2   | 95   |
| 4.8 แสดงผลการเจริญของเชื้อแอสคิตินอิมยซ์ที่อุณหภูมิสูง  | 100  |
| 4.9 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอสคิตินอิมยซ์ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ          | 105  |
| 4.10 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอสคิตินอิมยซ์ โดยเทคนิค Agar disc diffusion          | 111  |
| 4.11 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอสคิตินอิมยซ์ที่ถูกคัดเลือก 7 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography                               | 122  |
| ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System)   | 147  |
| จ.1 แสดงปริมาณของน้ำหนักร้อยตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแอสคิตินอิมยซ์โดยวิธีที่ 1 บริเวณบ่อน้ำร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง                   | 179  |
| จ.2 แสดงปริมาณของน้ำหนักร้อยตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแอสคิตินอิมยซ์โดยวิธีที่ 2 บริเวณบ่อน้ำร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง                   | 180  |

## สารบัญตาราง(ต่อ)

| ตารางที่   | หน้า |
|--|------|
| จ.3 แสดงรูปภาพผลการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่อุณหภูมิต่างๆที่คัดแยกได้จากวิธีที่ 1 และ 2  | 181  |
| จ.4 แสดงรูปภาพผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ | 184  |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

| รูปที่   | หน้า |
|--|------|
| 2.1 การเกิดน้ำพุร้อน   | 4    |
| 2.2 รอยเลื่อนแม่ทา   | 5    |
| 2.3 บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง                           | 6    |
| 2.4 ขั้นตอนการสร้างโคลนนิ่งของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง      | 9    |
| 2.5 การสร้างสปอร์เดี่ยว  | 11   |
| 2.6 ลักษณะสปอร์เป็นสาย   | 11   |
| 2.7 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ <i>Streptomyces</i>          | 12   |
| 2.8 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร                           | 13   |
| 2.9 รูปทรงของอับสปอร์  | 14   |
| 2.10 โครงสร้างทั่วไปของของฟอสโฟลิปิด                           | 29   |
| 2.11 โครงสร้าง phosphoglycerides และ sphingolipid              | 31   |
| 2.12 โครงสร้างของ Phosphatidic acid                            | 32   |
| 2.13 โครงสร้างของ Phosphatidylcholine                          | 32   |
| 2.14 โครงสร้างของ Phosphatidylethanolamine                     | 33   |
| 2.15 โครงสร้างของ Phosphatidylinositol                         | 34   |
| 2.16 โครงสร้างของ Phosphatidylserine                           | 34   |
| 2.17 โครงสร้างของ Cardiolipin                                  | 34   |
| 2.18 แสดงส่วนประกอบของ Thin layer chromatography               | 35   |
| 4.1 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต JSL9215  | 55   |
| 4.2 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต JSL91123 | 56   |
| 4.3 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต JSL61119 | 57   |
| 4.4 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต JSL61120 | 58   |
| 4.5 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต JSL82116 | 59   |
| 4.6 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต JSL92131 | 60   |
| 4.7 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต JSL82134 | 61   |
| 4.8 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต JSL8111  | 62   |
| 4.9 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต JSL5112  | 63   |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่  | หน้า |
|---|------|
| 4.10 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL10113  | 64   |
| 4.11 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL31111  | 65   |
| 4.12 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL32212  | 66   |
| 4.13 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL32213  | 67   |
| 4.14 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL32214  | 68   |
| 4.15 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL82129  | 69   |
| 4.16 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL82117  | 70   |
| 4.17 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL61130  | 71   |
| 4.18 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL82118  | 72   |
| 4.19 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL92135  | 73   |
| 4.20 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL10214  | 74   |
| 4.21 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL9216   | 75   |
| 4.22 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL9217   | 76   |
| 4.23 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL9228   | 77   |
| 4.24 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL9219   | 78   |
| 4.25 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL32210  | 79   |
| 4.26 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL82115  | 80   |
| 4.27 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL41136  | 81   |
| 4.28 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL92221  | 82   |
| 4.29 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL92222  | 83   |
| 4.30 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL92232  | 84   |
| 4.31 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL102226 | 85   |
| 4.32 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL92227  | 86   |
| 4.33 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลต JSL92228  | 87   |
| 4.34 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของแอสเพอร์จิลลินัมไฮฟาโอโซเลตทั้ง 33 โอโซเลต    | 92   |
| 4.35 แสดงรูปผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก และผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ    | 109  |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่  | หน้า |
|---|------|
| 4.36 แสดงรูปผนังเซลล์ของยีสต์   | 109  |
| 4.37 (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ATCC 074 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ATCC 074 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL92221 ในส่วนของตัวเซลล์   | 113  |
| 4.38 (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 74648 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 746 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL5112 ในส่วนของน้ำหมัก                                     | 114  |
| 4.39 (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 1248 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 1248 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL9217 ในส่วนของน้ำหมัก และส่วนของตัวเซลล์                            | 115  |
| 4.40 (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> TISTR 2374 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i> TISTR 2374 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL102222 และหมายเลข JSL102226 ในส่วนของน้ำหมัก และส่วนของตัวเซลล์ | 116  |
| 4.41 (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2370 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2370 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL102226 ในส่วนของน้ำหมัก                                   | 117  |
| 4.42 แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> ATCC 5239 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL31111 และหมายเลข JSL92221 ในส่วนของน้ำหมัก และส่วนของตัวเซลล์  | 118  |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่   | หน้า |
|--|------|
| 4.43 แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโตกราฟฟีเทียบกับสารมาตรฐาน (Standard) ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลทหมายเลข JSL5112 (1), JSL9217 (2), JSL9219 (3), JSL31111 (4), JSL92221 (5), JSL92222 (6) และJSL102226 (7) ที่ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast extract-malt extract agar (YEME) | 121  |
| 4.44 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องและวิถีในการสังเคราะห์คาร์ดีโอลิพินในแบคทีเรีย  | 123  |
| 4.45 แสดงระยะการพา (R <sub>f</sub> ) ของสารละลายฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน (PLs standard)   | 124  |
| 4.46 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL5112   | 125  |
| 4.47 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9217   | 126  |
| 4.48 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9219   | 127  |
| 4.49 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111  | 128  |
| 4.50 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221  | 129  |
| 4.51 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92222  | 130  |
| 4.52 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL102226   | 131  |
| ค.1 แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินจากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง  | 169  |
| ค.2 จุดเก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแอกติโนมัยซีทโดยวิธีที่ 1 เมื่อวันที่ 27 ธันวาคม 2560 เป็นตัวอย่างดินจากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง  | 170  |
| ค.3 จุดเก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแอกติโนมัยซีทโดยวิธีที่ 2 เมื่อวันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2561 เป็นตัวอย่างดินจากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง   | 171  |
| ง.1 แสดงผลการทดสอบการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar  | 172  |
| ง.2 แสดงผลการทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar  | 173  |
| ง.3 แสดงผลการทดสอบการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO <sub>3</sub> broth  | 173  |
| ง.4 แสดงผลการทดสอบการย่อยสลายเจลาตินในอาหาร Bouillon Gelatin Broth   | 174  |
| ง.5 แสดงผลการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหาร Tryptone-Yeast extract agar slant  | 174  |
| ง.6 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหาร Phenol red glucose broth   | 175  |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่  | หน้า |
|---|------|
| ง.7 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลแลคโตสในอาหาร Phenol red lactose broth    | 176  |
| ง.8 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลซูโครสในอาหาร Phenol red sucrose broth    | 176  |
| ง.9 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลไซโลสในอาหาร Phenol red xylose broth      | 177  |
| ง.10 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลแมนนิทอลในอาหาร Phenol red manitol broth | 178  |
| ข.1 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Escherichia coli</i>                          | 186  |
| ข.2 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>                     | 187  |
| ข.3 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i>                         | 188  |
| ข.4 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Micrococcus luteus</i>                        | 189  |
| ข.5 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                    | 190  |
| ข.6 แสดงลักษณะของเชื้อ <i>Candida albicans</i>                          | 191  |



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แอกติโนแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะที่พิเศษคือสามารถสร้างเส้นใย (hyphae) ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) ได้ในสิ่งแวดล้อมของแอกติโนแบคทีเรียส่วนมากจะมีปริมาณของเบสกวานีนและเบสไซโตซีนประมาณ 69-78 เปอร์เซ็นต์ (Nguyen and Kim, 2015) นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติโนแบคทีเรียมักมีความสามารถในการผลิตสารสังเคราะห์ได้ เช่น ขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ แอกติโนแบคทีเรียมักยังมีชีวิตรอดได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงได้ (สุจิตกัลยา, 2560) ผนังเซลล์ของแอกติโนแบคทีเรียมักมีโมโนเปปไทด์ ซึ่งประกอบไปด้วย N-acetyl glucosamine เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid และ diaminopimelic acid ; glycine และ alanine (นวลรัตน์, 2554) ลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียที่แตกต่างจากรา คือเป็นเซลล์โปรคาริโอตที่ไม่มีผนังเยื่อหุ้มนิวเคลียส และมีขนาดของเส้นใยที่เล็กกว่ารา โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร (กัจจันท์, 2555) แอกติโนแบคทีเรียมักสามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ และในเนื้อเยื่อพืช แหล่งที่พบมากได้แก่บริเวณที่มีการสะสมของสารอินทรีย์หรือเป็นดินที่มีฮิวมัสสูง เช่น โคลนตะกอนใต้แม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน ดินนาเกลือ หรือป่าชายเลน แอกติโนแบคทีเรียส่วนมากจะพบในดินที่ค่อนข้างเป็นกลาง หรือมีความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 6.5-8.0 โดยส่วนใหญ่แอกติโนแบคทีเรียในดิน คือ *Streptomyces* พบประมาณ 70-90% รองลงมาคือ *Nocardia* พบประมาณ 10-30% และ *Micromonospora* พบประมาณ 1-15% แอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส (ลลิตา, 2554) ส่วนแอกติโนแบคทีเรียที่เป็น thermophile สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 25 และ 55 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Abussaud, 2013) แอกติโนแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิสูงนั้นมีความสำคัญอย่างมากเนื่องจากแอกติโนแบคทีเรียเหล่านี้จะปรับตัวให้เข้ากับแหล่งที่อยู่อาศัยที่รุนแรงที่เชื้อแอกติโนแบคทีเรียอาศัยอยู่ ซึ่งทำให้สามารถผลิต biocatalysts ที่ทำงานภายใต้สภาวะที่รุนแรง จึงอาจทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในเชิงพาณิชย์ได้ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ ที่เกี่ยวข้องกับยาได้ (Mavengere, 2011) และแหล่งพื้นที่ที่ยังมิได้มีการสำรวจนั้นเป็นแหล่งที่มาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ รวมทั้งยาปฏิชีวนะ (Abussaud, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรง หรือแหล่งพื้นที่ที่ยังไม่ได้มีการสำรวจนั้น เป็นแหล่งที่มาของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ รวมทั้งยาปฏิชีวนะ (Berdy, 2005; Okoro *et al.*, 2009) อย่างเช่นในสภาวะแวดล้อมที่เป็นน้ำพุร้อนนั้นเป็นแหล่งที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ได้จากธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารต้านจุลชีพที่สร้างมาจากเชื้อแอคติโนมัยซีท (Thawai, 2012) ดังนั้นในการค้นหาสารปฏิชีวนะใหม่ๆ จึงได้ให้ความสนใจในการแยกจากสิ่งมีชีวิตที่เป็นพวกหายาก (Rare Actinomycetes) ซึ่งยากต่อการคัดแยก โดยเชื้อเหล่านี้ยังสามารถเจริญได้ในสภาวะสุดขั้ว อย่างเช่นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophile) (Yallop *et al.*, 1997; Thakur *et al.*, 2007) เชื้อที่แยกได้แยกน้ำพุร้อนส่วนมากเป็นพวก Thermophilic actinomycetes เช่น เชื้อสกุล *Streptomyces thermogriseus* sp. หรือเชื้อสกุล *Thermomonospora* เป็นต้น (Zhang *et al.*, 1998) ดังนั้นเราจึงให้ความสำคัญในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง

ในปัจจุบันแบคทีเรียที่ก่อโรคมามากมายสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอย่างเป็นประจำจากการที่เชื้อก่อโรคต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นอย่างแพร่หลายและความจำกัดทางด้านเภสัชวิทยาของยาปฏิชีวนะในปัจจุบัน การค้นหายาปฏิชีวนะตัวใหม่จึงได้กลายมาเป็นจุดสำคัญสำหรับการทำงานวิจัย ซึ่งประโยชน์ของแอคติโนมัยซีทที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารสี หรือสารอื่นๆ ได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีท (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยเชื้อในสกุล *Streptomyces* นั้นสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด ซึ่งผลิตได้ประมาณ 70% ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด *Streptomyces* และเชื้อแอคติโนมัยซีทอื่นๆ ส่วนใหญ่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลากหลายชนิด รวมไปถึง aminoglycosides, anthracyclins, glycol-peptides,  $\beta$ -lactams, macrolides, nucleosides, peptides, polyenes, polyethers และ tetracycline ในการสร้างสารปฏิชีวนะประมาณ 75% สามารถนำไปใช้ได้ทั้งในเชิงพาณิชย์และทางการแพทย์ เอนไซม์ที่แอคติโนมัยซีทที่เรียกว่าสามารถผลิตได้มีหลายชนิดได้แก่ xylanase, cellulose, amylase และ chitinase เป็นต้น (กิ่งจันทร์, 2555)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตำบลวังเงิน จังหวัดลำปางและกำหนดหมายเลขไอโซเลท
2. เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ
3. เพื่อทำการศึกษากาการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน
4. เพื่อศึกษาการสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักของเชื้อแอกติโนมัยซีท และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ จากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ทำการคัดแยกได้จากน้ำพุร้อน
5. เพื่อศึกษาองค์ประกอบฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้

## 1.3 ขอบเขตโครงการพิเศษ

ทำการเก็บตัวอย่างจากดินบ่อน้ำพุร้อน โดยมีการวัดค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิ ณ จุดที่เก็บ ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทพร้อมทั้งกำหนดหมายเลขไอโซเลท แล้วนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ และทำการศึกษากาการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เพื่อดูความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท ทำการสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักของเชื้อแอกติโนมัยซีท เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพจากเชื้อแอกติโนมัยซีท ด้วยวิธี Agar disc diffusion นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีท โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตำบลวังเงิน จังหวัดลำปาง
2. สามารถทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ
3. สามารถทราบถึงลักษณะการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน
4. สามารถทำการสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักของเชื้อแอกติโนมัยซีท เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์
5. สามารถทราบถึงองค์ประกอบฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากน้ำพุร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

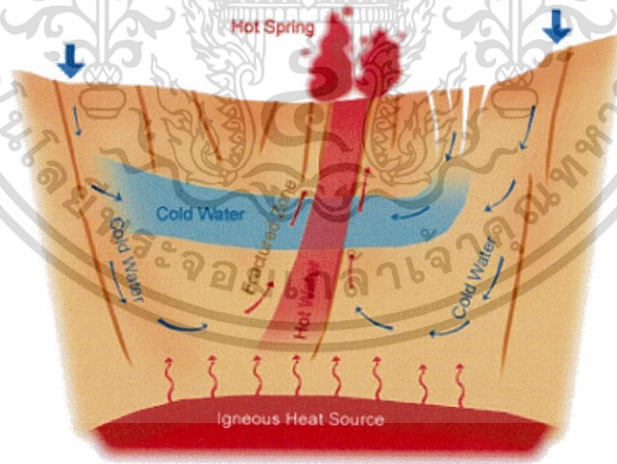
### 2.1 บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน

#### 2.1.1 ที่ตั้ง

อุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน ต.แจ้ซ้อน อ.เมืองปาน จ.ลำปาง 52240

#### 2.1.2 ลักษณะของบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน

ตั้งอยู่หมู่ที่ 8 ตำบลวังเงิน ถนนลำปาง-เด่นชัย บริเวณอุทยานฯ มีธารน้ำแร่ ที่เต็มไปด้วย โขดหินธรรมชาติ ที่สวยงามแทรกอยู่ท่ามกลางแอ่งน้ำร้อน เป็นแหล่งน้ำพุร้อนที่มีสภาพการเกิดทางธรณีวิทยา มีกลิ่นกำมะถันอ่อนๆ น้ำพุร้อนแจ้ซ้อนเกิดจากน้ำเย็นบนผิวดินหรือน้ำฝน ที่ไหลซึมผ่านช่องว่างหรือรอยแตกของหิน (ยุคไซลูเรียน - ดีโวเนียน) ลึกลงไปได้ผิวดินแล้วได้รับความร้อนจากหินร้อนทำให้มีอุณหภูมิและความดันสูงขึ้น ไหลกลับสู่เบื้องบนและมาสะสมตัวในแหล่งกักเก็บที่เหมาะสม ดังรูปที่ 2.1 น้ำพุร้อนแจ้ซ้อนปรากฏบนผิวดินจำนวน 9 บ่อ กระจายตัวอยู่ในบริเวณพื้นที่ 3 ไร่ มีอุณหภูมิระหว่าง 68-82 องศาเซลเซียส มีอัตราการไหลของน้ำร้อนวัดได้ประมาณ 15 ลิตรต่อวินาที และคำนวณอุณหภูมิน้ำร้อนขณะอยู่ที่ดิน ได้ค่าประมาณ 149 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์เป็นกลาง

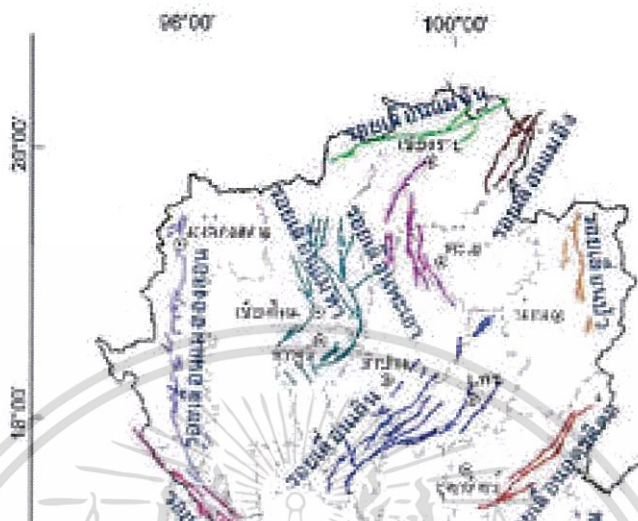


รูปที่ 2.1 การเกิดน้ำพุร้อน

ที่มา: <https://skphotosprings.wordpress.com>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งน้ำพุร้อนแทบทุกแห่งที่ปรากฏอยู่ทางภาคเหนือ มักมีความสัมพันธ์หรืออยู่ภายใต้ อิทธิพลของรอยเลื่อน ซึ่งน้ำพุร้อนแจ้ซ้อนนี้อยู่ใกล้กับ รอยเลื่อนแม่ทา ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 รอยเลื่อนแม่ทา

ที่มา: กรมทรัพยากรธรณี

บริเวณอุทยานฯ มีธารน้ำแร่ ที่เต็มไปด้วยโชดหินธรรมชาติ ที่สวยงามแทรกอยู่ท่ามกลาง แอ่งน้ำร้อน น้ำแร่มีอุณหภูมิสูงถึง 70 – 80 องศาเซลเซียส เป็นแหล่งน้ำพุร้อนที่มีสภาพการเกิด ทางธรณีวิทยา มีกลิ่นกำมะถันอ่อนๆ จำนวน 9 บ่อ ตั้งอยู่รวมกันในบริเวณ โดยแต่ละบ่อจะมี อุณหภูมิที่ต่างต่างกัน พื้นที่ทำการอุทยานฯ ประมาณ 3 ไร่ ภายในพื้นที่มีโชดหินน้อยใหญ่กระจาย กระจายอยู่ทั่วไป และมีไอน้ำลอยกรุ่นขึ้นมาจากบ่อปกคลุมรอบบริเวณน้ำพุร้อน มีอุณหภูมิเฉลี่ย 73 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถแช่ให้สุดได้ภายในเวลา 15 นาที ธารน้ำจากน้ำตกแจ้ซ้อนไหลมา บรรจบกับธารน้ำร้อนจากน้ำแร่ กลายเป็นธารน้ำอุ่น (กรมอุทยานแห่งชาติ, 2560) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง

## 2.2 แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากน้ำพุร้อน

Thermophilic actinomycetes นั้นมีประโยชน์ในการผลิตยาปฏิชีวนะ เอนไซม์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและ มีการ autolysis ของเส้นใยอย่างรวดเร็ว และยังมีประโยชน์สำหรับการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการและการกลไกในการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อมที่รุนแรง นอกจากนี้ยังเป็นทรัพยากรที่สำคัญสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (Li-Hua *et al.*, 1998) การเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีทและแบคทีเรียมีความต้องการอาหารน้อยที่สุด และด้วยเหตุนี้แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากที่จะเป็นแหล่งของเอนไซม์ในอุตสาหกรรม (Chauhary and Prabhu, 2016) ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาการระบุวิวัฒนาการใหม่ ๆ เช่น พวก thermophiles แมลง และ endosymbionts จะช่วยให้สามารถเข้าถึงสิ่งมีชีวิตใหม่ ๆ และสารเคมีที่ออกฤทธิ์ใหม่ๆได้ (Khalid *et al.*, 2014) อย่างเช่นในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำพุร้อนนั้นเป็นแหล่งที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ได้จากธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารต้านจุลชีพที่สร้างมาจากเชื้อแอคติโนมัยซีท (Thawai, 2012)

ตั้งในงานวิจัยของ Abussaud (2013) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces* จำนวน 30 ไอโซเลท จากบริเวณน้ำพุร้อน ทางตอนเหนือของประเทศจอร์แดน โดยมี 4 สายพันธุ์เป็นพวกที่ทนต่อความร้อน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส และมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่หรือนำไปใช้ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยคิดเป็น 20 และ 26 % ของจำนวนไอโซเลท ตามลำดับ ในขณะที่ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ได้ 23% ของจำนวนไอโซเลท

## 2.3 แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)

แอคติโนมัยซีทได้รับการยอมรับว่าเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่แตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอื่น ๆ กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีการจัดกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดในกลุ่มแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะเป็นสาร G + C สูงในดีเอ็นเอ (Mavengere, 2011) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือมี mycelium แตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia และ sporangiospore อยู่ใน sporangium ลักษณะที่แตกต่างจากราที่สำคัญของแอคติโนมัยซีทคือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งจัดเป็นเซลล์โปรคาริโอต และขนาดของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ลักษณะของโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าโคโลนีเกาะแน่นและมีลักษณะจมอยู่ในอาหาร โคโลนีคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หยาบขรุขระคล้ายหนังสือตัว บางชนิดอาจมีการสร้างรงควัตถุสีต่างๆ เช่น สีขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู และสีดำ เป็นต้น (ชฎาภากาญจน์, 2557) ส่วนการเจริญของเส้นใยสามารถเจริญไปเป็นเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศเรียกว่า aerial mycelium และมีส่วนที่เป็นเส้นใยเจริญลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อเรียกว่า substrate mycelium ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญหรือช่วงอายุจะยาวนานกว่าแบคทีเรียมาก แอคติโนมัยซีทจึงเจริญได้อย่างช้าๆ อันเป็นลักษณะสำคัญประการหนึ่งของแอคติโนมัยซีท (Martin, 1961) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถนำมาใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกหมวดหมู่ของแอคติโนมัยซีทได้ (กิ่งจันทร์, 2555)

เชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบกระจายในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อในกลุ่ม Streptomyces ซึ่งมีมากถึง 70 – 90% ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบในดินโดยเฉพาะในดินที่มีการทำการเกษตร (ชาญวิทย์, 2546) ในดินที่มีแอคติโนมัยซีทจะมีกลิ่นเหม็นอับเนื่องจากแอคติโนมัยซีทมีแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารที่เรียกว่า “จีโอสมิน”(Geosmin) ที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นอับ แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทค่อนข้างทนต่อความแห้งแล้งจึงสามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่แห้งแล้งมาก เช่น ดินในทะเลทราย นอกจากนั้นยังชอบเจริญในสภาวะที่เป็นด่างหรือเป็นกลางแต่ไม่ทนสภาวะที่เป็นกรด แอคติโนมัยซีทได้รับความสนใจมากขึ้นเมื่อมีการค้นพบว่าบางสกุลของแอคติโนมัยซีทเช่น *Streptomyces* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (จามจวี, 2555) นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แล้งแค้งยังเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่มีประโยชน์อีกด้วย (Moncheva, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 นิเวศวิทยาของแอกติโนมัยซีท

**2.4.1 ดินและต้นพืช** ดินนั้นเป็นตัวอย่างที่ดีในการศึกษาหรือคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท และแอกติโนมัยซีทที่หายากส่วนใหญ่จะแยกได้มากจากดินที่ประเภทแตกต่างกัน แอกติโนมัยซีทที่หายากส่วนใหญ่ที่แยกได้มาจากต้นพืช ซึ่งเพื่อหาแหล่งจุลินทรีย์ที่แปลกใหม่เพื่อใช้ในการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ตัวอย่างเช่น ในงานวิจัย Qin *et al.*, (2009) รายงานเป็นครั้งแรกว่าสามารถแยก *Saccharopolyspora*, *Dietzia*, *Blastococcus*, *Dactylosporangium*, *Promicromonospora*, *Oerskovia*, *Actinocorallia* และสายพันธุ์ *Jiangella* จากสภาพแวดล้อมที่เป็น endophytic และแอกติโนมัยซีทที่เป็น endophytic เช่น *Frankia* มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ (Subramani *et al.*, 2013)

แอกติโนมัยซีทสามารถพบได้ในดินตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยที่ทับถมกันซึ่งเป็นที่ที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง ไนโคลิน ได้ทะเลสาบ แม่น้ำ โดยปกติจะสามารถพบได้ที่ผิวหน้าดิน ประมาณ 4 เซนติเมตร พบว่าในดินทั่วไปมีจำนวนใกล้เคียงกับแบคทีเรีย แต่ถ้าในดินที่มีค่าความเป็นด่างเท่ากับ 6.5-8 จะมีปริมาณของแอกติโนมัยซีทสูงประมาณ ร้อยละ 95 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แต่ในดินที่มีค่าความเป็นด่างที่ปกติไปจะพบประมาณร้อยละ 10-70 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีท ได้แก่ บริเวณทุ่งหญ้า ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ พบน้อยในดินที่มีการทำการเกษตร (กิ่งจันทน์, 2555)

**2.4.2 สภาพแวดล้อมที่รุนแรง** สภาพแวดล้อมที่รุนแรงมีสภาพการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ เช่น อุณหภูมิสูงและต่ำ, มีสภาพแวดล้อมที่เป็นเกลือ, ความเป็นกรดและด่าง, กัมมันตภาพรังสีและความดันสูง จุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้รับความสนใจเป็นพิเศษจากความพิเศษของพวกเขากลไกของการปรับตัวให้เข้ากับสภาพการณ์ที่รุนแรงสภาพแวดล้อมและเนื่องจากพวกเขาสามารถผลิตสารผิดปกติ (Meklat *et al.*, 2011)

**2.4.3 การทนความร้อน** โดยทั่วไปสปอร์ของแอกติโนมัยซีทที่เรียทนความร้อนได้สูงกว่าเซลล์ปกติเพียงเล็กน้อย อย่างเช่น *Streptomyces* ที่ชอบอุณหภูมิสูงสามารถเจริญได้อุณหภูมิระหว่าง 25 และ 55 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Abussaud, 2013)

**2.4.4 ความสามารถในการแข่งขัน** แอกติโนมัยซีทนั้นมีการเจริญที่ช้ากว่าและแบคทีเรียมาก ทำให้มีความสามารถในการแข่งขันน้อยกว่าจุลินทรีย์อื่นในสภาพธรรมชาติ แต่แบคทีเรียและราอื่นไม่สามารถย่อยสลายประกอบที่แอกติโนมัยซีทที่เรียย่อยได้ จึงทำให้แอกติโนมัยซีทที่เรียมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

หลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้มีจำนวนลดลงแล้ว สภาพที่เหมาะสมกับแอสคิโนแบคทีเรีย เช่น ดินที่ค่อนข้างเป็นด่าง แห้งแล้ง และอุณหภูมิสูง เป็นต้น ( กิ่งจันทน์, 2555)

## 2.5 ลักษณะทั่วไปของแอสคิโนไมซีท

### 2.5.1 สัณฐานวิทยาของแอสคิโนแบคทีเรีย

#### 2.5.1.1 การสร้างโคโลนี

โคโลนีของแอสคิโนแบคทีเรียเกิดจากการรวมกันของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็ง (รูปที่ 2.4) เริ่มจากการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยวอับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่หัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอสคิโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ( กิ่งจันทน์, 2555)

A: อับสปอร์มีการพัฒนาเป็นเส้นใย B: สายใยอาหารเจริญแทงผ่านลงไปในการ (substrate mycelium) C: เส้นใยเจริญเหนืออาหารและมีการสร้างสปอร์ (aerial mycelium)

#### 2.5.1.2 ลักษณะของโคโลนี

โคโลนีของแอสคิโนไมซีทเกิดจากการรวมกันของกลุ่มเส้นใยโคโลนีของแอสคิโนไมซีทต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียเนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียเกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนกันแต่โคโลนีของแอสคิโนไมซีทเกิดจากการรวมกันของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่มีความหนาแน่น การเจริญของโคโลนีเริ่มจากการที่หัวเชื้อเจริญในปริมาณที่พอเหมาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อหัวเชื้ออาจมาจากสปอร์เดี่ยวอับสปอร์ ส่วนที่แตกหักของเส้นใยหรือจากส่วนของโคโลนีที่มีอายุมาก และจะพัฒนาเป็นสายใยอาหารเมื่อสายใยอาหารเจริญเต็มที่ในแนวตั้งทางผ่านอาหารขึ้นมาเป็นสายใยอากาศและจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี เช่น สร้างสปอร์เส้นใยจะเริ่มแบ่งตัวเริ่มจากการสร้างผนังกันภายในโดยทั่วไปเส้นใยมีผนังกันชั้นเดียวเพื่อความคงตัวและสร้างเป็นเส้นใยแข็งจึงเป็นการยากที่จะสรุปความหลากหลายทั้งหมดของลักษณะโคโลนี เช่น เกี่ยวกับการบ่งชี้สปีชีส์ของแอสคิโนไมซีท เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โนมัยซีทความแตกต่างของสายใยอาหารและสายใยอากาศจึงนำมาใช้เป็นหลักในการแยกชนิดของโคโลนี เช่น กรณีของ *Streptomyces* มีทั้งสายใยอาหารและสายใยอากาศเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนีใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีสายใยอากาศ (Jongrungruangchok *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า *Sporichthya* จะมีวงชีวิตที่สมบูรณ์เมื่อมีการสร้างสายใยอากาศสั้นๆ โคโลนีของแอกติโนมัยซีทอาจฟู (Raised) หรือเรียบแบน (Flat) ลักษณะอาจมีตั้งแต่นุ่มมากเหนียวจนถึงแข็งมาก โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเส้นใยสั้นๆเกาะกันแน่นและฝังอยู่ในอาหาร โคโลนีมีลักษณะเป็นผงหรือฝุ่นแป้ง หรือขรุขระคล้ายหนังสัตว์ บางชนิดสามารถสร้างรงควัตถุต่างๆ เช่น สีส้ม สีครีม สีเทา เป็นต้น ช่วงอายุในการเจริญจะยาวนานกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นมาก (Thurnkul and Huanraluek, 2017) พื้นผิวของโคโลนีมีลักษณะเรียบ นูน ขรุขระ เป็นรอยย่น เป็นเม็ดเล็ก เป็นผง หรือเป็นเกล็ด ขนาดของโคโลนีขึ้นอยู่กับ สปีชีส์ อายุ และสภาวะในการเจริญเติบโต เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (จามจรี, 2555)

### 2.5.1.3 โครงสร้างภายในเส้นใย

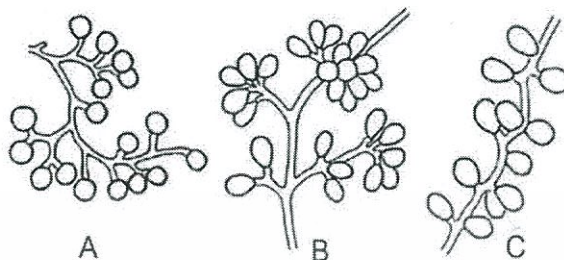
เส้นใยมีความหนาประมาณ 0.4 - 1.2 ไมโครเมตร เส้นใยเป็นแบบมีผนังกันและเจริญออกทางด้านปลายสามารถแตกแขนงได้โครงสร้างหลักในเส้นใยที่แสดงว่าเป็นโพรคาริโอต คือ ไนไซโตพลาสซึม ประกอบไปด้วยสาย ดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น Polyphosphate, Lipid หรือ Polysaccharides เยื่อหุ้มเซลล์ติดกับไซโตพลาสซึมอาจเกิดมีไซโซมซึ่งมักต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์ (กิ่งจันทน์, 2555)

### 2.5.1.4 การสร้างสปอร์

แอกติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอกดังนี้

- **การสร้างสปอร์เดี่ยว** การสร้างสปอร์เดี่ยวเรียกว่า Monosporous พบในหลายสกุล ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (Sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหารสปอร์ติดอยู่ที่ฐานหรือพองตัวจากนั้นมีการสร้างผนังกันและสร้างเป็นผนังสปอร์ในส่วนของสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนสายใยอากาศ ที่ปลายก้านชูสปอร์ ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์สกุลอื่นๆที่สร้างสปอร์เดี่ยวคือ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนงถ้าใช้ศัพท์ทางเราอาจเรียกว่าการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* ว่า

aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยที่แตกแขนงมีการโป่งออก ลักษณะการ  
สร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* (รูปที่  
2.5) (กิ่งจันทน์, 2555)

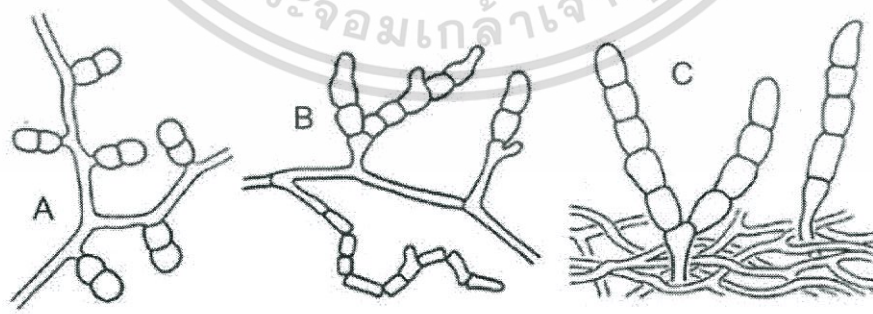


รูปที่ 2.5 การสร้างสปอร์เดี่ยว (กิ่งจันทน์, 2555)

A: *Micromonospora* B: *Thermomonospora* C: *Saccharomonospora*

- การสร้างสปอร์เป็นสาย ในแอคติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วน มากสามารถ  
แบ่งลักษณะของสายสปอร์ โดยพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนของสปอร์นั้นคือ di หรือ  
bisporous, oligosporous หรือ polysporous

สาย bisporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้าง  
สปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้น  
ใยอากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ (รูปที่ 2.6) นอกจากนี้สกุล *Actinobispora* มีสปอร์  
แบบ disporous เช่น การสร้างสปอร์เริ่มจากนั้นมีการพองออกและสร้างผนังกันตรงกลาง (กิ่งจันทน์,  
2555)



รูปที่ 2.6 ลักษณะสปอร์เป็นสาย (กิ่งจันทน์, 2555)

A: การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora* B และ C: การสร้างสปอร์ oligosporous ของ

*Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ (รูปที่ 2.7)

- 1) Rectiflexbiles ลักษณะของสายสปอร์ตรง หรือโค้งงอ
- 2) Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1-3 ชั้น
- 3) Spira สายสปอร์เป็นเกลียวแยกได้เป็น 2 แบบคือเป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่นและเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาว ยืด ไม่ติดกันแน่น
- 4) Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายกันหอย และแตกแขนงกันแน่น (กึ่งจันท์, 2555)



รูปที่ 2.7 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces* (กึ่งจันท์, 2555)

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

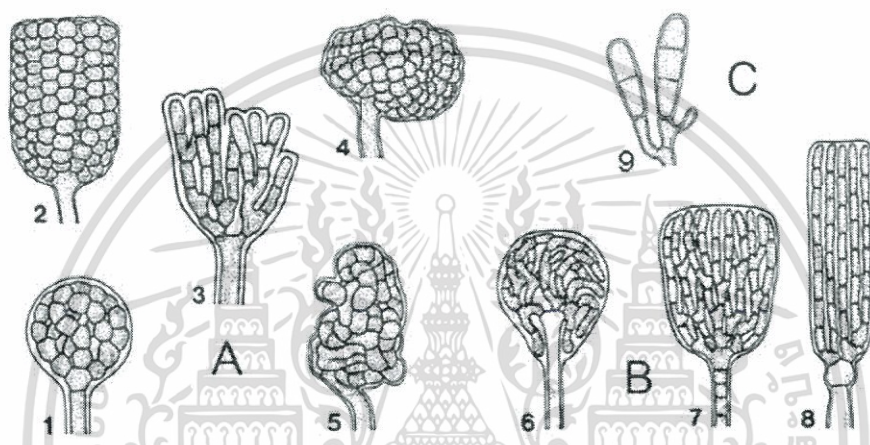
### - การสร้างสปอร์ในอับสปอร์

การสร้างสปอร์ในอับสปอร์มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมายสามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม

- 1) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะทรงกลม หรือเกือบกลมจนถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 - 15 ไมโครเมตร และอยู่บนสายใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดกันเป็นก้อน อยู่ภายในผนังห่อหุ้ม (รูปที่ 2.8) สปีชีส์ *Ampullariella* ในสกุล *Atinoplans* สร้างอับสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันไป คือ รูปทรงกระบอก ทรงขวด เป็นต้น ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 5 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์คือ *Pilimelia* อับสปอร์สร้างขึ้นบนผิวของอาหาร มีรูปทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10 – 15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกันหรือววนไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้ยังมีอีกสกุล คือ *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจำนวนสปอร์แบบ Oliosporous คือมีสปอร์ประมาณ 2 – 5 สปอร์ อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ

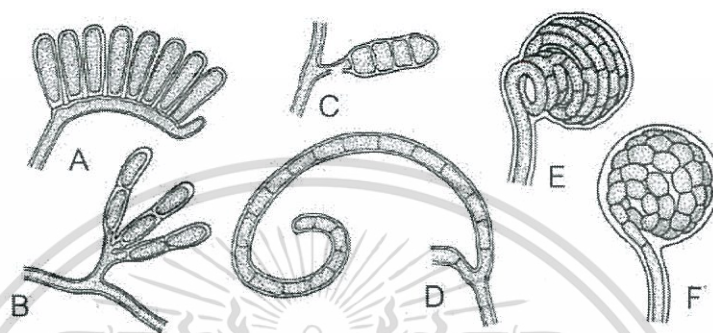


รูปที่ 2.8 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร (กิงจันท์, 2555)

A: สกุล *Actinoplanes* (รวมถึง *Ampullariella*) 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู 4. กิ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง B: สกุล *Pilimelia* 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก C: สกุล *Dactylosporangium* 9. รูปทรงกระบอก

2) กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ (รูปที่ 2.9) ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในทรงกระบอกมีเพียง 1 สปอร์ สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ในอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ ต่อกันเป็นหนึ่งแถว สกุล *Planoplyspora* มีสปอร์จำนวนมากภายในอับสปอร์ เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบนยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมากต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ภายใน สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเป็นสปอร์เดี่ยวๆ ต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ในภายในอับสปอร์ ในปัจจุบัน สกุล *Kutzneria* ได้ถูกแยกออกจากสกุล *Streptosporangium* มีอับสปอร์ลูกกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 48 ไมโครเมตร และมีผนังอับสปอร์บาง อยู่บนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก้านชูสปอร์ สกุล *Spirllspora* มีอับสปอร์เรียงตัวเป็นสายแตกแขนง หรือเป็นวงสปอร์เป็นรูปแท่ง และโค้งงอ



รูปที่ 2.9 รูปทรงของอับสปอร์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 การจัดจำแนกประเภทของแอกติโนมัยซีท (จามจรี, 2555)

แอกติโนมัยซีทสามารถ แบ่งเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

2.6.1 Nocardioform actinomycetes มีลักษณะที่ต่างกันอย่างหลากหลาย Substrate mycelium จะแตกหักออกเป็นท่อนสั้นๆ และบางสกุลสร้าง Aerial hypha ที่ปลายมี Arthrospore ประกอบด้วยสมาชิกสกุลต่างๆ ที่มี Wall chemotypes แตกต่างกัน หรือการมี Mycolic acid เป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ หรือลักษณะอื่นๆ แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1 ผนังเซลล์มี Mycolic acid เป็นองค์ประกอบ

กลุ่มย่อยที่ 2 Pseudonocardia และสกุลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

กลุ่มย่อยที่ 3 Nocardiodes และ Terrabacter

กลุ่มย่อยที่ 4 Promicromonospora และสกุลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

2.6.2 สกุลต่างๆ ที่สร้าง Multilocular sporangia Substrate mycelium จะแบ่งตามยาวและตามขวางหลายระนาบจึงทำให้ได้สปอร์ค่อนข้างกลม เคลื่อนที่ได้ เช่น สกุล *Dermatophilus* หรือเคลื่อนที่ไม่ได้ เช่น สกุล *Frankia*

2.6.3 Actinoplanetes Substrate mycelium ไม่แตกหักเป็นท่อนๆ อาจสร้าง Aerial mycelium บ้างเล็กน้อยหรือไม่สร้างเลย และสร้าง Motile spore ภายใน Sporangium หรือสร้าง Non motile spore เดี่ยวๆ เช่น สกุล *Micromonospora* หรืออาจมีการสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสาย ผนังเซลล์มี Meso-DAP และ Glycin เป็นองค์ประกอบ และ Whole cell hydrolysates มี Arabinose และ Xylose เป็นองค์ประกอบ

2.6.4 Streptomycetes และสกุลอื่นๆ มีลักษณะต่างกันอย่างหลากหลาย ผนังเซลล์มี L-DAP และ Glycin เป็นองค์ประกอบสร้าง Substrate mycelium และ Aerial mycelium ซึ่งที่ปลายมี Conidia ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ *Streptomyces*, *Streptoverticillum* และสกุลที่ไม่สร้าง Aerial mycelium หรือสร้างเล็กน้อย สร้างสปอร์หลายรูปแบบ

2.6.5 Maduromycetes สร้าง Substrate mycelium ที่ไม่แตกหักเป็นท่อน และสร้าง Aerial mycelium ซึ่งสร้างต่อกันเป็นสาย เช่น *Microbisspora* ประกอบด้วย 2 สปอร์ *Microtetraspore* ประกอบด้วย 4 สปอร์ *Actinomadura* ซึ่งมีจำนวนสปอร์แตกต่างกันบนแต่ละสายของสปอร์ สกุลที่สร้าง Motile spore ใน Sporangium ได้แก่ *Planobisspora*, *Planomonospora*, *Spirillospora* และสกุล *Streptosporangium* สร้าง Non motile spore ใน

Sporangium ผนังเซลล์ประกอบด้วย Meso-DAP และ Cell hydrolysate ประกอบด้วยน้ำตาล madurose

2.6.6 Thermomonospora และสกุลอื่นๆ ที่คล้ายกันสร้าง Substrate mycelium ที่ไม่แตกหักเป็นท่อนๆสร้าง Aerial mycelium สกุกที่สร้างสปอร์1อัน ได้แก่ *Thermomonospora* และ สร้างสปอร์เป็นสายได้แก่ *Norcardiopsis*, *Actinosynnema* หรือสร้างสปอร์ภายในโครงสร้างคล้ายSporangium ได้แก่ สกุก *Streptoalotrichus* ผนังเซลล์ประกอบด้วย Meso-DAP ไม่พบ Amino acid และ Sugar ใน Whole cell hydrolysates

2.6.7 Thermoactinomyces มีเพียงสกุลเดียว คือ *Thermoactinomyces* สร้าง Substrate mycelium ที่ไม่แตกหักเป็นท่อนๆสร้าง Aerial mycelium สร้างเอ็นโดสปอร์ 1 อันบนทั้ง Substrate mycelium และ Aerial mycelium เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (Thermophile) ผนังเซลล์ประกอบด้วย Meso-DAP ไม่พบกรดอะมิโนและน้ำตาล

2.6.8 สกุกอื่นๆประกอบด้วย 3 สกุกที่ไม่สามารถจัดไว้ในทั้ง 7 กลุ่ม ได้แก่ *Glycomyces*, *Saccharothrix* และ *Kitasatosporangia*

## 2.7 แอคติโนมัยซีทหายาก (Rare actinomycetes)

แอคติโนมัยซีทกลุ่มอื่นเรียกว่า non-streptomycete ซึ่งเป็นแอคติโนมัยซีทที่หายาก มีอยู่ประมาณ 100 สกุก มีความหลากหลายทางด้านรูปร่าง นิเวศวิทยา และสายวิวัฒนาการ (Miyadoh, 1997) แอคติโนมัยซีทชนิดอื่นๆ ที่จัดว่าเป็นแอคติโนมัยซีทที่หายาก เช่น *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Dectylosporangium* และ *Actinoplanes* เป็นต้น การศึกษาเชื้อในกลุ่มที่หายากนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะค้นหาสารปฏิชีวนะหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ

โดยแอคติโนมัยซีทที่หายากประกอบด้วย 5 แฟมิลี ได้แก่ *Micromonosporaceae*, *Streptosporangiaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Thermomonosporaceae* และ Other (unclassified) species (ลลิตา, 2554)

### 2.7.1 แฟมิลี Micromonosporaceae

แฟมิลี Micromonosporaceae ประกอบด้วยสกุก *Micromonospora*, *Actioplanes*, *Dactylosporangium*, *Pilimelia*, *Catenuloplanes*, *Couchiplanes*, *Catellotospora* ซึ่งอธิบายโดย Strackbrandt และคณะในปี 1997 นอกจากนี้ยังมี *Spiriliplanes* (Tamura, 1977) และ *Verrucosisporea* (Rheims et al., 1998)

### 2.7.2 แฟมิลี Streptosporangiaceae

แฟมิลี *Streptosporangiaceae* ประกอบด้วยสกุล *Amophosporangium*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium*, *Kitasatoa*, *Pilimelia*, *Planobispora*, *Planomonospora* และ *Spirillospora* (Couch and Bland, 1974)

### 2.7.3 แฟมิลี Pseudonocardiaceae

แฟมิลี *Pseudonocardiaceae* ประกอบด้วย *Actinopolyspora*, *Amycolata*, *Amycolapsis*, *Kibdelosporangium*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora* และ *Saccharomonospora* (Bowen *et al.*, 1989; Embley *et al.*, 1988)

### 2.7.4 แฟมิลี Thermomonosporaceae

แฟมิลี *Thermomonosporaceae* ประกอบด้วยสกุล *Actinomodura* (Lechevalier and Lechvalier, 1970), *Actinocorallina* (Liluma *et al.*, 1994), *Spirillospora* (Couch, 1963) และ *Thermomonospora* (Henssen, 1957)

### 2.7.5 แฟมิลี Other (unclassified) species

แฟมิลีอื่นๆ ประกอบด้วยสกุล *Frankia* และ *Salinispora* ในประเทศไทยมีรายงานการพบสปีชีส์ใหม่ของแอกติโนมัยซีทหายากของสองสกุล ได้แก่ *Micromonospora* (Thawai *et al.*, 2004, 2005, 2007, 2008; Jongrungranchok *et al.*, 2008) และสกุล *Microbispora*

## 2.8 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติโนมัยซีทกับน้ำพุร้อน

2.8.1 แอกติโนมัยซีทสามารถพบได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ทั่วไป เช่น ดินรอบรากพืช (rhizosphere) ดินป่าชายเลน และดินน้ำพุร้อนเป็นต้น โดยในดินน้ำพุร้อนมีค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างเป็นกลาง ซึ่งจะพบแอกติโนมัยซีทในดินชั้นบนมากกว่าและจะลดจำนวนลงในดินชั้นกลางหรือดินที่ลึกลงไป (Holt, 1994)

2.8.2 ความสามารถในการทนความแห้งแล้งและการทนความร้อนของสปอร์ แอกติโนมัยซีทในเขตร้อนมีความสามารถในการทนความแห้งแล้งได้ดีกว่าเขตอบอุ่น โดยจะพบมากในดินที่มีสภาพแห้ง และการทนความร้อนของสปอร์ พบว่า สปอร์ของ thermophilic actinomycetes สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ ซึ่งสปอร์จะทนความร้อนแห้งได้ดีกว่าสปอร์ที่อยู่ในสารละลายซูโครส (กิ่งจันทร์, 2555)

2.8.3 ในสภาพดินที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงระหว่าง จะพบแอกติโนมัยซีทได้หลายกลุ่ม เช่น Thermophilic actinobacteria, Thermotolerant actinobacteria และ Moderately เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thermophilic actinobacteria (เจริญได้ในอุณหภูมิสูงปานกลาง ระหว่าง 28-60 องศาเซลเซียส) (Zvyagintsev, 2010)

## 2.9 Extremophilic / Extremotolerant Actinobacteria

แอกติโนแบคทีเรีย เกิดขึ้นได้ในสภาพแวดล้อมปกติหรือในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้ การเจริญของแอกติโนแบคทีเรียในดินจะสอดคล้องกับปัจจัยแวดล้อม เช่น pH ความเค็ม อุณหภูมิและความชื้น แอกติโนมัยซีทเป็นโพรคาริโอตที่มีความพิเศษ พบว่ามีความทนทานต่อปัจจัยเหล่านี้มากกว่าแบคทีเรียปกติ Extremophilic / Extremotolerant actinobacteria มีการเจริญที่ต่างออกไปจากแบคทีเรีย ทั้งลักษณะสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธาน (Zenova *et al.*, 2010) ทำให้สามารถเจริญภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ แอกติโนแบคทีเรียที่ได้รับการบันทึกไว้ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงจำนวนหลายสายพันธุ์ ซึ่งจะต่างจากข้อกำหนดความโดดเด่นของแอกติโนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดและในดิน โดยแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากสภาวะแวดล้อมปกติ จะมีค่า pH เป็นกลาง และมีอุณหภูมิระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส งานวิจัยบางส่วนที่เข้าถึงความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียในสภาพแวดล้อมที่รุนแรง เช่น สายพันธุ์แอกติโนแบคทีเรียที่เป็น polyextremophile หรือ polyextremotolerant จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ polyextremophile สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่หลากหลายได้ ซึ่งประกอบด้วย alkalithermophilic, thermoacidophilic, thermophilicradiotolerant, haloalkaliphilic และ thermoalkalitolerant actinobacteria (Shivlatal, 2015)

## 2.10 Thermophilic และ Thermotolerant actinobacteria

Thermotolerant actinobacteria เจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศ อุณหภูมิค่อนข้างสูงตั้งแต่ 40 ถึง 80 องศาเซลเซียส โดยจะแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ strictly thermophilic actinobacteria จะเจริญที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น 37 - 65 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 55 - 60 องศาเซลเซียส และ moderately thermophilic actinobacteria เจริญที่อุณหภูมิ 28-60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45-50 องศาเซลเซียส ส่วนอีกชนิด คือ Thermotolerant actinomycetes จะเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสขึ้นไป (Shivlatal, 2015) การทนความร้อนกับกระบวนการหายใจของ thermophilic actinomycetes จะไม่มีความสัมพันธ์กับ cytochrome เช่น โดยทั่วไป *Streptomyces thermonitrificans* มีกิจกรรมที่ทนต่ออุณหภูมิได้มากที่สุด ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิในการเจริญเติบโตไม่ส่งผลต่อกระบวนการหายใจ แต่มีผลต่อความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิของสารออกซิโดสบางชนิด (Edward, 1987)

## ด้านสรีรวิทยา

Thermotolerant actinobacteria เจริญได้ดีในที่อุณหภูมิสูงและที่มีอากาศเท่านั้น และใช้สารอินทรีย์ธรรมดาเป็นแหล่งพลังงานเคมีในการสร้างอาหาร (obligate chemoorganotroph) (ตันโซ, 2550) thermotolerant actinobacteria บางชนิด เช่น *Streptomyces thermoautotrophicus* และ *Acidithiobacillum* sp. ใช้สารอินทรีย์ โดยอาศัยพลังงานเคมีในการสร้างอาหาร (obligate chemoautotrophs) จะเจริญในที่ที่มี  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  และซัลเฟอร์เท่านั้น การสร้างอาหารแบบอื่น เช่น Facultative methylotroph และ Facultative chemoautotrophy เป็นข้อสังเกตของพวก thermophilic actinobacteria สรีรวิทยาทางเมตาบอลิซึมที่หลากหลายนั้น ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของ thermophilic actinobacteria ที่อยู่ในโซนภูมิประเทศที่แตกต่างกัน แอคติโนแบคทีเรียที่เรื้อพบในสภาวะแวดล้อมเป็นหลัก เจริญเติบโตและสร้างสปอร์ ผลิตสปอร์ชนิดทนร้อน และเสถียรที่อุณหภูมิสูงขึ้น สำหรับระยะเวลาในบางกรณี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงข้อได้เปรียบทางระบบนิเวศที่เหนือกว่าแบคทีเรียอื่นๆ ทำให้พวกมันง่ายต่อการปรับรูปแบบการเจริญเติบโตด้วยสภาวะที่เหมาะสมนี้ (Shivlatal, 2015)

### 2.11 คุณสมบัติลักษณะของ Thermophilic และ Thermotolerant actinobacteria

thermophilic และ thermotolerant ทั้งหมด ยกเว้น *Amycolatopsis*, *Rubrobacter*, *Ferrithrix*, *Acidothamus*, *Aciditerrimonas*, *Acidimicrobium* และ *Thermoleophilum* สร้างสปอร์ได้ ส่วนใหญ่จะเป็น non-acid fast ไม่เคลื่อนที่และใช้อากาศ ยกเว้นชนิด *Amycolatopsis* สามารถใช้อากาศและสามารถเจริญในสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศได้ ทั้งหมดเป็น Gram-positive ยกเว้น *Thermoleophilum* sp., *Ferrithrix* sp. และ *Saccharomonospora viridis* thermophilic actinobacteria ได้รับการตรวจสอบหลังจากมี polyphasic taxonomy ส่วนประกอบของผนังเซลล์ (peptidoglycan) เป็นองค์ประกอบหลักของ ก า ร จั ด จั า แ น ก จี นั ส ที่ เ ฉ พ า ะ เจาจจ (Shivlatal, 2015) ผนังเซลล์ของแอคติโนไมซีทประกอบด้วย diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งมี 2 ไอโซเมอร์ คือ LL-DAP และ meso-DAP (ลลิตา, 2554) โดยแบ่งออกเป็น 4 ประเภทใหญ่ คือ type-I [LL-DAP (diaminopimelic acid)], type-II [amino acid (meso-DAP และ glycine)], และ น้ำตาล arabinose และ xylose, type-III (meso-DAP มีหรือไม่มี madyrose) (ยวดี, 2546) thermophilic actinobacteria ส่วนใหญ่มีผนังเซลล์เป็น type-III ส่วนใหญ่ *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* และ *Amycolatopsis* มีผนังเซลล์ type-IV มีเพียงสายพันธุ์ *Streptomyces* สกุลเดียวเท่านั้นที่มีผนังเซลล์เป็น type-I (Shivlatal, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.12 การแยกแอกติโนมัยซีทจากดิน

แอกติโนมัยซีท จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่ได้มีการสำรวจและศึกษาเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสกุล *Streptomyces* จัดเป็นแอกติโนมัยซีททั่วไป (Common actinomycete) ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด จึงได้รับความสนใจในการศึกษาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ แต่ในปัจจุบันพบว่าแอกติโนมัยซีทหายาก (Rare actinomycete) เป็นกลุ่มเชื้อที่น่าสนใจอีกกลุ่ม เนื่องจากสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลายอีกทั้งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่กว้าง แต่เชื้อชนิดนี้เจริญเติบโตยากและช้า (จิตติ, 2557) ดังนั้นการแยกเชื้อเฉพาะกลุ่มจะมีความแตกต่างกันของวิธีการและส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง เช่น การคัดแยกเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นแอกติโนมัยซีทที่สามารถใช้อาหารได้หลายชนิด ควรจะต้องมี โคติน แป้ง กลีเซอรอล อาร์จินิน แอสปาราจिन เคซีน และไนโตรเจนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อการเจริญ และจะต้องมีการเติมสารแอนติไบโอติกในอาหารเพื่อฆ่าเชื้อราในความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัมต่อลิตร เช่น cycloheximide หรือ nystatin และควรบ่มจานเพาะเลี้ยงไว้นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทหายาก จะต้องมีการนวดดินตัวอย่างไปทำ pre-treatment ด้วยวิธีการต่างๆก่อนที่จะนวดดินนั้นมาทำการคัดแยก เพื่อเป็นการกำจัดแบคทีเรียและเชื้อราในดินออกบ้าง ขณะเดียวกันก็เป็นการลดจำนวนเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ไม่ต้องการลงและกระตุ้นการงอกของสปอร์แอกติโนมัยซีทที่อยู่ในระยะพักให้พร้อมที่จะเจริญขึ้น (กิ่งจันทร์, 2555)

### 2.12.1 ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงการแยกเชื้อ

#### 2.12.1.1 แหล่งอาศัยของเชื้อและการเก็บรักษา

แหล่งของตัวอย่างที่เก็บ ถือเป็นปัจจัยแรกสุดที่จะทำให้ได้เชื้อในกลุ่มที่ต้องการ ทั้งนี้การวิจัยต้องทราบข้อมูลการกระจายตัวของเชื้อที่ต้องการศึกษาบ้าง เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อนั้นๆ แอกติโนมัยซีทมีการกระจายตัวอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ทั้งดิน น้ำ ตะกอนใต้น้ำ ทะเล ทะเลทราย เนื้อเยื่อพืช สัตว์ มนุษย์ ตลอดจนของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม แต่มักพบในดินเป็นส่วนใหญ่ ประเภทของดินที่มักพบแอกติโนมัยซีทได้บ่อย คือ ดินร่วนที่อุดมไปด้วยสารประกอบอินทรีย์ เช่น ดินบริเวณที่มีการทับถมของซากพืช ปริมาณอินทรีย์วัตถุมีผลต่อปริมาณของแอกติโนมัยซีทมาก ดินที่มีปริมาณอินทรีย์วัตถุมากจะพบแอกติโนมัยซีทมาก (สายพิณ, 2547) แอกติโนมัยซีทกลุ่ม *Streptomyces* เชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีทหายากก็มักจะกระจายตัวอยู่ตามดินร่วนชื้นที่มีธาตุอาหารอุดมสมบูรณ์หรือดินในแหล่งเพาะปลูกที่อุดมไปด้วยฮิวมัสหรือดินที่เป็นกรดอ่อน (pH 5-6) ดังนั้นหากต้องการเก็บตัวอย่างดินเพื่อให้ได้เชื้อที่มีความหลากหลาย ควรเก็บตัวอย่างดินที่ในป่าธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีการถมของซากพืชซากสัตว์เป็นเวลานาน นอกจากนี้หลังเก็บตัวอย่างแล้วให้ทำการแยกเชื้อทันที หรือไม่ควรเก็บตัวอย่างดินที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส (จิตติ, 2557)

### 2.12.1.2 อาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อ

การเลือกใช้อาหารเพื่อทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ต้องการจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่ง โดยทั่วไปอาหารที่ใช้แยกแอกติโนมัยซีทนั้นมีมากมายหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อแต่ละกลุ่มและเป็นอาหารที่มีสารอาหารน้อย ทั้งนี้เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเจริญได้ไม่ดี อาหารที่เหมาะสมในการแยกแอกติโนมัยซีทที่นิยมใช้กันมาก คือ Humic acid-vitamins agar (HV) อาหารชนิดนี้อุดมไปด้วยกรดฮิวมิก (humic acid) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่อยู่ในฮิวมัส และมีสารอยู่ในกลุ่มวิตามิน บี ซึ่งเป็นสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ (จิตติ, 2557)

นอกจากนี้ยังมีอาหาร Soil extracts agar อาหาร Arginine-vitamins agar อ า ห า ร Zhang'Starch Soil Extract Agar (ZSSE) เป็นต้น จากงานวิจัยของ Jinhua Zhang พบว่า การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยใช้อาหาร Zhang'Starch Soil Extract Agar (ZSSE) นั้นมีการเจริญเติบโตของเชื้อแอกติโนมัยซีทมากที่สุด รองลงมาเป็นอาหาร Complex HV agar (Zhang, 2011)

### 2.12.1.3 สารปฏิชีวนะที่ใช้

สารปฏิชีวนะที่ใส่ลงไปในอาหารแยกเชื้อนั้นมีหน้าที่ช่วยกำจัดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกไป เพื่อเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อได้ดีขึ้น เนื่องจากแอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เจริญเติบโตช้า ดังนั้นสารปฏิชีวนะที่นิยมใส่ในอาหารมักเป็นสารที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ เช่น นิสเตติน (nystatin) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไซโคเฮกซิไมด์ (cycloheximide) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย มีรายงานการใช้เพนิซิลิน จี (penicillin G) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโพลีมิกซิน บี (polymyxin B) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือการใช้ไตรเมโทพริม (tyimethoprim) 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (จิตติ, 2557)

นอกจากนี้ยังมีการใช้สารปฏิชีวนะในการคัดแยกแอกติโนมัยซีทที่หายากเฉพาะกลุ่มได้ เช่นการใช้ novobiocin สามารถช่วยเพิ่มจำนวนของเชื้อสกุล *Micromonospora* ได้อย่างมีนัยสำคัญ การใช้gentamicin สำหรับใช้แยกเชื้อในกลุ่ม *Micromonospora* spp. มีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับคัดแยกเชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีทซึ่ง Hayakawa และ Nonomura และ Cho *et al.* ได้เลือก macromolecules เช่น casein, chitin, และกรดฮิวมิกเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทหายาก (Subramani, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารปฏิชีวนะที่ควรใช้ คือ สารปฏิชีวนะในกลุ่มยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น นิสเตติน และไซโคเฮกซิไมด์ ก็เพียงพอแล้ว และควรหลีกเลี่ยงการใช้สารปฏิชีวนะทุนิครามัยซิน เนื่องจากเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของแอคติโนมัยซีทบางสกุล เช่น *Microbispora* ได้ สำหรับกรดนาลิดิซิก เป็นสารปฏิชีวนะชนิดหนึ่งที่ยิยมใส่ในอาหารแยกแอคติโนมัยซีท สารนี้เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มควิโนโลน (quinolone) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (ส่งผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบได้มากกว่า) หากใช้ความเข้มข้นมากเกินไปอาจส่งผลต่อการเจริญของทั้งเชื้อแอคติโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยวและเส้นสารบางชนิดได้ ดังนั้นหากจำเป็นต้องใส่ควรใช้ความเข้มข้นไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (จิตติ, 2557)

#### 2.12.1.4 สภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่เป็นพวกmesophile สามารถเจริญได้ดีที่ 25-40 องศาเซลเซียส บางส่วนเป็น thermophile เจริญได้ที่ 45 - 60 องศาเซลเซียส (Alexander, 1997) โดยทั่วไปแล้ว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 25-30 องศาเซลเซียส (รัตนภรณ์, 2548)

ความเป็นกรด-ด่างของดิน ในดินที่มีสภาพที่เป็นด่างจะมีค่า pH 6.5 - 8 ซึ่งมีจำนวนสูงถึง 95% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด จะพบแอคติโนแบคทีเรียมากกว่าดินที่มี pH เป็นด่างทั่วไป โดยจะพบประมาณ 10-70% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด (กิ่งจันทร์, 2546)

ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการคัดแยกเชื้ออยู่ที่ประมาณ 21 วัน แต่บางกลุ่มอาจใช้เวลา มากกว่า 30 วัน เพราะแอคติโนมัยซีทมีการเจริญที่ช้ากว่าแบคทีเรียและฟังไจ จึงทำให้ง่ายต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่างๆ (จิตติ, 2557)

#### 2.12.1.5 เทคนิคจำเพาะต่อการคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดิน

แอคติโนแบคทีเรียสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ทั้งดิน น้ำ เนื้อเยื่อพืช หรือแม้แต่ทะเลทราย ส่วนใหญ่มักพบในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีการทับถมของซากพืชซากสัตว์ โดยแอคติโนมัยซีทที่พบได้ง่าย คือ *Streptomyces* โดยกระจายตัวอยู่ในดินร่วนที่มีความอุดมสมบูรณ์ (Thawai *et al.*, 2011) เนื่องจากพบได้ง่ายจึงทำให้ยากต่อการคัดแยกแอคติโนมัยซีทสกุลอื่น ดังนั้นจำเป็นต้องใช้เทคนิคบำบัดตัวอย่างในการคัดแยก *Streptomyces* หรือเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการออก (Hayakawa, 2008) โดยใช้คุณสมบัติความทนทานที่แตกต่างกันของสปอร์ของแอคติโนมัยซีทในแต่ละสกุล วิธีการกำจัดจุลินทรีย์มีหลายวิธี ได้แก่ การให้ความร้อนแห้ง การใช้สารเคมี การใช้แรงหมุนเหวี่ยง การใช้เบคเทอริโอเฟจและการใช้เหยื่อล่อ เป็นต้น ที่สำคัญหลังจากเก็บตัวอย่างดินมาแล้ว ควรทำการแยกเชื้อทันที ไม่ควรเก็บดินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพราะไม่เหมาะสมต่อการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อและสปอร์ ควรทำการคัดแยกทันทีหรือภายใน 1-2 สัปดาห์หลังจากเก็บตัวอย่าง (Thawai et al., 2011)

## 2.13 ประโยชน์และโทษของแอกติโนมัยซีท

1. แอกติโนมัยซีทบางตัวสามารถผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ได้ เช่น แอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ถึง 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซีททั้งหมด (McCarthy and Williams, 1990)
2. เอนไซม์ที่แอกติโนมัยซีทสามารถผลิตได้มีหลายชนิด ได้แก่ xylanase, cellulose, amylase และ chitinase เป็นต้น
3. ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน โดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่ยากต่อการสลายโดยแบคทีเรียและฟังไจ (สายพิณ, 2547)
4. แอกติโนมัยซีทมีบทบาทสำคัญในการทำปุ๋ยหมัก โดยเฉพาะแอกติโนมัยซีทที่ชอบเจริญในอุณหภูมิสูงๆ เพราะเนื่องจากขบวนการหมักปุ๋ยหมักเกิดความร้อนทำให้อุณหภูมิในกองปุ๋ยสูงมาก (สายพิณ, 2547)
5. แอกติโนมัยซีทบางชนิดมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ เช่น *Frankia* เนื่องจากมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสตรึงไนโตรเจนแบบถ้อยที่ถ้อยอาศัยทำให้เกิดปมกับพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว ได้แก่ พืชพวก Casaurinaceae, Myricaceae, Betulaceae (สายพิณ, 2547)
6. แอกติโนมัยซีทบางชนิดก่อโรคในคน พืช และสัตว์ เช่น *Streptomyces imopomoeae* ทำให้เกิดโรค Sweet Potato Pox (สายพิณ, 2547)

### 2.13.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีท (Subramani, 2012)

ในช่วงศตวรรษที่ 20 มีการค้นพบ rare actinomycetes metabolite เพียงแค่ 5% เท่านั้น ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้สารยับยั้งทางชีวภาพที่ได้จากจากแอกติโนมัยซีทมากถึง 45% โดยเป็นสารชนิด secondary metabolite ส่วนใหญ่เป็นจีส Streptomyces 75% และอีก 25% เป็น rare actinomycetes นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มจีส *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* และ *Streptosporangium* spp. ยังมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น และมีบทบาทสำคัญในการผลิต wide spectrum antimicrobial metabolite และสารยับยั้งทางชีวภาพ

Rare actinomycetes เป็นสารประกอบที่มีความหลากหลายและซับซ้อนมาก แต่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างดีเยี่ยมอีกทั้งยังมีความเป็นพิษต่ำ สารที่เป็น antimicrobial ที่สกัดได้จากแอกติโนมัยซีท เมื่อจำแนกออกมาแล้วประกอบไปด้วย aminoglycosides, anthracyclines, glycopeptides, beta-lactams, macrolides, nucleosides, peptides, polyenes, polyesters, polyketides, *actinomycins* และ tetracyclines สารยับยั้งทางชีวภาพส่วนใหญ่เป็น extracellular metabolite โดยปกติแล้วจะปล่อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปทำยาปฏิชีวนะต่อไป แอกติโนมัยซีทยังผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพได้อีกหลายชนิด เช่น peptides/glycopeptides, angucyclinone, tetracyclines, phenazines, macrolides, anthraquinones, polyenes, anthracyclines,  $\beta$ -lactam, piercidins, octaketides, benzoxazolophenanthridines, heptadecaglycosides, lactones เป็นต้น (Centre for Drug Discovery and Conservation Institute of Applied Sciences, 2012) ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีท

| สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ   | แอกติโนมัยซีท                | กิจกรรมการยับยั้ง         | ที่มา                              |
|------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Chinikomycins          | <i>Streptomyces</i> sp.      | Anticancer                | Li <i>et al.</i> (2005)            |
| Chloro-dihydroquinones | Novel actinomycete           | Antibacterial; anticancer | Soria-Mercado <i>et al.</i> (2005) |
| Glaciapyrroles         | <i>Streptomyces</i> sp.      | Antibacterial             | Macherla <i>et al.</i> (2005)      |
| Frigocyclinone         | <i>Streptomyces griseus</i>  | Antibacterial             | Bruntner <i>et al.</i> (2005)      |
| Lajollamycin           | <i>Streptomyces nodosus</i>  | Antibacterial             | Manam <i>et al.</i> (2005)         |
| Mechercharmycins       | <i>Thermoactinomyces</i> sp. | Anticancer                | Kanoh <i>et al.</i> (2005)         |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ที่ผลิตโดยแอสโคไมซีตา (ต่อ)

| สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ      | แอสโคไมซีตา                  | กิจกรรมการยับยั้ง  | ที่มา  |
|---------------------------|------------------------------|--|--|
| Salinosporamide A         | <i>Salinispora tropica</i>   | Anticancer;<br>antimalarial                                  | Jensen <i>et al.</i><br>(2007) and Prudhomme<br><i>et al.</i> (2008) |
| Sporolide A               | <i>Salinispora tropica</i>   | Unknown  | Jensen <i>et al.</i> (2007)  |
| Salinosporamides<br>B & C | <i>Salinispora tropica</i>   | Cytotoxicity   | Williams <i>et al.</i> (2005)  |
| 2-Allyloxyphenol          | <i>Streptomyces</i> sp.      | Antimicrobial;<br>food<br>preservative;<br>oral disinfectant | Arumugam <i>et al.</i><br>(2009)                                     |
| Saliniketol               | <i>Salinispora arenicola</i> | Cancer<br>chemoprevention                                    | Jensen <i>et al.</i> (2007)  |
| Marinomycins A-D          | <i>Marinispora</i>           | Antimicrobial;<br>anticancer                                 | Kwon <i>et al.</i> (2006)  |
| Cyanosporaside A          | <i>Salinispora pacifica</i>  | Unknown  | Jensen <i>et al.</i> (2007)  |
| Lodopyridone              | <i>Saccharomonospora</i> sp. | Anticancer   | Maloney <i>et al.</i> (2009)   |
| Arenimycin                | <i>Salinispora arenicola</i> | Antibacterial;<br>anticancer                                 | Asolkar <i>et al.</i> (2010)   |
| Salinispyrone             | <i>Salinispora pacifica</i>  | Unknown  | Jensen <i>et al.</i> (2007)  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ที่ผลิตโดยแอสโคไมซีตา (ต่อ)

| สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ                        | แอสโคไมซีตา                                   | กิจกรรมการยับยั้ง             | ที่มา   |
|---|---|-------------------------------|---|
| Salinipyrones A & B                         | <i>Salinispora pacifica</i>                   | Mild cytotoxicity             | Oh <i>et al.</i> (2008)                                       |
| Pacificanones A & B                         | <i>Salinispora pacifica</i>                   | Antibacterial                 | Oh <i>et al.</i> (2008)                                       |
| Arenicolides A-C                            | <i>Salinispora arenicola</i>                  | Mild cytotoxicity             | Jensen <i>et al.</i> (2007) and Williams <i>et al.</i> (2007) |
| 1-hydroxy-1-norresistomycin                 | <i>Streptomyces chinaensis</i>                | Antibacterial; anticancer     | Gorajana <i>et al.</i> (2005) and Kock <i>et al.</i> (2005)   |
| Resistoflavin methyl ether                  | <i>Streptomyces</i> sp.                       | Antibacterial; anti-oxidative | Kock <i>et al.</i> (2005)                                     |
| Staurosporinone                             | <i>Streptomyces</i> sp.                       | Antitumor; phycotoxicity      | Wu <i>et al.</i> (2006)                                       |
| Sesquiterpene                               | <i>Streptomyces</i> sp.                       | Unknown                       | Wu <i>et al.</i> (2006)                                       |
| 1,8-Dihydroxy-2-ethyl-3-methylanthraquinone | <i>Streptomyces</i> sp.                       | Antitumor                     | Huang <i>et al.</i> (2006)                                    |
| Butenolides                                 | <i>Streptoverticillium luteoverticillatum</i> | Antitumor                     | Li <i>et al.</i> (2006)                                       |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีท (ต่อ)

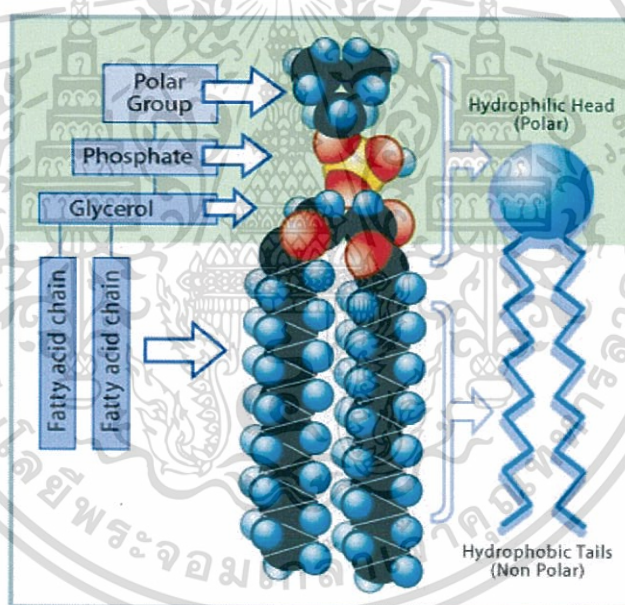
| สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ | แอกติโนมัยซีท            | กิจกรรมการยับยั้ง            | ที่มา                         |
|----------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Caboxamycin          | <i>Streptomyces</i> sp.  | Antibacterial;<br>anticancer | Hohmann <i>et al.</i> (2009)  |
| Daryamides           | <i>Streptomyces</i> sp.  | Antifungal;<br>anticancer    | Asolkar <i>et al.</i> (2006)  |
| Piericidins          | <i>Streptomyces</i> sp.  | Antitumor                    | Hayakawa <i>et al.</i> (2007) |
| Proximicins          | <i>Verrucosipora</i> sp. | Antibacterial;<br>anticancer | Fiedler <i>et al.</i> (2008)  |
| Streptokordin        | <i>Streptomyces</i> sp.  | Antitumor                    | Jeong <i>et al.</i> (2006)    |
| ZHD-0501             | <i>Actinomadura</i> sp.  | Anticancer                   | Han <i>et al.</i> (2005)      |
| Bisanthraquinone     | <i>Streptomyces</i> sp.  | Antibacterial                | Socha <i>et al.</i> (2006)    |
| Tirandamycins        | <i>Streptomyces</i> sp.  | Antibacterial                | Carlson <i>et al.</i> (2009)  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.14 โครงสร้างฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีทและแบคทีเรียทั่วไป

ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เป็นลิพิดที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตเอสเทอร์ พบเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งทำหน้าที่เลือกให้สารบางชนิดผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ พบมากในส่วนสมองและเส้นประสาท ฟอสโฟลิปิด 1 โมเลกุล เกิดจากการรวมตัวของกลีเซอรอล 1 โมเลกุล กรดไขมัน 2 โมเลกุล และหมู่ฟอสเฟตอีก 1 หมู่ สูตรทั่วไปของฟอสโฟลิปิดเป็นดังนี้ (พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา, 2549)

โมเลกุลของฟอสโฟลิปิด แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) หรือส่วนที่มีขั้ว คือส่วนที่เป็นหมู่ฟอสเฟต (ส่วนหัว) มีสมบัติละลายน้ำ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (non-polar tail) หรือส่วนที่ไม่มีขั้ว คือ ส่วนที่เป็นกรดไขมัน เป็นส่วนหางที่ไม่มีขั้ว (non-polar tail) ไม่ละลายน้ำ เมื่อฟอสโฟลิปิดอยู่ในน้ำหรือในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย อาจเกิดเป็นโครงสร้าง 2 ชั้น โดยมีส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนหันเข้าหากัน และส่วนที่มีขั้วหันเข้าหาโมเลกุลของน้ำ ถ้าฟอสโฟลิปิดมีโมเลกุลขนาดใหญ่ โครงสร้าง 2 ชั้นสามารถเชื่อมต่อกันเป็นวง (อรสา, 2559)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างทั่วไปของของฟอสโฟลิปิด

ที่มา: [http://119.46.166.126/self\\_all/selfaccess10/m4/biology4\\_2/lesson2/item15.php](http://119.46.166.126/self_all/selfaccess10/m4/biology4_2/lesson2/item15.php)

ฟอสโฟลิปิดเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อการเลือกผ่านของเนื้อเยื่อและรูปร่างของเนื้อเยื่อ ฟอสโฟลิปิดแสดงถึงลักษณะของแอมฟิพาทิก (amphipatic) เนื่องจากมีทั้งบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ และบริเวณที่ชอบน้ำในโมเลกุล นอกจากนี้ฟอสโฟลิปิด มีความสำคัญในการจำแนกแอกติโนมายซีทในระดับสกุล แบ่งเป็น 5 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 (ลลิตา, 2554)

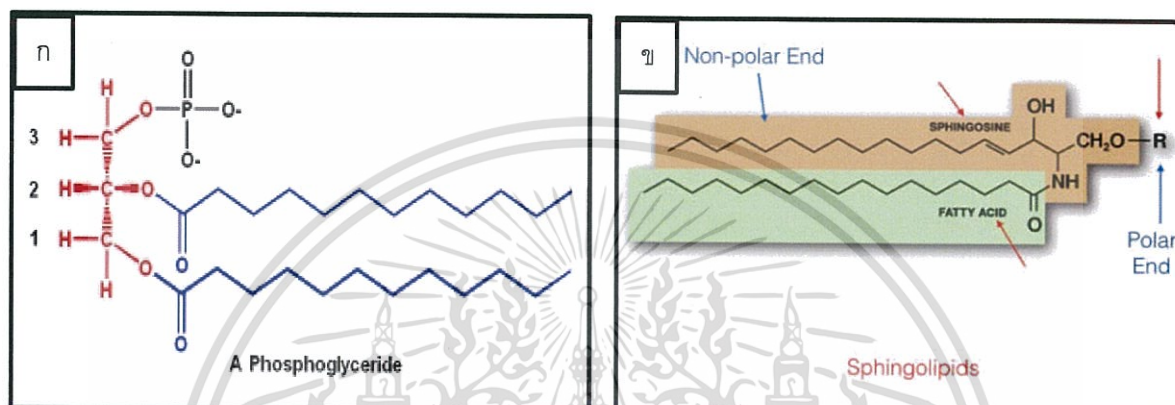
**ตารางที่ 2.2** แสดงชนิดของ Phospholipid ในแอกติโนมายซีท

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

หมายเหตุ v, variable; +, present; -, absent; PIM, phosphatidylinositolmannosides; PI, Phosphatidylinositol; PC, Phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PE, Phosphatidylethanolamine; PME, phosphatidylmethylethanolamine; GluNu, unknown glucosamine containing phospholipid; APG, acyl phosphatidylglycerol และ DPG, diphosphatidylglycerol

## 2.15 ชนิดของฟอสโฟลิปิด

ฟอสโฟลิปิด พบมากในเยื่อหุ้มเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามลักษณะโครงสร้าง phosphoglycerides มีโครงสร้างเป็น phosphate ester ประกอบไปด้วยหมู่กลีเซอรอล เป็นอนุพันธ์ของ phosphatidic acid และฟอสโฟลิปิดอีกชนิด คือ sphingolipid เป็นส่วนประกอบของ myelin ซึ่งเป็นสารห่อหุ้มใยประสาท (อรสา, 2559)



รูปที่ 2.11 โครงสร้าง phosphoglycerides (ก) และ sphingolipid (ข)

ที่มา: <http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture13/Lecture13.htm> (ก)

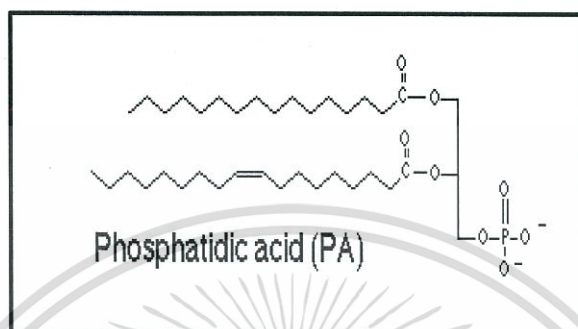
<http://oregonstate.edu/instruct/bb451/451material/OutlineMaterials/26LipidsMembranesOutline.html> (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟอสโฟลิปิด พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และแบ่งตามโครงสร้าง ได้แก่

## 2.1 Phosphatidic acid (PA)

จะถูกเปลี่ยนเป็น CDP-diacylglycerol หรือ diacylglycerol ซึ่งจะนำไปใช้ในการสร้าง glycerophospholipid ตัวอื่นๆ (ภาณดึกาญ, 2555)

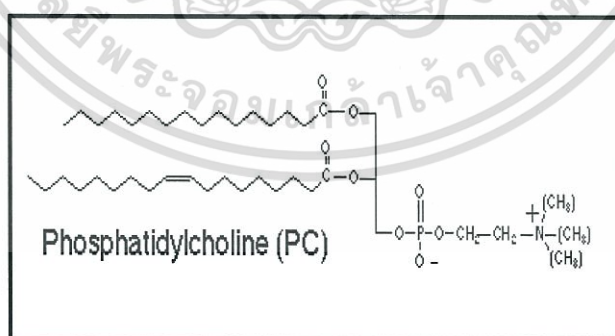


รูปที่ 2.12 โครงสร้างของ Phosphatidic acid

ที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1093/phospholipid>

## 2.2 Phosphatidylcholine (PC)

เป็นฟอสโฟลิปิดที่ประกอบด้วยฟอสเฟตเอสเทอร์ของไดกลีเซอไรด์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดโอเลอิก ปาล์มิติก และ/หรือสเตียริก และที่หมู่ฟอสเฟตจะเอสเทอร์ไฟด์กับโคลีน ทำให้โมเลกุลมีทั้งหมู่ที่มีขั้ว (โพลาร์) และหมู่ที่ไม่มีขั้ว (นอนโพลาร์) จึงทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟอิงเอเจนต์ในอาหารได้ เลซิทินเป็นองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนทั่วไป ถูกสังเคราะห์ได้ที่ตับ และพบอยู่ในอาหารหลายชนิด เช่น ถั่วเหลืองและไข่แดง (พิมพ์พิชญ และ นิธิยา, 2549)



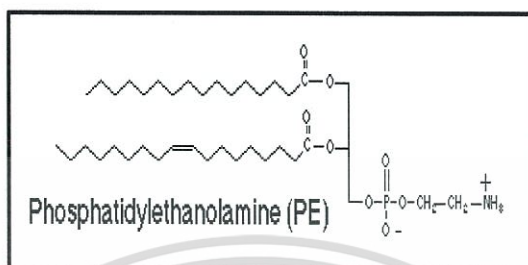
รูปที่ 2.13 โครงสร้างของ Phosphatidylcholine

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1093/phospholipid>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3 Phosphatidylethanolamine (PE)

Phosphatidylethanolamine หรือ เซฟาลิน ต่างจากเลซิทีน ตรงที่สารที่มาทำพันธะกับหมู่ฟอสเฟต เป็น ethanolamine เซฟาลินเป็นสารที่พบมากที่สุดในร่างกายโดยเฉพาะบริเวณศีรษะและเยื่อกระดูกสันหลัง มีหน้าที่สำคัญในขบวนการแข็งตัวของเลือด (จิตรเกษม และ ประสงค์, 2556)

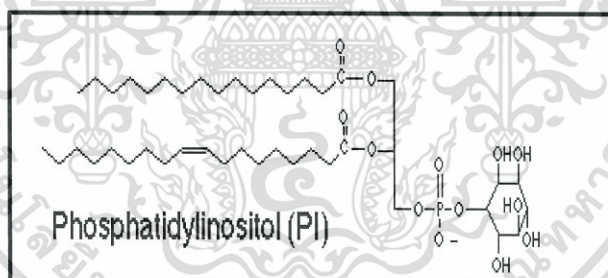


รูปที่ 2.14 โครงสร้างของ Phosphatidylethanolamine

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1093/phospholipid>

### 2.4 Phosphatidylinositol (PI)

เป็นฟอสโฟลิปิดที่พบได้ในทั้ง eukaryote และ prokaryote มีความสำคัญในการสร้างสาร prostaglandin หากขาดฟอสโฟลิปิดชนิดนี้จะทำให้ความจำสั้น ปลายประสาทเสื่อม (Wheeler *et al.*, 1970)



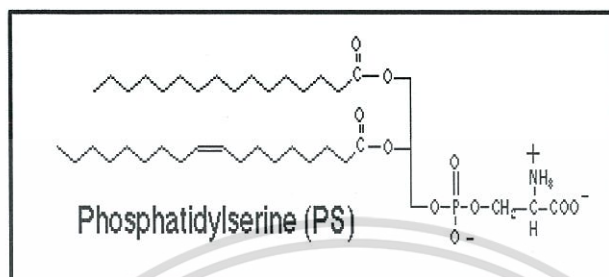
รูปที่ 2.15 โครงสร้างของ Phosphatidylinositol

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1093/phospholipid>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 Phosphatidylserine (PS)

จัดเป็น Phospholipid ที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างทางชีววิทยาของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช, สัตว์ และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น มีหน้าที่ห่อหุ้มและปกป้องเซลล์สมอง จัดเป็นศูนย์กลางของสารสื่อประสาทและการทำงานของสมอง (Pimpisut, 2559)

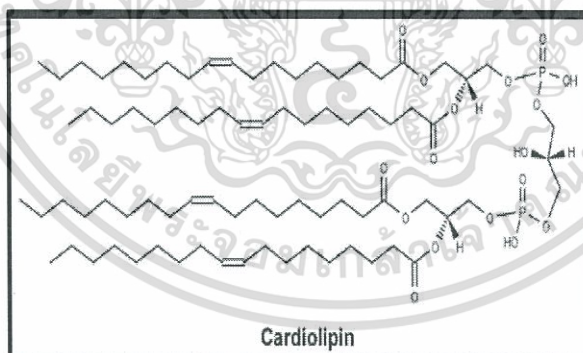


รูปที่ 2.16 โครงสร้างของ Phosphatidylserine

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1093/phospholipid>

## 2.6 Cardiolipin (CL)

ฟอสโฟลิปิดชนิดนี้พบได้มากในแอคติโนไมซีท เนื่องจากมีงานวิจัยพบว่า ฟอสโฟลิปิดชนิดนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการแตกแขนงกิ่งก้านสาขาของแอคติโนไมซีท หากแอคติโนไมซีทมีฟอสโฟลิปิดชนิดนี้มากก็จะสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้มากเช่นกัน (Sandoval-Calderon *et al.*, 2009)



รูปที่ 2.17 โครงสร้างของ Cardiolipin

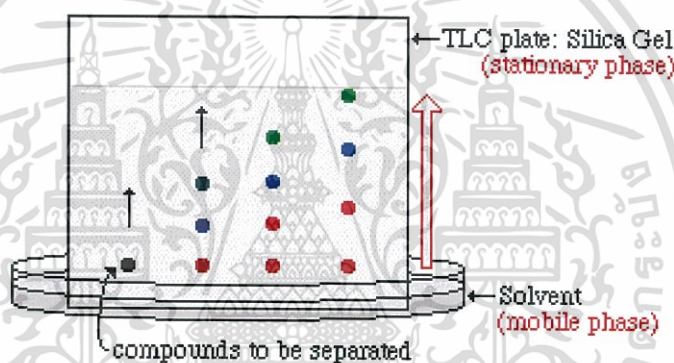
ที่มา : <https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-cardiolipin-1-3-Bis->

1\_fig1\_236085144

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.16 Thin layer chromatography

Thin layer chromatography (TLC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร เช่น ไขมัน (Lipid) โดยการใช้ตัวค้ำจุน หรือ supporting medium เป็นแผ่นกระจกที่ถูกเคลือบด้วยตัวดูดซับ หรือ Adsorbent เช่น ซิลิกาเจล ( $\text{SiO}_2$ ) และอะลูมินาเจล ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) โดยสารที่ต้องการนำมาแยกโดยวิธีนี้จะต้องมีคุณสมบัติการละลายในตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารแต่ละชนิดในตัวทำละลาย และความสามารถในการดูดซับที่มีต่อสารนั้น จึงทำให้การเคลื่อนที่ไปบนตัวค้ำจุนเกิดขึ้นด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน กล่าวคือ สารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดี และถูกดูดซับน้อยจะถูกเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดี จะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง ถ้าหากใช้ตัวดูดซับมากๆ จะสามารถแยกสารออกจากกันได้ดี (วิมลมาศ, 2555)



รูปที่ 2.18 แสดงส่วนประกอบของ Thin layer chromatography

ที่มา : <http://biotechniquesden.blogspot.com/2012/12/thin-layer-chromatography-tlc.html>

TLC เป็นแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกแข็ง (ขนาด 5 x 10 ซม<sup>2</sup> หรือ 5 x 20 ซม<sup>2</sup>) เคลือบด้วยตัวดูดซับเป็นชั้นบางๆ (หนาขนาด 0.25-0.3 มม.) ตัวดูดซับที่ใช้กับ TLC มีขนาด อนุภาคเล็กกว่าที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี ชนิดของตัวดูดซับที่ใช้ก็เช่นเดียวกับที่ใช้กับ คอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้แก่ ซิลิกาเจล อะลูมินา คีเซลกัวร์ (kieselguhr) และผงเซลลูโลส เป็นต้น ตัวดูดซับเหล่านี้มักมีสารเรืองแสงผสมอยู่ เพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยมอง ภายใต้แสง UV (วิมลมาศ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 กรวยแยก (Separatory funnel)
- 3.1.2 กระบอกตวง (Cylinder)
- 3.1.3 กระดาษกรอง whatman No.4 ขนาด 110 มิลลิเมตร
- 3.1.4 ขวดดูแรน (Schott Duran)
- 3.1.5 ขวดรูปชมพู่
- 3.1.6 ขวด vial
- 3.1.7 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 3.1.8 ซ้อนตักสาร
- 3.1.9 ครอบเปเปอร์ (Droper)
- 3.1.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.11 แท่งแก้วรูปตัวแอล
- 3.1.12 แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.13 บีกเกอร์ (Beaker)
- 3.1.14 ปิเปต (Pipette)
- 3.1.15 ไม้พันสำลี
- 3.1.16 ลูกยาง (Pipette bulb)
- 3.1.17 สไลด์และกระจกปิดสไลด์
- 3.1.18 หลอดทดลองพร้อมฝา
- 3.1.19 Autopipette
- 3.1.20 Centrifuge tube
- 3.1.21 Microcentrifuge tube
- 3.1.22 Forceps
- 3.1.23 Loop
- 3.1.24 Needle
- 3.1.25 Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Merck
- 3.1.26 Tips
- 3.1.27 TLC Tank
- 3.1.28 TLC Silica gel ขนาด 20x20 เซนติเมตร ยี่ห้อ Merck

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.1.29 Vernier calipers

**3.2 เครื่องมือ**

|        |   |  |
|--------|---|--|
| 3.2.1  | กล้องจุลทรรศน์                                | OLYMPUS รุ่น CH3, Japan                                |
| 3.2.2  | เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)      | OHAUS รุ่น STARTER 3000,<br>USA                        |
| 3.2.3  | เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) | N-BIOTEX รุ่น NB-205Q                                  |
| 3.2.4  | เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง                         | AND รุ่น GF-800, Japan                                 |
| 3.2.5  | เครื่องผสมสาร (Vortex)                        | Scientific Industries รุ่น<br>Vortex- Genie 2, 30VG56E |
| 3.2.6  | เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)               | Hermle รุ่น Z 326 K,<br>Germany                        |
| 3.2.7  | เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)      | HEIDOLPH, Germany                                      |
| 3.2.8  | เครื่องไมโครเวฟ                               | Sharp รุ่น R-250                                       |
| 3.2.9  | ตู้อบเชื้อ (Incubator)                        | BINDER รุ่น Control E2                                 |
| 3.2.10 | ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)               | TELSTAR รุ่น Bio-II-<br>Advance 4 THCHNOLOGY, Spain    |
| 3.2.11 | ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)                    | Memmert รุ่น UN110                                     |
| 3.1.12 | ตู้แช่เย็น                                    | Distar freezer&Refrigerator<br>รุ่น DR-082             |
| 3.2.13 | ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส                   | PANASONIC รุ่น SF-PC697,<br>Thailand                   |
| 3.2.14 | หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)              | TOMY รุ่น ES-315, Japan                                |
| 3.2.15 | อ่างควบคุมความร้อน (Water bath)               | Memmert  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 สารเคมี

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 3.3.1 แป้งที่ละลายน้ำได้   | บริษัท Srlchem          |
| 3.3.2 สารละลายเมทิลีนบลู   |                         |
| 3.3.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์  |                         |
| 3.3.4 สารละลายแกมไอโอดีน   |                         |
| 3.3.5 สารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine  |                         |
| 3.3.6 สารละลายมาตรฐาน Mcfarland No. 0.5  |                         |
| 3.3.7 ฐัน (Agar)   |                         |
| 3.3.8 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์  |                         |
| 3.3.9 Ammonium Sulfate<br>( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) MW 132.14g/mol                      | บริษัท Merck            |
| 3.3.10 Acetic acid<br>MW 88.11 g/mol   | บริษัท Merck            |
| 3.3.11 Casein  | บริษัท Fluka            |
| 3.3.12 Calcium Carbonate ( $\text{CaCO}_3$ )<br>MW 100.0869 g/mol                              | บริษัท Carlo erba       |
| 3.3.13 Chloroform<br>MW 60.05 g/mol  | บริษัท RCI Labscan      |
| 3.3.14 Dipotassium hydrogen phosphate<br>( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) MW 174.18 g/mol          | บริษัท Ajax<br>Finechem |
| 3.3.15 Distilled water   |                         |
| 3.3.16 Ethyl acetate<br>MW 88.11 g/mol   | บริษัท J.T. Baker       |
| 3.3.17 Ferrous heptahydrate<br>( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) MW 278.0146 g/mol | บริษัท Fluka            |
| 3.3.18 Fructose<br>MW 180.16 g/mol   | บริษัท Ajax<br>Finechem |
| 3.3.19 Glucose<br>MW 180.156 g/mol   | บริษัท Fluka            |
| 3.3.20 Gelatin   |                         |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

|   |                    |
|---|--------------------|
| 3.3.21 Glycerol   | บริษัท Srlchem     |
| MW 92.09 g/mol  |                    |
| 3.3.22 Malt extract                                       | บริษัท Himedia     |
| 3.3.23 Manganese (II) chloride tetrahydrate               | บริษัท Ajax        |
| (MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O) MW 197.90 g/mol   | Finechem           |
| 3.3.24 Magnesium sulfate heptahydrate                     | บริษัท Ajax        |
| (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O) MW 246.4746 g/mol | Finechem           |
| 3.3.25 Manitol  | บริษัท Ajax        |
| MW 182.172 g/mol  | Finechem           |
| 3.3.26 Methanol   | บริษัท Ajax        |
| MW 32.04 g/mol  | Finechem           |
| 3.3.27 Meat extracts                                      | บริษัท Himedia     |
| 3.3.28 Molybdenum blue spray reagent                      | บริษัท Sigma       |
| 3.3.29 Nystatin   |                    |
| 3.3.30 Nalidixic acid                                     |                    |
| 3.3.31 Potassium nitrate (KNO <sub>3</sub> )              | บริษัท Fluka       |
| MW 101.11 g/mol   |                    |
| 3.3.32 Peptone  | บริษัท Srlchem     |
| 3.3.33 Phenol red   | บริษัท Merck       |
| 3.3.34 Sodium Chloride (NaCl)                             | บริษัท Ajax        |
| MW 58.44 g/mol  | Finechem           |
| 3.3.35 Skim milk powder                                   | บริษัท Himedia     |
| 3.3.36 Sucrose  | บริษัท Ajax        |
| MW 342.3 g/mol  | Finechem           |
| 3.3.37 Tween 80   | บริษัท Lobal Chmie |
| MW 1227.72 g/mol  |                    |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.38 Xylose  
MW 150.13 g/mol  
บริษัท Sigma
- 3.3.39 Yeast extract  
บริษัท JT group
- 3.3.40 Zinc sulfate heptahydrate  
(ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O) MW 287.54 g/mol  
บริษัท Fluka

### 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

- 3.4.1 Mueller-Hinton agar  
บริษัท Himedia
- 3.4.1 Sabouraud's dextrose agar  
บริษัท Srlchem

### 3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

- 3.5.1 *Escherichia coli* ATCC 074
- 3.5.2 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370
- 3.5.3 *Bacillus subtilis* ATCC 1248
- 3.5.4 *Micrococcus luteus* TISTR 2374
- 3.5.5 *Staphylococcus aureus* TISTR 746
- 3.5.6 *Candida albicans* ATCC 5239

### 3.6 การเก็บตัวอย่างดิน การแยกเชื้อและการคัดแยกเชื้อ

#### 3.6.1 การเก็บตัวอย่างดิน (Abussaud, 2013)

เลือกจุดเก็บตัวอย่างดินจากน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง (ภาคผนวก ค) กวาดเศษกิ่งไม้ บริเวณผิวหน้าดินออก จากนั้นทำการขุดดินลึกลงไป 2-3 เซนติเมตร ซึ่งดินน้ำพุร้อนที่ทำการเก็บตัวอย่างจะเก็บดินบริเวณที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับน้ำพุร้อนบริเวณนั้น โดยช้อนแ่งหรือช้อนปลูกขุดดินใส่ในถุงพลาสติกใสไม่รัดปากถุง ทำการวัดค่าความเป็นกรดต่างของดินด้วย pH meter โดยในหลุมดินที่ขุดถ้ามีน้ำเอ่อขึ้นมาให้ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีจึงทำการวัดพีเอชและอุณหภูมิ โดยทำการเก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มจำนวน 10 จุด แต่ละจุดเก็บตัวอย่างประมาณ 500 กรัม โดยบันทึกตำแหน่งจุดที่เก็บ วดภาพ และค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิที่วัดได้

#### 3.6.2 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

วิธีที่ 1 นำตัวอย่างดินข้อ 3.6.1 มาแยกเชื้อโดยนำตัวอย่างดินที่ยังขึ้นอยู่ 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.1% tween 80 ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยการต้มตัวอย่างด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (วาสิณี และคณะ, 2552, Jiang *et al.*, 2011) กำหนดเป็นระดับการเจือจางที่  $10^{-1}$  ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีให้ดินตกตะกอน จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีระดับความเจือจางจนถึง  $10^{-3}$  ด้วย 0.1% Basic Lauryl Sulfate โดยที่  $10^{-2}$  ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่  $10^{-3}$  ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  ตูตสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร Zhang' Starch Soil Extract Agar (ZSSE) (ภาคผนวก ก) (Zhang, 2011) ที่ pH 7.0 ซึ่งเติม nystatin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ซ้ำ แล้วบ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน และทำการเช็คผลการเจริญทุกสัปดาห์

วิธีที่ 2 นำตัวอย่างดินข้อ 3.6.1 มาแยกเชื้อโดยนำตัวอย่างดินที่เก็บมา เก็บรักษาในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำตัวอย่างดินมาผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง คลุมด้วยผ้าขาวบางจนตัวอย่างแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างดินที่แห้งแล้วมาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เต็มเพลท นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (กิ่งจันทร์, 2555, Jiang *et al.*, 2011) แล้วชั่งดินมา 1 กรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.1% tween 80 ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) กำหนดเป็นระดับการเจือจางที่

$10^{-1}$  ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีให้ดินตกตะกอน จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีระดับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเจือจางจนถึง  $10^{-3}$  ด้วย 0.1% Basic Lauryl Sulfate โดยที่  $10^{-2}$  ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่  $10^{-3}$  ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร Zhang' Starch Soil Extract Agar (ZSSE) (ภาคผนวก ก) (Zhang, 2011) ที่ pH 7.0 ซึ่งเติม nystatin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร จำนวน 2 ซ้ำ แล้วบ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน และทำการเช็คผลการเจริญทุกสัปดาห์

**3.6.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง** (Yang *et al.*, 2014, คณิงกานต์, 2559) (ภาคผนวก จ)

#### 3.6.3.1 การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินของความเจือจางที่  $10^{-1}$  ที่เหลืออยู่ลงในปิ๊กเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำปิ๊กเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของปิ๊กเกอร์อีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักปิ๊กเกอร์ก่อนและหลังอบ

#### 3.6.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา

นำตัวอย่างเชื้อในอาหารที่ได้จากข้อ 3.6.2 มาทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร Yeast extract malt extract agar (YEME) (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมแป้ง 10 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และไมโสยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มทีเก็บไว้สำหรับทำการทดลองในขั้นต่อไป และทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลต

**3.6.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ** ( Phongsopitanun *et al*, 2014)

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร YEME โดยวิธี Cross streak บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจสอบผลโดยการสังเกตการณ์เจริญเนื้อและสีของโคโลนี สีของโคโลนีด้านล่าง และรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน NBS/ISCC Colour System (ภาคผนวก ข)

### **3.6.6 การเตรียม spore suspension** (Klanbut, 2013)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทีที่เจริญเติบโตเต็มที่ทุกไอโซเลตบนอาหาร International *Streptomyces* Project Medium 2 (ISP2) หรือ YEME จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อขูดเอาสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารจนทั่ว แล้วจึงทำการเทลง centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เส้นใยสปอร์เกิดการแตกหักออกจากกัน จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีฆ่าเชื้อเพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับสปอร์ออก นำส่วนที่กรองถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรหลอดใหม่ 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

**3.7 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธี Slide culture technique** (คณิงกานต์, 2559)

เตรียม sterilized culture plates โดยทำการวางแผ่นกระดาษซับหรือกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ก้นจานแก้วเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวางแท่งแก้วรูปตัววี (ใช้แทนได้ด้วย cotton bud ที่ฆ่าเชื้อแล้ว) บนกระดาษซับ และวางแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วบน cotton bud ปิดฝาจานอาหาร เตรียม YEME agar plate ให้มีความหนาของวุ้นประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร ตัดวุ้นด้วยใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อให้ได้ก้อนวุ้นกว้างยาวด้านละ 1 เซนติเมตรเพื่อเตรียมนำไปเพาะเชื้อ

การ inoculate เชื้อ ใช้ใบมีดหรือเข็มเขี่ยตักก้อนวุ้นนำไปวางบนแผ่นสไลด์ที่อยู่ในจานแก้ว แล้วใช้ needle ปลายงอเขี่ยเชื้อจากหลอดทดลองนำไป inoculate ลงด้านข้างแต่ละด้านของก้อนวุ้นจนครบ 4 ด้าน คีบแผ่นกระดาษปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดลงบนก้อนวุ้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ประมาณ 5 มิลลิลิตร) ให้กระดาษซับมีความชื้นทั่วแผ่น หลังจากนั้นพันรอยต่อของปากจาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงให้รอบด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) เพื่อให้งานมีความชื้นป้องกันน้ำระเหย แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์ (1-2 อาทิตย์) ตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำสุด 40 เท่า

การทำ mount สไลด์ หลังจากตรวจพบว่ามีการสร้างสปอร์ของเชื้อแล้ว ให้ใช้คีมคีบยกแผ่นกระจกปิดสไลด์ออกจากก้อนวุ้นนำแผ่นกระจกวางบนกระดาษซับจากนั้นค่อยๆจิกก้อนวุ้นด้วยเข็มเขี่ยเชื้อออกวางบนแผ่นสไลด์เปล่า จะได้แผ่นกระจกปิดสไลด์และสไลด์ที่มีส่วนของเชื้อเจริญติดอยู่รวม 2 ชิ้น ค่อยๆ หยด 95 % แอลกอฮอล์ลงบนสไลด์และแผ่นกระจกปิดสไลด์จนทั่วบริเวณที่มีเชื้อ (ให้หยดตรงกลางของรอยก้อนวุ้นเพื่อไม่ให้เชื้อเสียรูปร่างการเรียงตัว) จะได้เชื้อติดแน่นกับแผ่นกระจกไม่เกิดฟองอากาศเมื่อนำไป mount เขี่ยเชื้อจากด้านข้างของวุ้นด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ มาแตะลงบนสไลด์แผ่นที่สาม หยดสี Lactophenol contton blue (LPC) หรือ methylene blue ลงบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่มีเชื้อ จะได้ slide culture แผ่นที่หนึ่ง หลังจากนั้นหยดสีอีก 1- 2 หยด ลงบนสไลด์ที่มีเชื้อแล้วปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่สะอาด จะได้ slide culture แผ่นที่สองและสาม นำสไลด์ทั้งสามแผ่นไปตรวจดูรูปร่างลักษณะสำคัญของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากต้องการเก็บเป็นสไลด์ถาวรให้ใช้กระดาษทิชชูชุบสีที่ล้นออกมารอข้ามคืน จนแห้งสนิทก่อนทาทับบอบแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บทั้งสองด้าน เพื่อป้องกันเสื่อมและเก็บสไลด์ไว้ได้นาน

### 3.8 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท (ภาคผนวก ง)

#### 3.8.1 การย่อยสลายโปรตีน (Peptonization) (นวลรัตน์, 2554)

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร Skim milk agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้น จะเกิดวงใสขึ้น (Clear zone) บันทึกผลเป็น

- เมื่อไม่เกิดการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar
- w เมื่อเกิดการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar เล็กน้อย
- + เมื่อเกิดการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar

### 3.8.2 การย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction) (ลลิตา, 2554)

ลงเชื้อเชื้อแอคติโนมัยซีท 1 ลูกเต็มในอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth 5 มล. ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง กลุ่มละ 2 ข้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้มาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้ามีการย่อยสลายเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาตินบันทึกผลเป็น

- เมื่อไม่เกิดการย่อยสลายเจลาตินในอาหาร Bouillon Gelatin Broth
- + เมื่อเกิดการย่อยสลายเจลาตินในอาหาร Bouillon Gelatin Broth

### 3.8.3 การย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction) (ลลิตา, 2554)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีททุกไอโซเลทใน Peptone KNO<sub>3</sub> broth ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง กลุ่มละ 2 ข้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิกลงไป 2 หยดและสารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine 3 หยด ถ้าเชื้อมีการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรต์ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดง บันทึกผลเป็น

- เมื่อไม่เกิดการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth
- w เมื่อเกิดการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth เล็กน้อย
- + เมื่อเกิดการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO<sub>3</sub> broth

### 3.8.4 การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis) (ลลิตา, 2554)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีททุกไอโซเลทโดยขีดลงบนอาหาร Inorganic salts-starch agar (ISP4) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเทราดด้วยสารละลายแอมโมเนียมไอโอดีนลงบนอาหารที่เพาะเชื้อไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคลนของเชื้อ แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเกิดสีน้ำเงินแทน บันทึกผลเป็น

- เมื่อไม่เกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar
- w เมื่อเกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar เล็กน้อย
- + เมื่อเกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar น้อย
- ++ เมื่อเกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar ปานกลาง
- +++ เมื่อเกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar มาก

### 3.8.5 ความสามารถในการผลิต H<sub>2</sub>S (Kishore, 2011)

ลงเชื้อแอสคิตโนมัยซีทในอาหาร Tryptone yeast extract agar slants บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการผลิต H<sub>2</sub>S จะเกิดสีดำขึ้น บันทึกผลเป็น

- เมื่อ ไม่เกิดการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหาร Tryptone-Yeast extract agar slant
- w เมื่อ เกิดการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหาร Tryptone-Yeast extract agar slant เล็กน้อย
- + เมื่อ เกิดการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหาร Tryptone-Yeast extract agar slant

### 3.8.6 การตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโตส ไซโลส และแมนนิทอล

เขี่ยเชื้อแอสคิตโนมัยซีทลงในอาหาร Phenol red glucose (or the other sugar) broth (pH 7.4) ที่ทำการใส่หลอดดัดแก๊ส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ตรวจสอบผลโดยการสังเกตสีของอาหารที่เปลี่ยนไป บันทึกผลเป็น

- + เมื่อเกิดการหมักน้ำตาล สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
- เมื่อไม่เกิดการหมักน้ำตาล
- w เมื่อเกิดการหมักน้ำตาลเพียงเล็กน้อย สารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม
- G เกิดการสร้างแก๊สในหลอดดัดแก๊ส

### 3.9 การศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง (ภาคผนวก จ)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอสคิตโนมัยซีทลงบนอาหาร YEME โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 -14 วัน บันทึกผลเป็น

- +++++ เมื่อเชื้อแอสคิตโนมัยซีทเจริญได้ดีที่สุด
- ++++ เมื่อเชื้อแอสคิตโนมัยซีทเจริญได้ดี
- +++ เมื่อเชื้อแอสคิตโนมัยซีทเจริญได้ปานกลาง
- ++ เมื่อเชื้อแอสคิตโนมัยซีทเจริญได้น้อย
- + เมื่อเชื้อแอสคิตโนมัยซีทเจริญได้น้อยมาก
- เมื่อเชื้อแอสคิตโนมัยซีทเจริญไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.10 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้นและการสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

#### 3.10.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น (Pre-test) (Pandey *et al.*, 2011)

เตรียมเชื้อแอคติโนมัยซีทเพื่อทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ ใช้ห้วงถ่ายเชื้อและเชื้อแอคติโนมัยซีทที่บริสุทธิ์แล้วลากเป็นเส้นตรงบนอาหาร glucose yeast extract agar (GYE) บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ใช้ห้วงถ่ายเชื้อและเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ แล้วลากให้ตั้งฉากกับเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร glucose yeast extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน สังเกตระยะห่างระหว่างแนวการเจริญของ แอคติโนมัยซีทกับเชื้อทดสอบที่เกิดขึ้น แล้วบันทึกผลการทดลองโดยวัดระยะห่างที่เกิดขึ้น (ภาคผนวก จ)

#### 3.10.2 การสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ (Phongsopitanun *et al.*, 2014)

เชื้อเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 1-3 ลูปลงในอาหาร Yeast extract – malt extract broth (YEME broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำมาถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในอาหาร YEME broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.1% บ่มในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

นำน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทและอาหารเหลวออกจากกัน จากนั้นนำน้ำหมักส่วนใสที่ปราศจากเส้นใยมาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ เอทิลอะซิเตท โดยทำการเติมเอทิลอะซิเตทลงไป ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ซึ่งในเฟสบนของเอทิลอะซิเตทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์จะแยกตัวออกจากเฟสของน้ำ จากนั้นนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนเซลล์ และเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองทำการล้างด้วยเมทานอลประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทและอาหารเหลวออกจากกัน จากนั้นนำไป

ระเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

### 3.10.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Anansiriwattana *et al.*, 2006)

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 074, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370, *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Candida albicans* ATCC 5239 (ภาคผนวก ข) ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน แมคฟาเรน หมายเลข 0.5 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml (ภาคผนวก ฉ)

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Mueller-Hinton agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และเลี้ยงยีสต์บนอาหาร Sabouraud's dextrose agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

### 3.10.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion (ธนภพ และคณะ, 2558)

ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ จุ่มลงในสารละลายแขวนลอยของเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว ทำการบิดให้แห้งพอหมาดๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้นทำการทาลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ (swab) ให้เชื้อทดสอบกระจายตัวอยู่บนอาหารอย่างสม่ำเสมอทั่วอาหาร ทั้งไว้ประมาณ 3-5 นาที เพื่อให้ส่วนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อดิสก์ (sterile disc) ยี่ห้อ Merck ขนาด 6 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบรอนแห้ง รวมทั้งหยดเมทานอลเป็น negative control และยาปฏิชีวนะ Kanamycin เป็น positive control ความเข้มข้น 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นวางลงบนอาหารที่ได้ทำการทาเชื้อเอาไว้แล้ว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สำหรับที่เป็นเชื้อทดสอบแบคทีเรีย ส่วนเชื้อทดสอบที่เป็นยีสต์ทำการบ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดสอบได้โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่มีการเจริญ โดยหน่วยที่วัดเป็นมิลลิเมตร

### 3.11 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (Klanbut, 2013)

#### 3.11.1 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ทำการคัดเลือกไว้บนอาหารแข็ง YEME เป็นเวลา 5-7 วัน ทำการขูดผิวเส้นใยที่หน้าโคลนของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยใบมีดที่ปราศจากเชื้อ (sterile blade) ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 100 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที เติมเมทานอล 200 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที และเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 80 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำการแยกเฟสโดยบีบเปิดเอาชั้นอินออร์แกนิกเฟสที่อยู่ข้างล่างถ่ายใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่และทำการระเหยแห้ง นำส่วนที่เหลือมาทำการ resuspension ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 6-10 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ออโต้ปีเปตดูดสารที่เข้ามาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาด 20 X 20 เซนติเมตร ยี่ห้อ Merck ครั้งละ 2 ไมโครลิตร โดยทำการจุดสารมาตรฐาน ได้แก่ L- $\alpha$  phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt from egg yolk lecithin (PG) 10 ไมโครลิตร, 3-sn phosphatidylethanolamine from bovine brain (PE) 20 ไมโครลิตร, cardiolipin sodium from bovine heart (CL) 20 ไมโครลิตร และสารตัวอย่าง 60 ไมโครลิตร จากนั้นนำแผ่น TLC ไปวางในภาชนะที่มีฝาปิด ซึ่งมีคลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:12:15:4 ปริมาตร/ปริมาตร ตามลำดับ บุแผ่นกระดาษที่ชุ่มด้วยสารละลายเป็นเวลา 30 นาที ปลอยทิ้งไว้ให้สารละลายพาตัวอย่างขึ้นมาจนประมาณ 3 ส่วน 4 ของความสูงของแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ออก ตั้งทิ้งไว้ให้แผ่น TLC แห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำแผ่นไปฉีดพ่นด้วย Molybdenum blue spray reagent จากนั้นทิ้งไว้จนเห็นจุด (spot) ของฟอสโฟลิปิดบนแผ่น TLC จากนั้นให้ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดต่างๆบนแผ่น TLC แล้วจึงวัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่ เพื่อใช้ในการคำนวณ หาค่า  $R_f$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

จากการเก็บตัวอย่างดินที่น้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง เพื่อนำมาทำการคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากดิน (วิธีการทดลองที่ 3.62, ภาคผนวก ค) ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินเป็นจำนวน 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เมื่อ 27 ธันวาคม 2560 และครั้งที่ 2 เมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2561 เป็นจำนวนทั้งหมด 10 จุด ได้ทำการคัดแยก 2 วิธีเป็นจำนวนทั้งสิ้น 33 ไอโซเลท โดยวิธีที่ 1 สามารถคัดแยกแอกติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลท แสดงในตารางที่ 4.1 และวิธีที่ 2 สามารถคัดแยกแอกติโนมัยซีทได้ 11 ไอโซเลท แสดงในตารางที่ 4.2

#### ตารางที่ 4.1 แสดงหมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินวิธีที่ 1

| จุดเก็บตัวอย่างดิน | อุณหภูมิ ณ จุดเก็บ | หมายเลขไอโซเลท   |
|--------------------|--------------------|--|
| 1                  | 49                 | -  |
| 2                  | 44                 | -  |
| 3                  | 61                 | JSL31111   |
| 4                  | 60                 | JSL41136   |
| 5                  | 54                 | JSL51112, JSL52129   |
| 6                  | 52                 | JSL61119 JSL61120 JSL61130                                       |
| 7                  | 45                 | -  |
| 8                  | 52                 | JSL81111, JSL82115 JSL82116, JSL82117, JSL82118, JSL82134        |
| 9                  | 53                 | JSL9215, JSL9216, JSL9217, JSL9219, JSL91123, JSL92131, JSL92135 |
| 10                 | 47                 | JSL10113, JSL10214   |

**หมายเหตุ :** ตัวอักษรแรก คือ ชื่อแหล่งของเก็บตัวอย่าง

ตัวเลขตัวแรก คือ จุดที่เก็บตัวอย่าง

ตัวเลขตัวที่สอง คือ ระดับความเจือจาง

ตัวเลขตัวที่สาม คือ วิธีที่ทำการ pretreatment

ตัวเลขตัวที่สี่ คือ ลำดับที่ทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงหมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินวิธีที่ 2

| จุดเก็บตัวอย่างดิน | อุณหภูมิ ณ จุดเก็บ | หมายเลขไอโซเลท   |
|--------------------|--------------------|--|
| 1                  | 52                 | -  |
| 2                  | 44                 | -  |
| 3                  | 45                 | JSL32210, JSL32212, JSL32213, JSL32214                     |
| 4                  | 41                 | -  |
| 5                  | 40                 | -  |
| 6                  | 47                 | -  |
| 7                  | 44.5               | -  |
| 8                  | 48                 | -  |
| 9                  | 52                 | JSL92228, JSL92221, JSL92222, JSL92227, JSL92228, JSL92232 |
| 10                 | 49.5               | JSL102226  |

**หมายเหตุ :** ตัวอักษรแรก คือ ชื่อแหล่งของเก็บตัวอย่าง  
 ตัวเลขตัวแรก คือ จุดที่เก็บตัวอย่าง  
 ตัวเลขตัวที่สอง คือ ระดับความเจือจาง  
 ตัวเลขตัวที่สาม คือ วิธีที่ทำการ pretreatment  
 ตัวเลขตัวที่สี่ คือ ลำดับที่ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้

## 4.2 การหาคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินจากน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง โดยครั้งที่ 1 เมื่อ 27 ธันวาคม 2560 และครั้งที่ 2 เมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2561 เป็นจำนวนทั้งหมด 10 จุด โคนทำการเก็บตัวอย่างดินครั้งละ 10 จุด นำมาหาคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่าง พบว่าปริมาณของน้ำหนักดิน ปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง (วิธีการทดลองที่ 3.6.3, ภาคผนวก จ) ได้ผลดังตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.3 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแอกติโนมัยซีท โดยวิธี ที่ 1

| ตัวอย่างดิน | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | อุณหภูมิ ณ จุดเก็บ (องศาเซลเซียส) | น้ำหนักดินที่ใช้ในการเจือจาง (กรัม) |
|-------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| จุดที่ 1    | 6.8                 | 49                                | 5.916                               |
| จุดที่ 2    | 7.4                 | 44                                | 5.289                               |
| จุดที่ 3    | 7.7                 | 61                                | 6.093                               |
| จุดที่ 4    | 7.7                 | 60                                | 6.040                               |
| จุดที่ 5    | 7.7                 | 54                                | 5.338                               |
| จุดที่ 6    | 7.8                 | 52                                | 6.094                               |
| จุดที่ 7    | 7.5                 | 45                                | 6.077                               |
| จุดที่ 8    | 7.8                 | 52                                | 6.069                               |
| จุดที่ 9    | 7.5                 | 53                                | 5.798                               |
| จุดที่ 10   | 7.8                 | 49                                | 5.897                               |

ตารางที่ 4.4 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินตัวอย่างที่ใช้ในการตัดแยกแอกติโนมัยซีท โดยวิธีที่ 2

| ตัวอย่างดิน | ค่าความเป็นกรด-ด่าง | อุณหภูมิ ณ จุดเก็บ (องศาเซลเซียส) | น้ำหนักดินที่ใช้ในการเจือจาง(กรัม) |
|-------------|---------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| จุดที่ 1    | 7.8                 | 52                                | 7.118                              |
| จุดที่ 2    | 7.0                 | 44                                | 7.498                              |
| จุดที่ 3    | 7.7                 | 45                                | 7.481                              |
| จุดที่ 4    | 7.4                 | 41                                | 7.459                              |
| จุดที่ 5    | 8.2                 | 40                                | 7.271                              |
| จุดที่ 6    | 7.7                 | 47                                | 7.433                              |
| จุดที่ 7    | 7.7                 | 44.5                              | 7.403                              |
| จุดที่ 8    | 7.5                 | 48                                | 7.479                              |
| จุดที่ 9    | 7.4                 | 52                                | 6.728                              |
| จุดที่ 10   | 7.8                 | 49.5                              | 6.975                              |

จากการตัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง พบว่าสามารถตัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 33 ไอโซเลท ได้ทำการตัดแยกเป็น 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 เป็นการตัดแยกโดยมีการทำการ pretreatment ตัวอย่างดินด้วยความร้อนขึ้นที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และวิธีที่ 2 เป็นการตัดแยกเชื้อโดยทำการ pretreatment ตัวอย่างดินด้วยความร้อนแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการทำการทดลองพบว่าวิธีที่ 1 นั้นสามารถตัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ 22 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 66.67 ของจำนวนไอโซเลททั้งหมด ส่วนวิธีที่ 2 นั้นสามารถตัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ 11 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 33.33 ของจำนวนไอโซเลททั้งหมด ซึ่งเห็นได้ว่าการ pretreatment ตัวอย่างดินด้วยความร้อนขึ้นนั้นมีจำนวนไอโซเลทมากกว่าการ pretreatment ตัวอย่างดินด้วยความร้อนแห้ง ซึ่งผลการทดลองนั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sateesh *et al.* (2011) ซึ่งได้ทำการตัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินป่าโกงกาง โดยทำการ pretreatment ตัวอย่างดินด้วยความร้อนขึ้นที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทำการ pretreatment ตัวอย่างดินด้วยความร้อนแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าการ pretreatment ตัวอย่างดินด้วยความร้อนขึ้นนั้นได้จำนวนเชื้อแอกติโนมัยซีทที่หายากจำนวน  $1.5 \times 10^5$  CFU/g และจำนวนเชื้อ *Streptomyces*  $1.6 \times 10^4$  CFU/g ส่วนการ pretreatment ตัวอย่างดินด้วยความร้อนแห้งนั้นได้จำนวนของเชื้อแอกติโนมัยซีทได้น้อยกว่า ซึ่งพบว่ามีเชื้อแอกติโนมัยซีทที่

หายากจำนวน  $2.4 \times 10^2$  CFU/g และจำนวนเชื้อ *Streptomyces*  $2.4 \times 10^3$  CFU/g ดังนั้นการ pretreatment ตัวอย่างดินด้วยความร้อนขึ้นที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

#### 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง

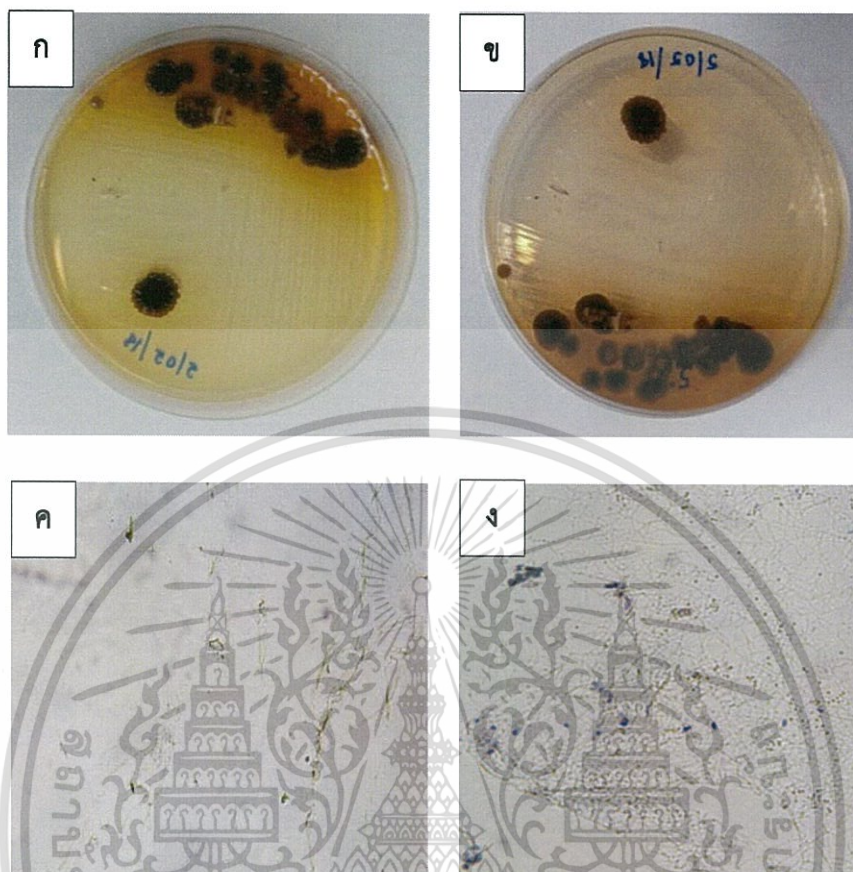
##### - เชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากวิธีที่ 1 และ 2 จำนวน 33 ไอโซเลท

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีท โดยสังเกตลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทเบื้องต้นจากเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) เส้นใยใต้อาหาร (substrate mycelium) รังควัตถุ และลักษณะของสปอร์ (วิธีการทดลองที่ 3.6.5) สามารถจัดกลุ่มเชื้อแอกติโนมัยซีทที่พบได้ 7 กลุ่มตามสีมาตรฐาน The NBS/ISCC Color system (ภาคผนวก ข) ดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มของแอสโคไมซีที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาล (Brown) ได้แก่



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL9215

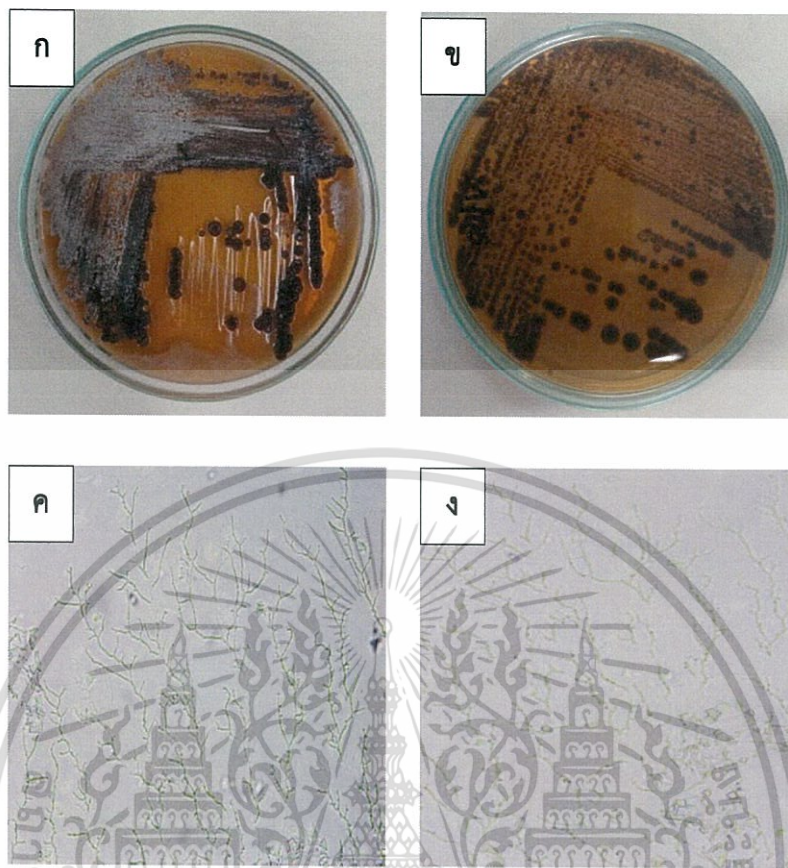
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL9215 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL9215 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL9215 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL9215 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL9215 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Dark Brown เส้นใยใต้อาหารสี Dark Yellowish Brown สร้างรงควัตถุสี Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสายสปอร์ตรง

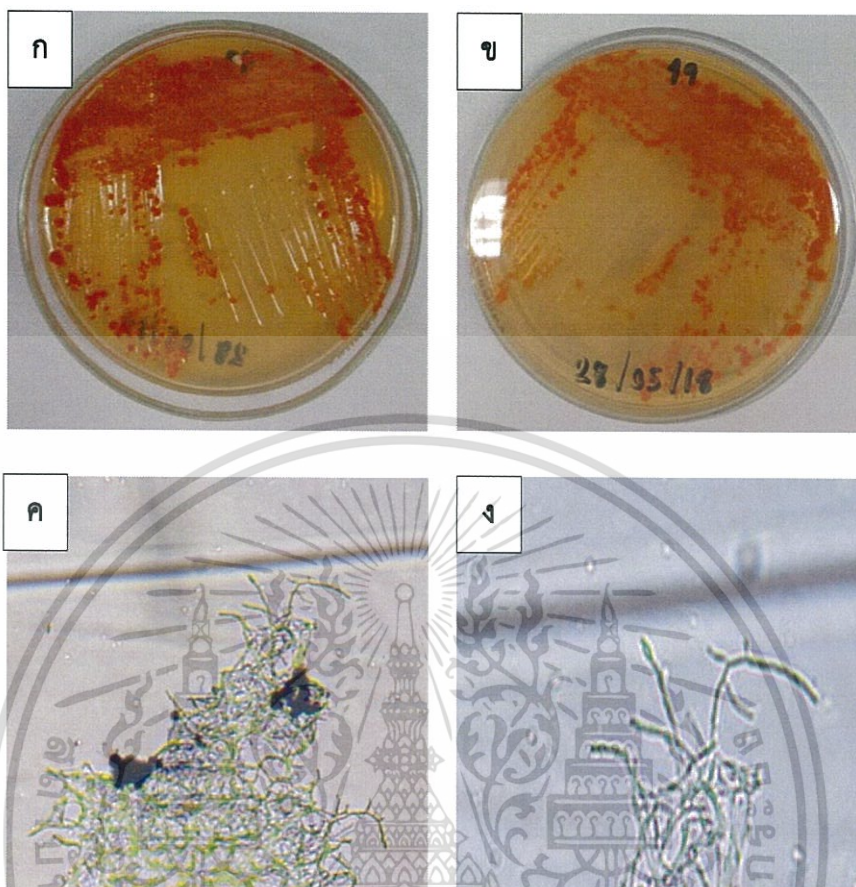


**รูปที่ 4.2** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลท JSL91123

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลท JSL91123 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลท JSL91123 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลท JSL91123 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลท JSL91123 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลท JSL91123 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Brown เส้นใยใต้อาหารสี Deep Brown สร้างรงควัตถุสี Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous

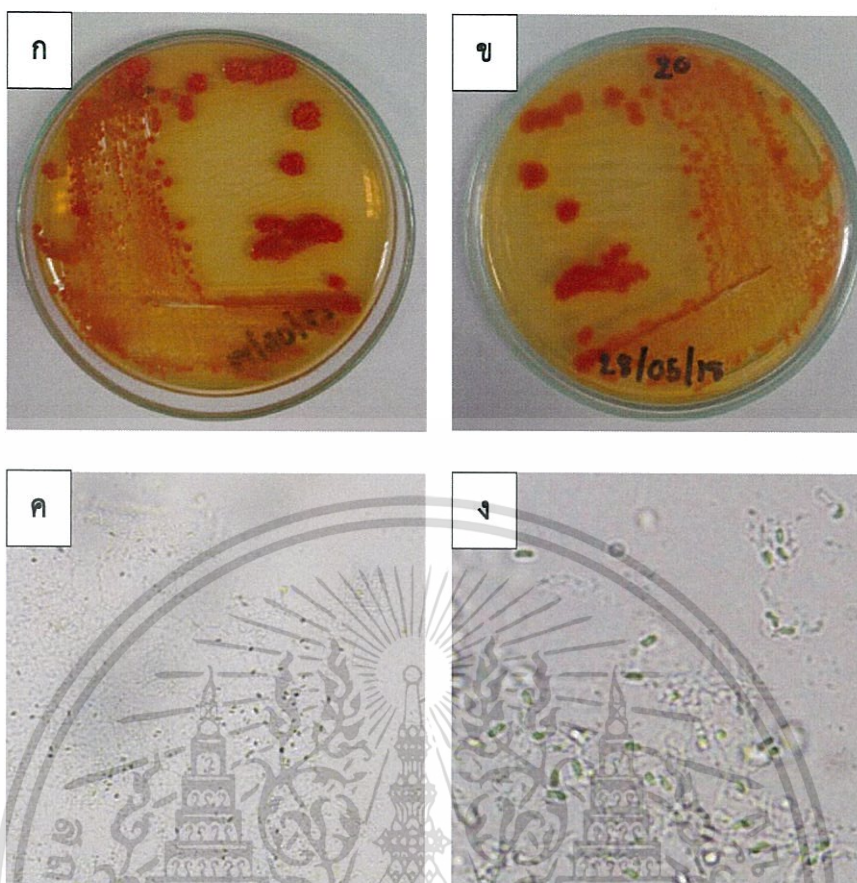
กลุ่มที่ 2 กลุ่มของแอสโคไมซีที่สร้างเส้นใยอากาศสีส้มเหลือง (Orange Yellow) ได้แก่



รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL61119

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL61119 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL61119 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL61119 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL61119 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL61119 ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศ แต่เส้นใยใต้อาหารมีสี Vivid Orange Yellow สร้างรงควัตถุสี Brilliant Yellow และมีลักษณะสปอร์เป็นสายแบบ Oligosporous



**รูปที่ 4.4** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL61120

(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL61120 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

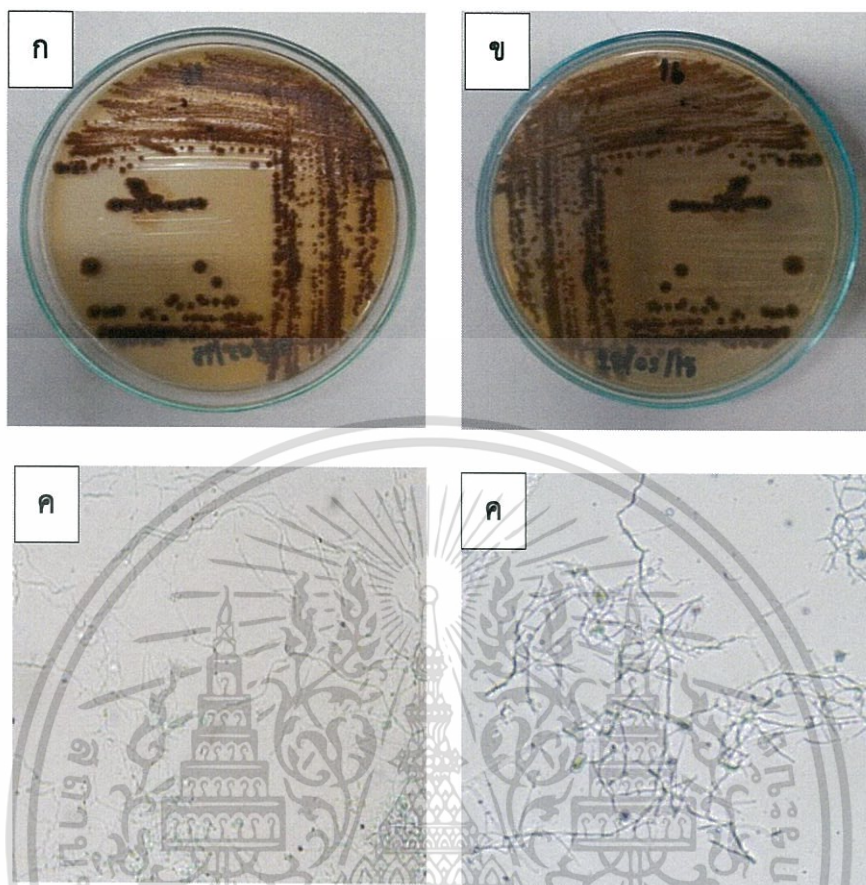
(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL61120 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL61120 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL61120 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL61120 ไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศ แต่เส้นใยได้อาหารมีสี Vivid Orange Yellow สร้างรงควัตถุสี Brilliant Yellow และมีลักษณะสปอร์เป็นสายแบบ Monosporous

### กลุ่มที่ 3 กลุ่มของแอสโคไมซีที่สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองน้ำตาล (Yellowish Brown)



**รูปที่ 4.5** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL82116

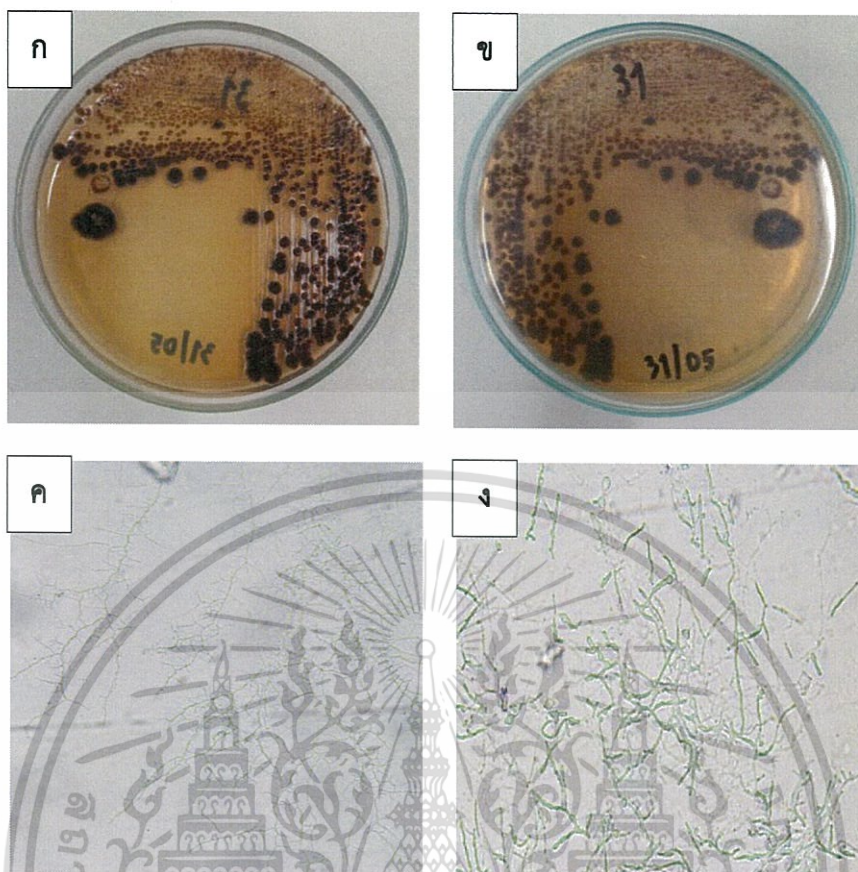
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL82116 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL82116 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL82116 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL82116 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL82116 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Dark Yellowish Brown เส้นใยใต้อาหารสี Dark Yellowish Brown สร้างรงควัตถุสี Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous



**รูปที่ 4.6** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัสไอโซเลต JSL92131

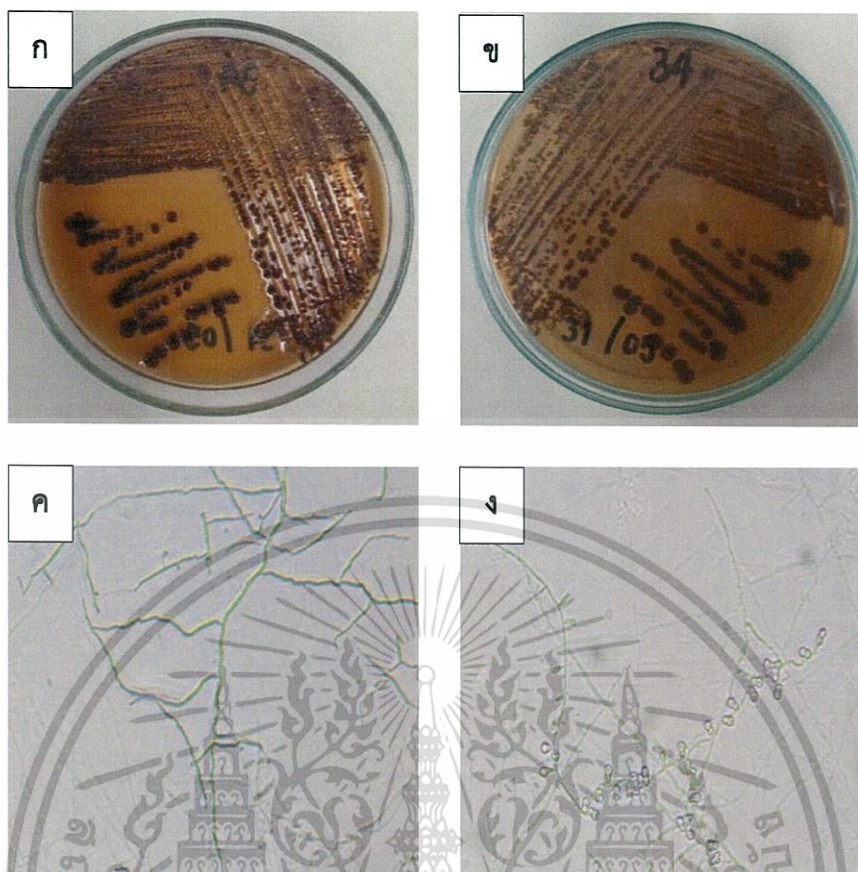
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัสไอโซเลต JSL92131 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัสไอโซเลต JSL92131 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัสไอโซเลต JSL92131 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัสไอโซเลต JSL92131 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัสไอโซเลต JSL92131 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Dark Yellowish Brown เส้นใยใต้อาหารสี Moderate Olive สร้างรงควัตถุสี Yellow และมีลักษณะสปอร์เป็นสาย Oligosporus



**รูปที่ 4.7** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอสเลท JSL82134

(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไอสเลท JSL82134 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

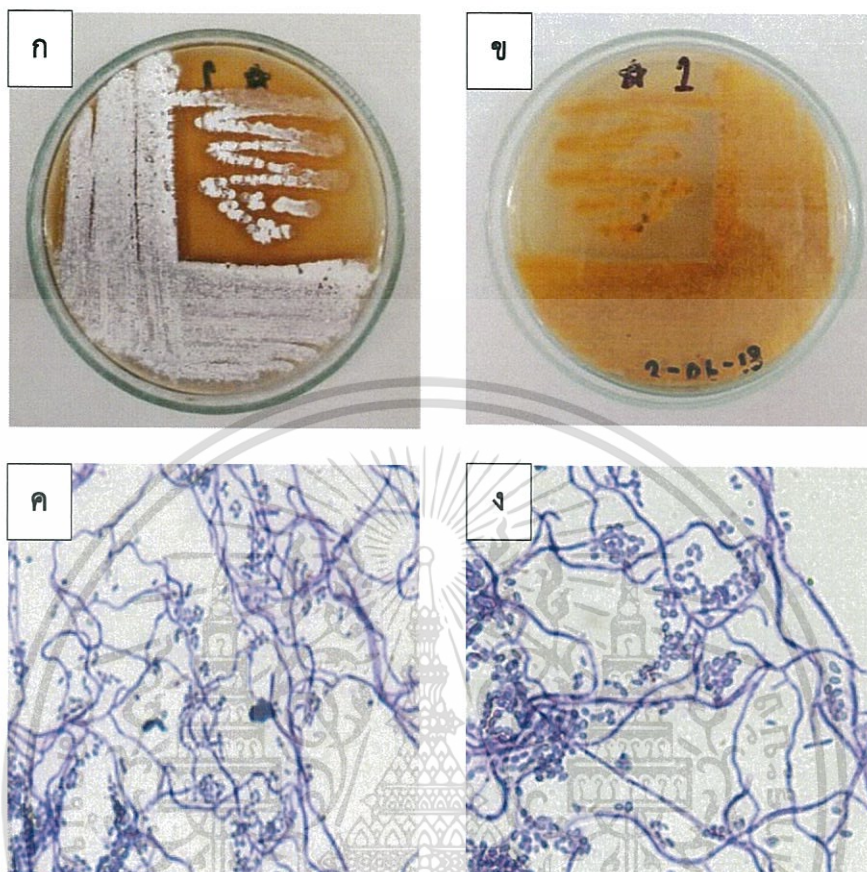
(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไอสเลท JSL82134 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอสเลท JSL82134 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอสเลท JSL82134 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไอสเลท JSL82134 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Dark Yellowish Brown เส้นใยใต้อาหารสี Dark Yellowish Brown สร้างรงควัตถุสี Orange Yellow และมีลักษณะสปอร์เป็นสายแบบ Bisporous

#### กลุ่มที่ 4 กลุ่มของแอสโคดิโนมัยซีที่สร้างเส้นใยอากาศสีเหลือง (Yellow) ได้แก่



**รูปที่ 4.8** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท JSL8111

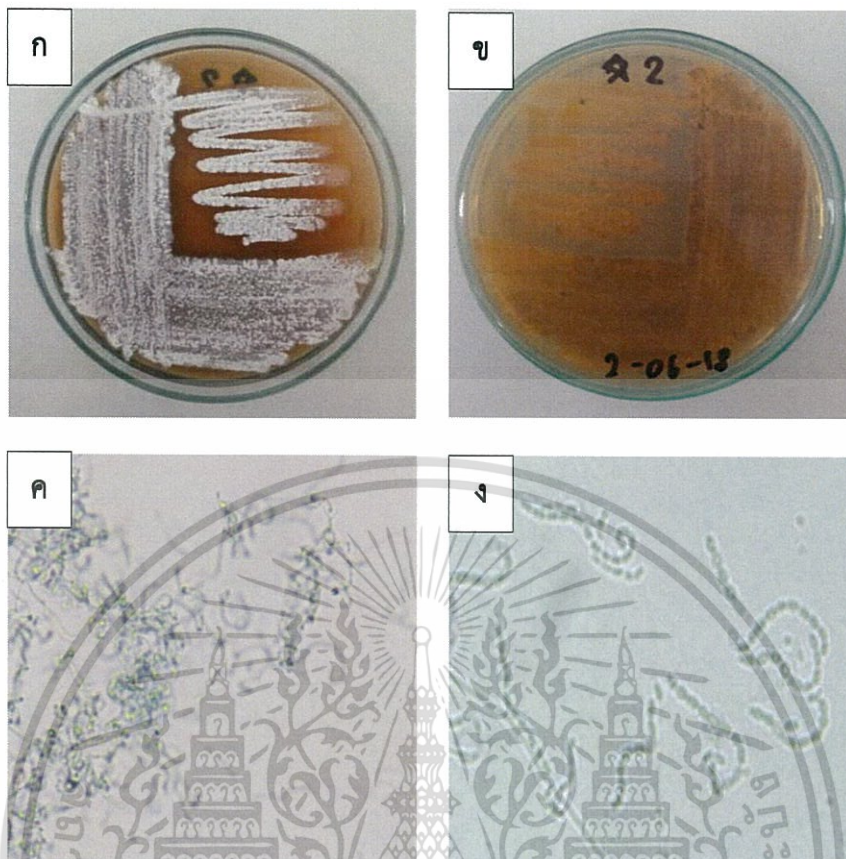
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท JSL8111 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท JSL8111 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท JSL8111 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท JSL8111 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสโคดิโนมัยซีทไอโซเลท JSL8111 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Gray เส้นใยใต้อาหารสี Dark Yellow สร้างรงควัตถุสี Brilliant Yellow Green และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous



**รูปที่ 4.9** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL5112

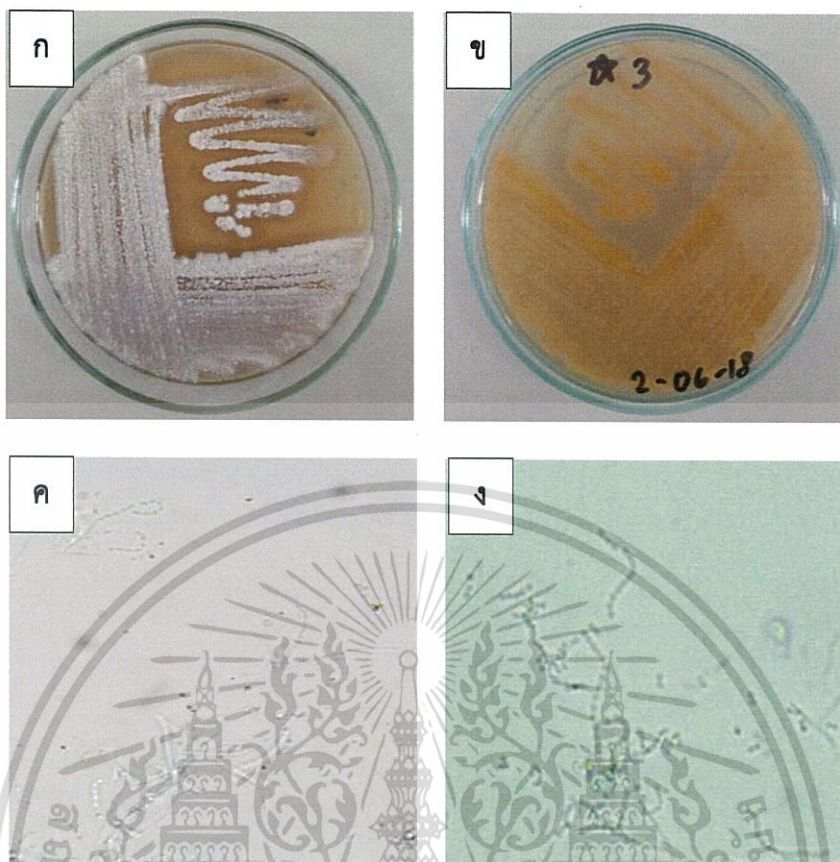
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL5112 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL5112 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL5112 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL5112 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

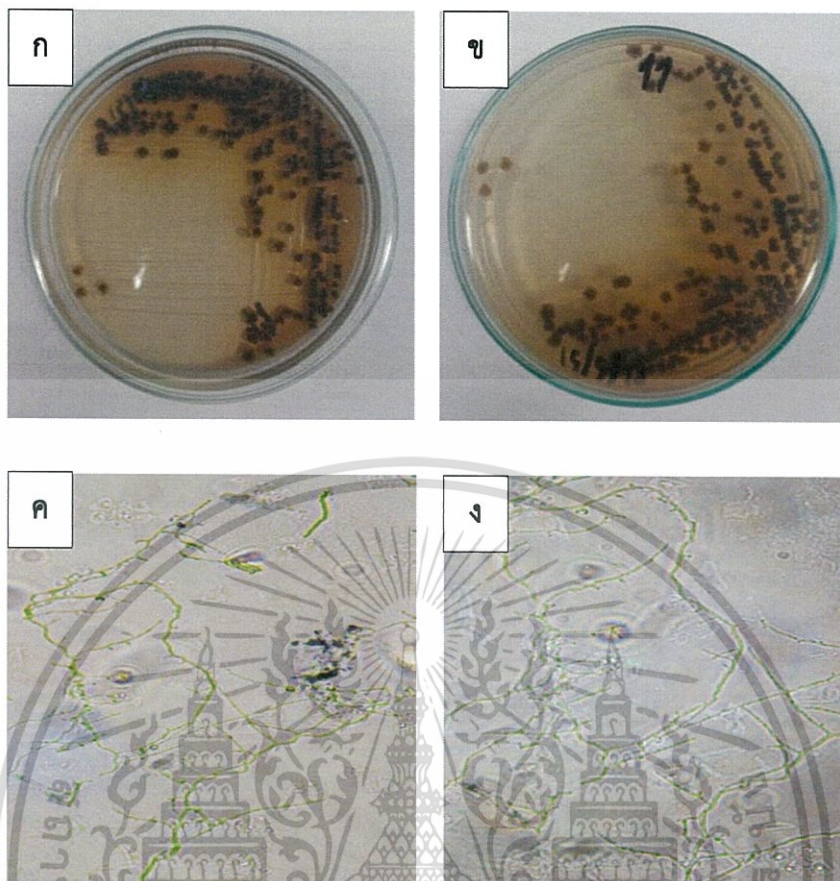
เชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL5112 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Gray เส้นใยใต้อาหารสี Deep Brown สร้างรงควัตถุสี Light Olive Brown และมีลักษณะเป็นสายสปอร์คล้ายขอ



**รูปที่ 4.10** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL10113

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL10113 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL10113 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL10113 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL10113 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL10113 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Gray เส้นใยใต้อาหารสี Dark Grayish Olive สร้างรงควัตถุสี Brilliant Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสายสปอร์คล้ายขอ

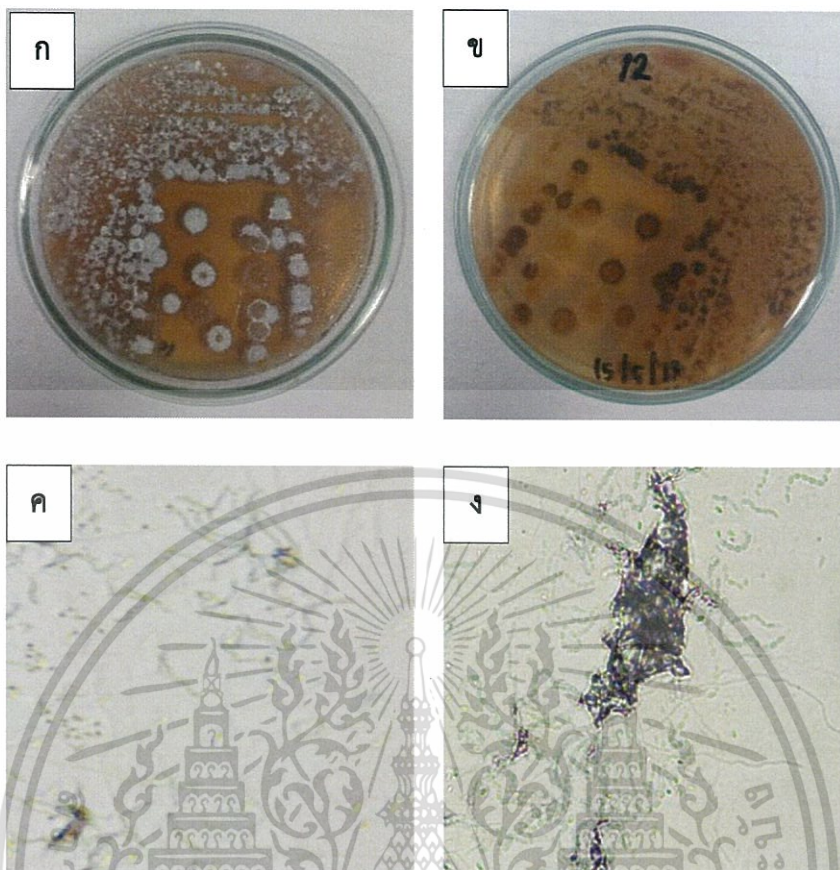


**รูปที่ 4.11** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Grayish Olive เส้นใยใต้อาหารสี Deep Yellow สร้างรงควัตถุสี Brilliant Moderate Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.12** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32212

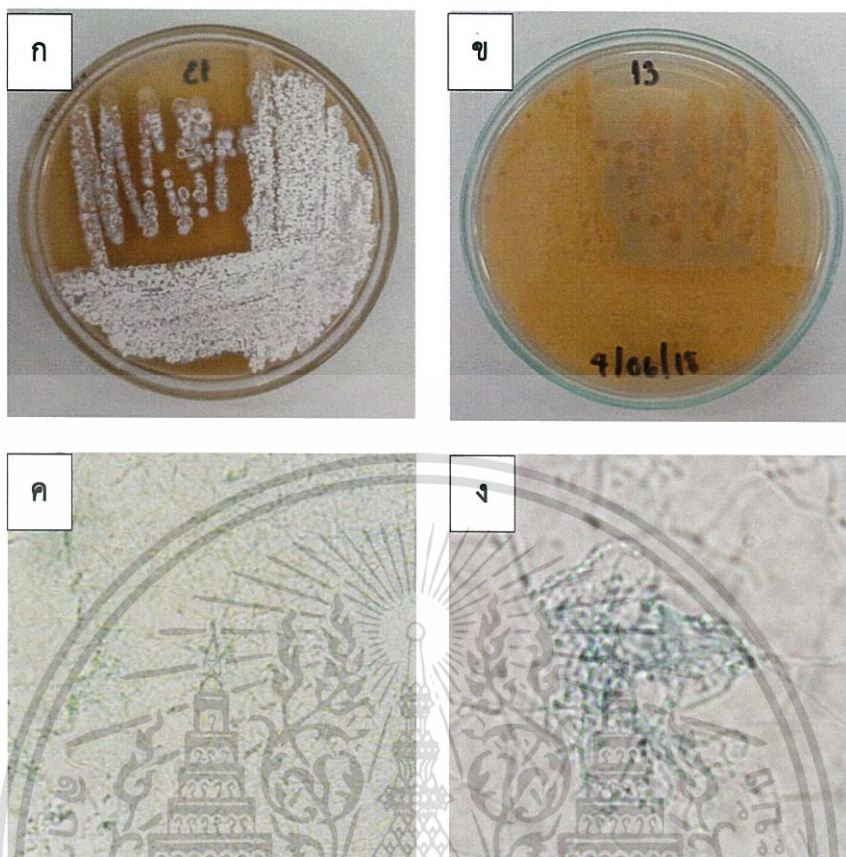
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32212 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32212 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32212 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32212 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

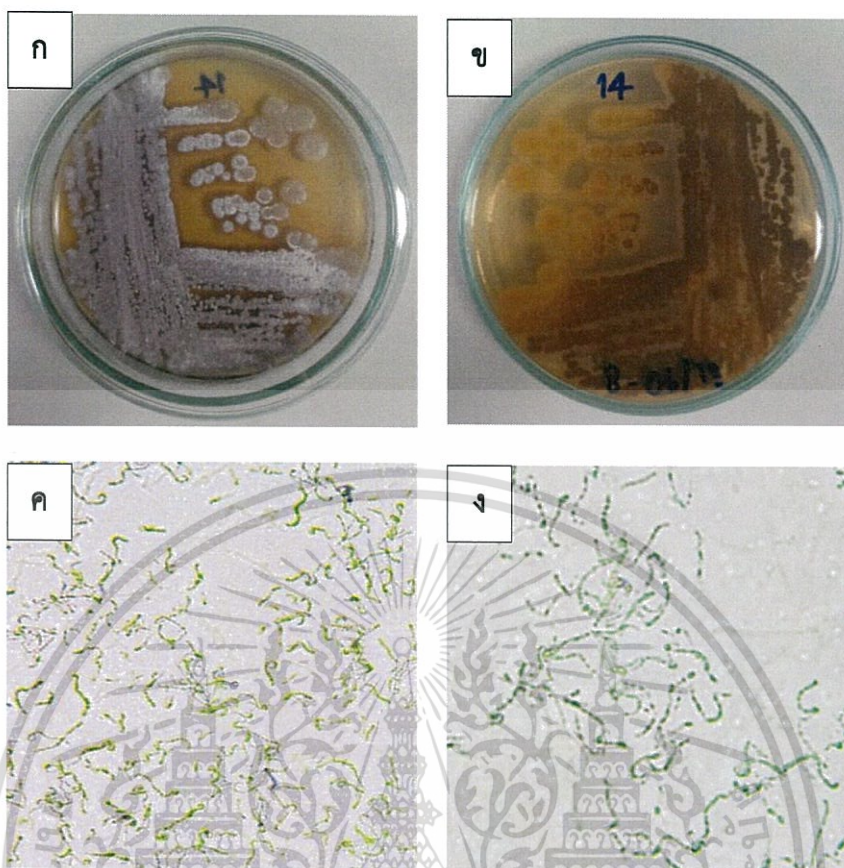
เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32212 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White เส้นใยใต้อาหารสี Strong Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสายสปอร์คล้ายขอ



**รูปที่ 4.13** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL32213

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL32213 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL32213 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL32213 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL32213 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL32213 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Pale Yellow เส้นใยได้ อาหารสี Strong Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสายสปอร์คล้าย ขอบ



**รูปที่ 4.14** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลต JSL32214

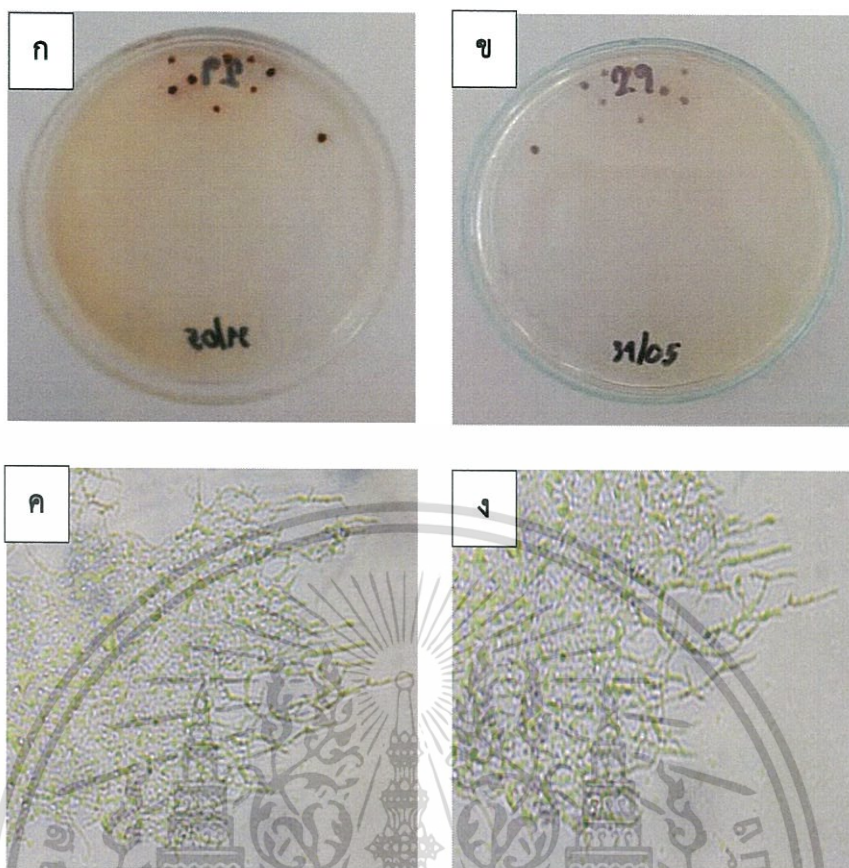
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลต JSL32214 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลต JSL32214 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลต JSL32214 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลต JSL32214 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอโซเลต JSL32214 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Gray เส้นใยใต้อาหารสี Moderate Olive สร้างรงควัตถุสี Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสายสปอร์คล้ายขอ



**รูปที่ 4.15** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสเลท JSL82129

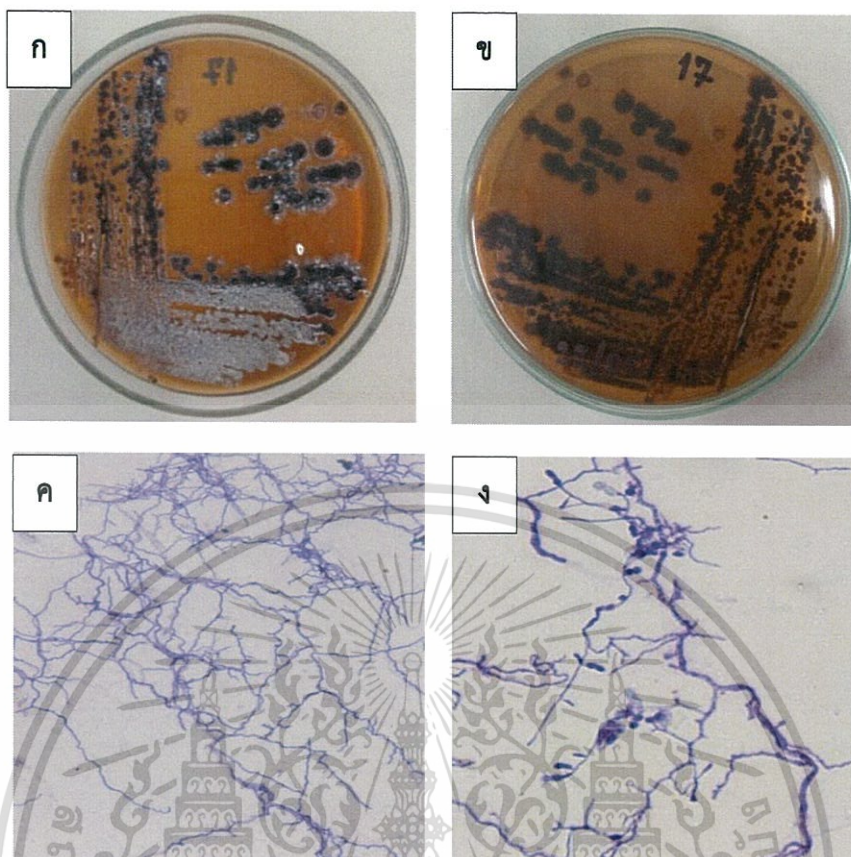
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสเลท JSL82129 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสเลท JSL82129 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสเลท JSL82129 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสเลท JSL82129 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสเลท JSL82129 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Grayish Olive เส้นใยใต้อาหารสี Dark Yellowish Brown สร้างรงควัตถุสี Strong Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous



**รูปที่ 4.16** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL82117

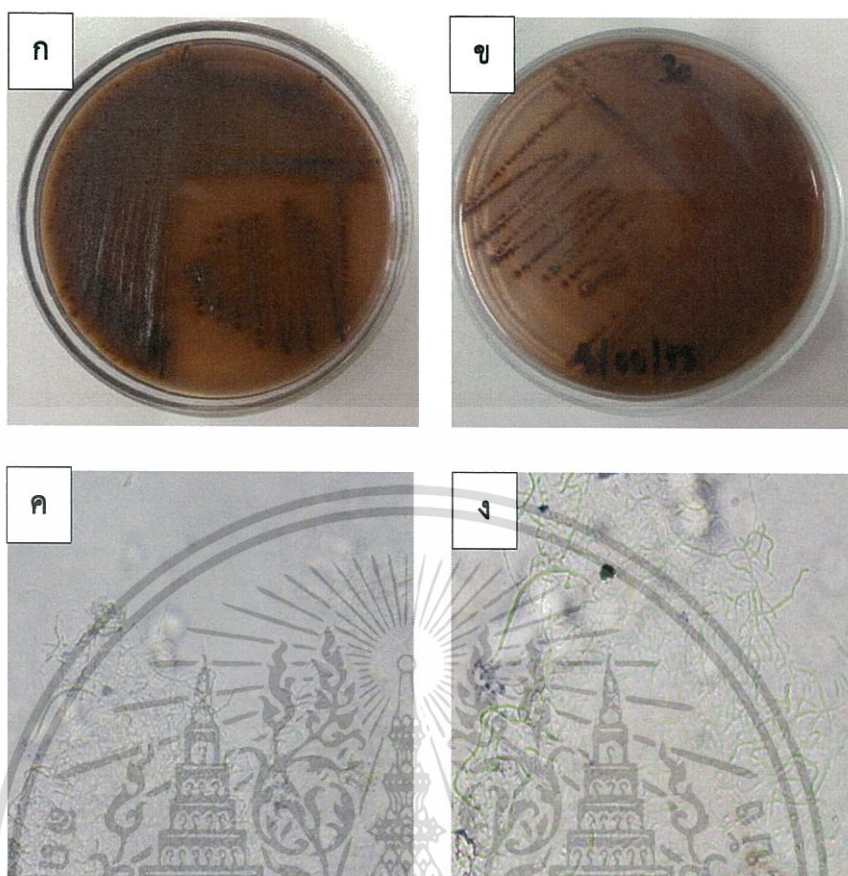
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL82117 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL82117 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL82117 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL82117 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลท JSL82117 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Dark Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Dark Yellowish Brown สร้างรงควัตถุสี Strong Greenish Yellow และมีลักษณะสปอร์เป็นสายแบบ Bisporus

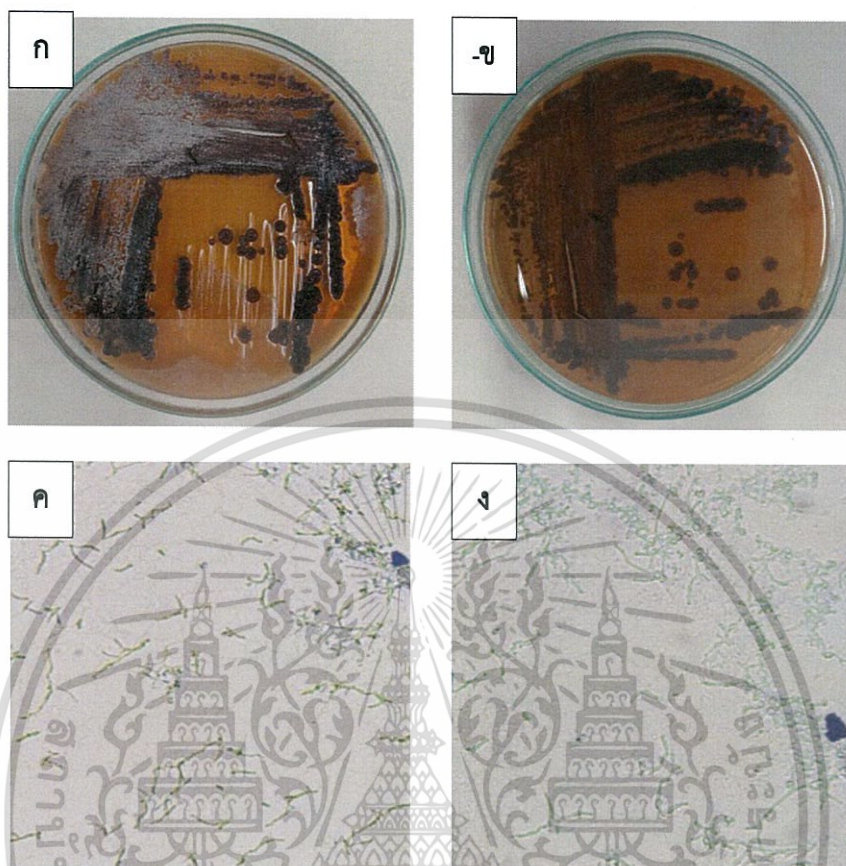


รูปที่ 4.17 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL61130

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL61130 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL61130 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL61130 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL61130 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสกีโตไมซีตไอโซเลท JSL61130 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Deep Yellow เส้นใยใต้อาหารสี Dark Yellow สร้างรงควัตถุสี Strong Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์สายตรง

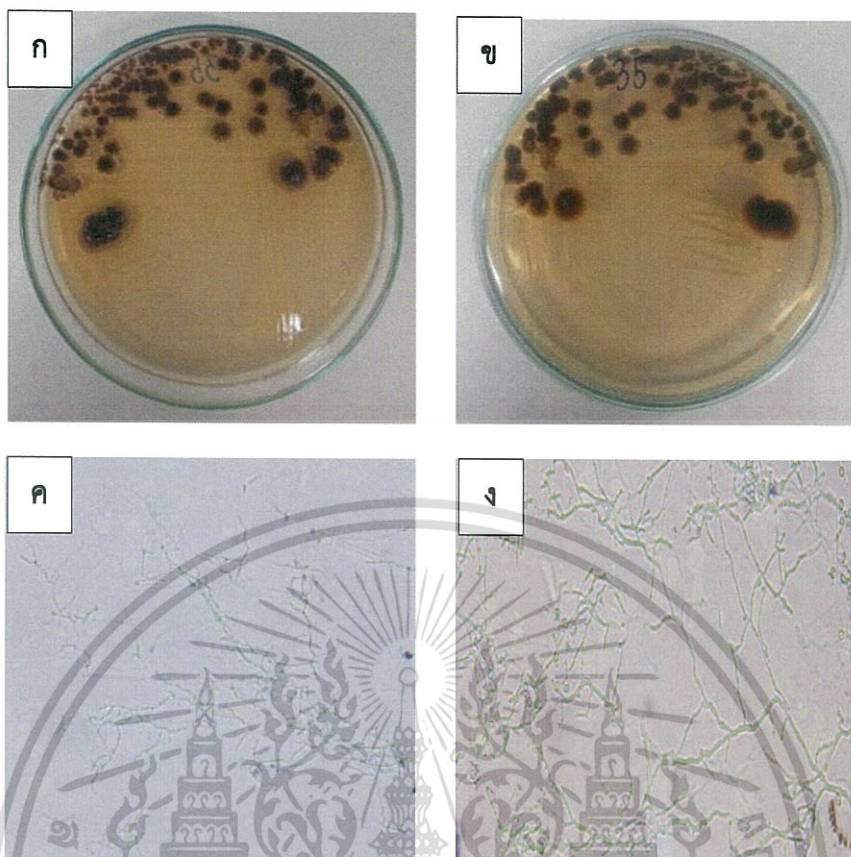
กลุ่มที่ 5 กลุ่มของแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลมะกอก (Olive Brown) ได้แก่



**รูปที่ 4.18** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท JSL82118

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท JSL82118 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท JSL82118 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท JSL82118 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท JSL82118 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสโคไมซีตไอโซเลท JSL82118 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Olive Brown เส้นใยใต้อาหารสี Moderate Olive Brown สร้างรงควัตถุสี Strong Greenish Yellow และมีลักษณะสปอร์เป็นสายแบบ Oligosporous



**รูปที่ 4.19** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนเจอร์ JSL92135

(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนเจอร์ JSL92135 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

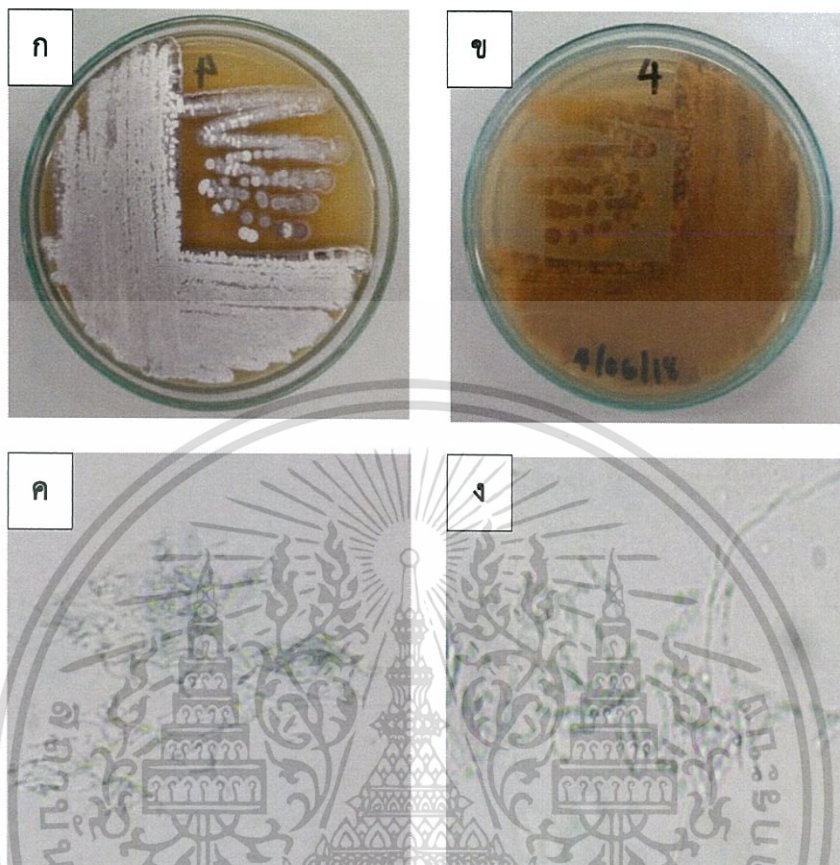
(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนเจอร์ JSL92135 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนเจอร์ JSL92135 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนเจอร์ JSL92135 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนเจอร์ JSL92135 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Olive Brown เส้นใยใต้อาหารสี Light Olive สร้างรงควัตถุสี Moderate Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์สายตรง

## กลุ่มที่ 6 กลุ่มของแอสโคไมซีที่สร้างเส้นใยอากาศสีมะกอก (Olive) ได้แก่

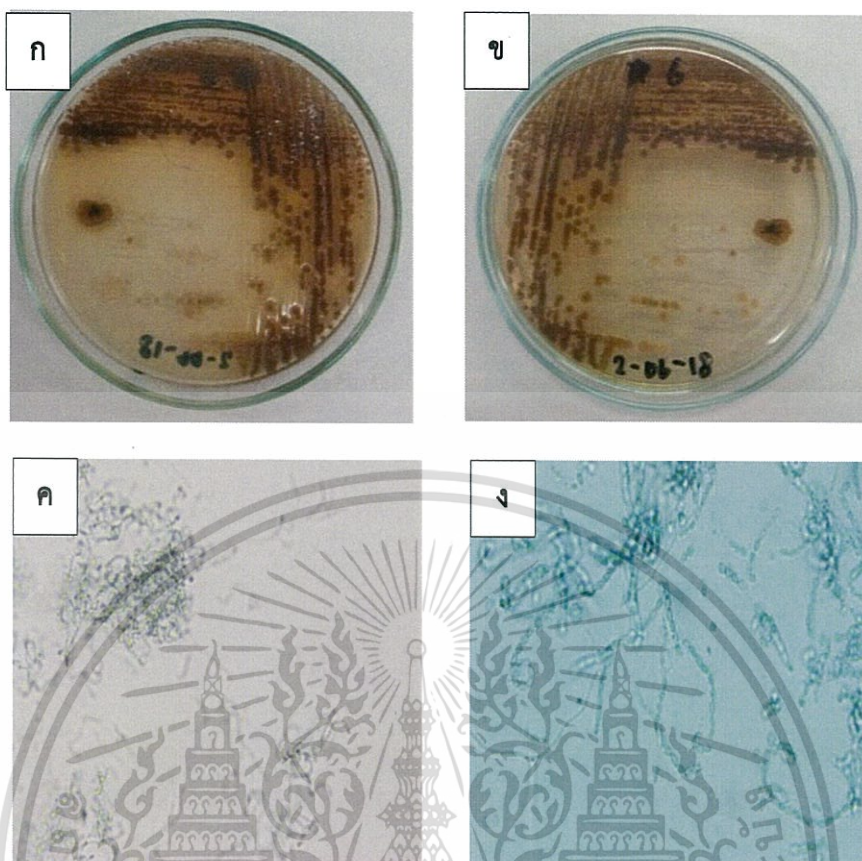


**รูปที่ 4.20** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL10214

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL10214 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL10214 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL10214 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL10214 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสโคไมซีที่ไอโซเลท JSL10214 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Gray เส้นใยใต้อาหารสี Olive Gray สร้างรงควัตถุสี Dark Yellow และมีลักษณะสปอร์เป็นสายแบบ Oligosporous

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.21** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9216

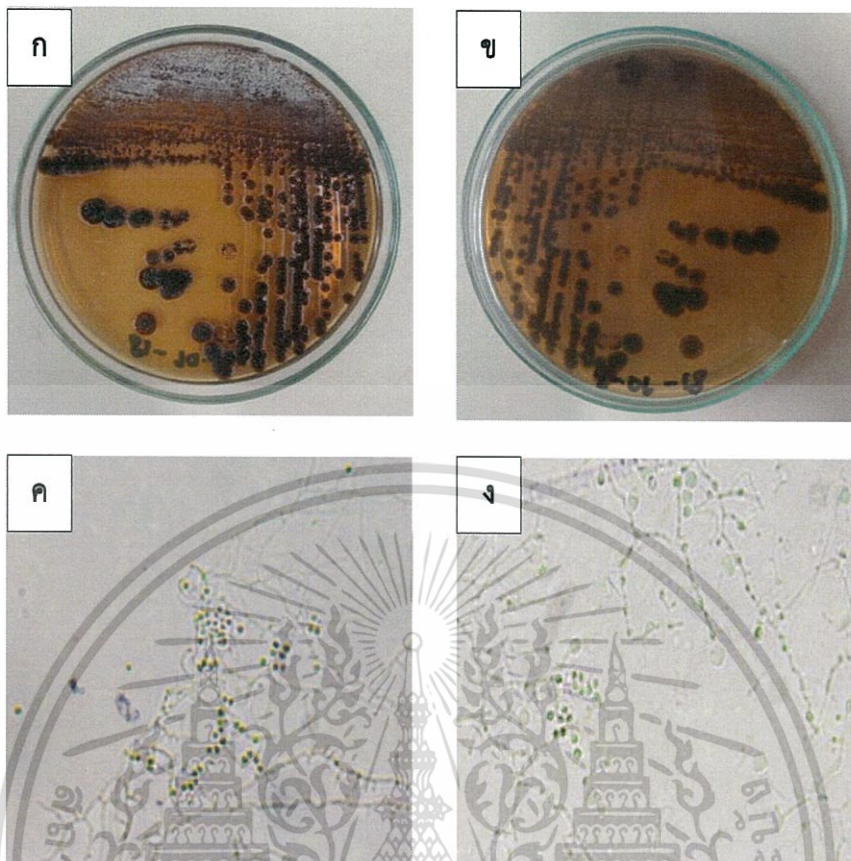
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9216 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9216 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9216 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9216 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9216 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Olive เส้นใยใต้อาหารสี Grayish Olive สร้างรงควัตถุสี Brilliant Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสายสปอร์คล้ายขอ



**รูปที่ 4.22** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9217

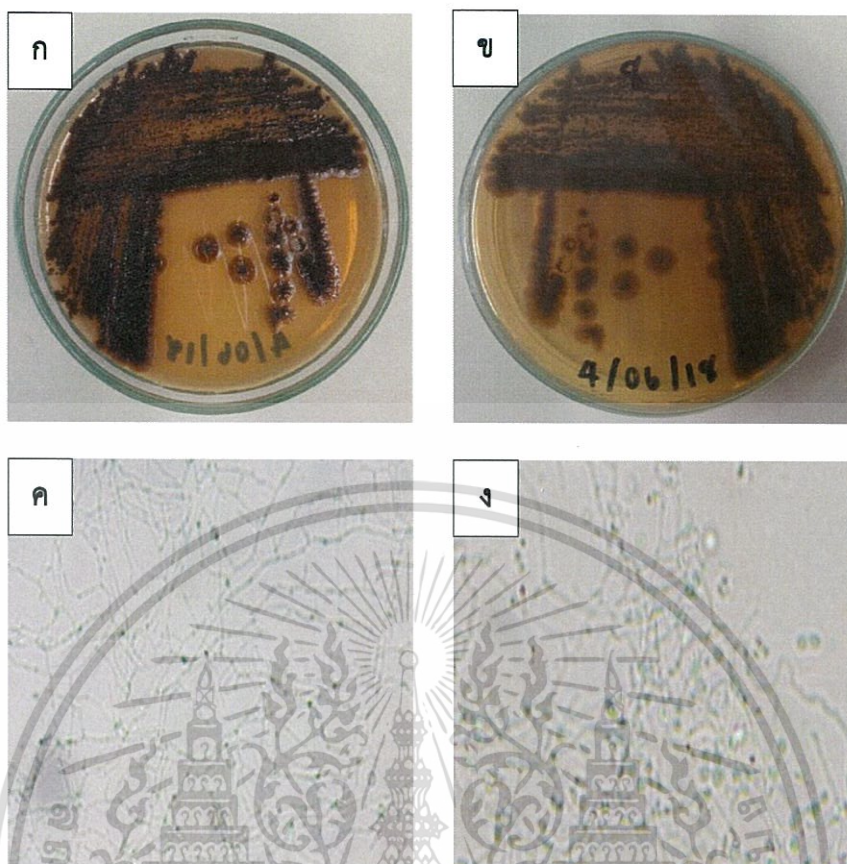
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9217 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9217 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9217 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9217 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9217 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive เส้นใยใต้อาหารสี Light Olive สร้างรงควัตถุสี Brilliant Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous



**รูปที่ 4.23** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิส ไอโซเลท JSL9228

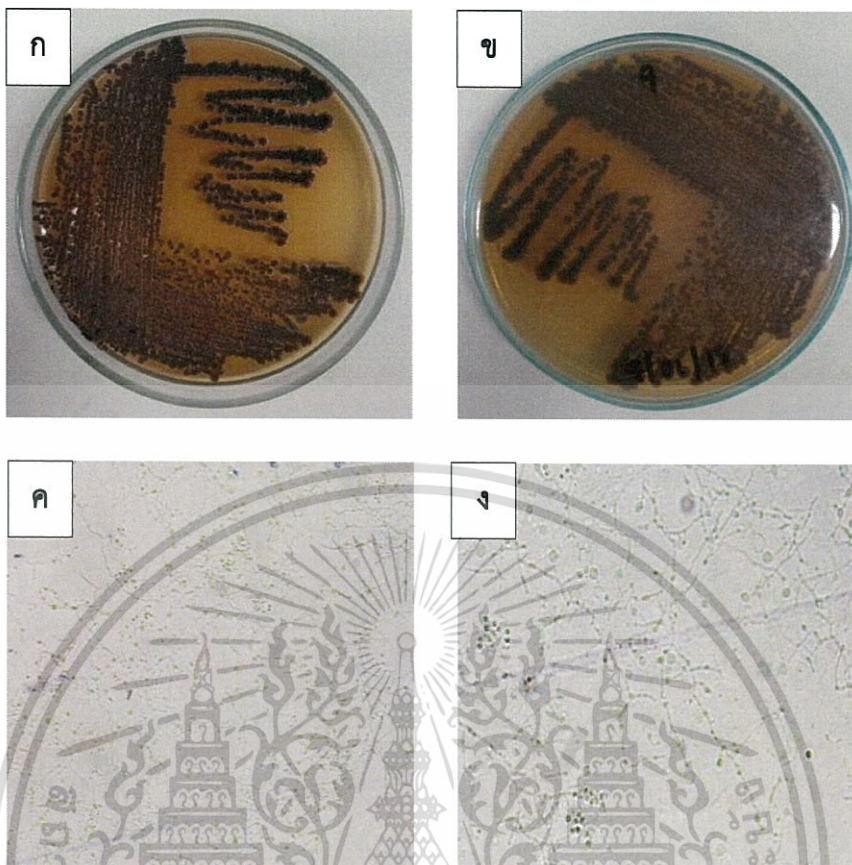
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิส ไอโซเลท JSL9228 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิส ไอโซเลท JSL9228 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิส ไอโซเลท JSL9228 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิส ไอโซเลท JSL9228 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิส ไอโซเลท JSL9228 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Grayish Olive เส้นใยใต้อาหารสี Grayish Olive สร้างรงควัตถุสี Brilliant Greenish Yellow และมีลักษณะสปอร์เป็นสายแบบBisporous



**รูปที่ 4.24** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9219

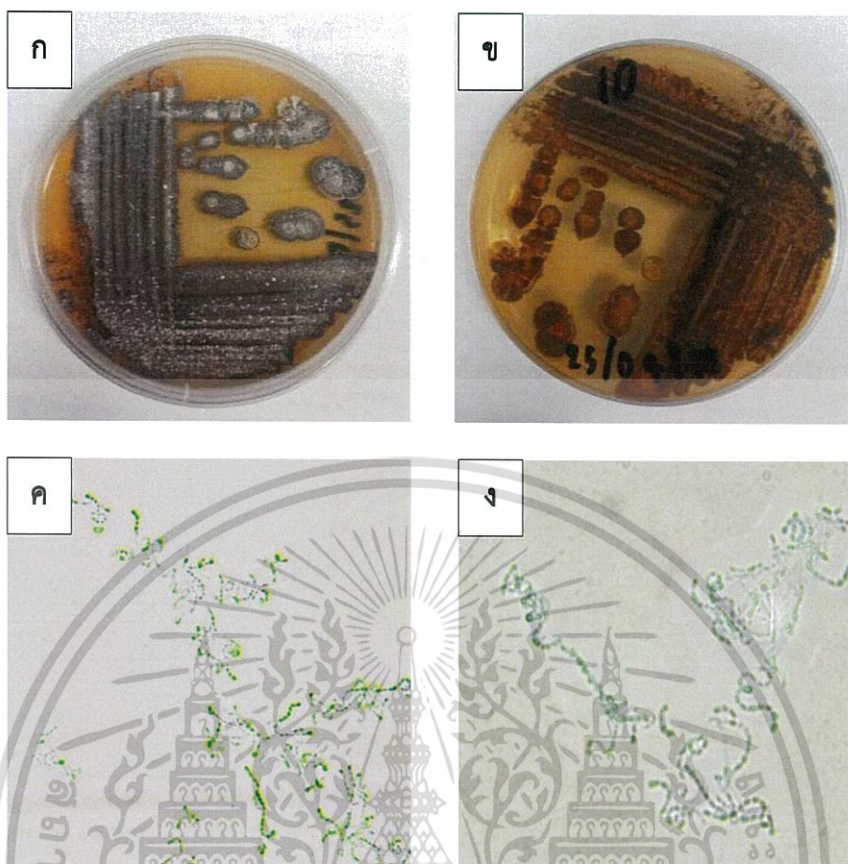
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9219 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9219 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9219 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9219 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

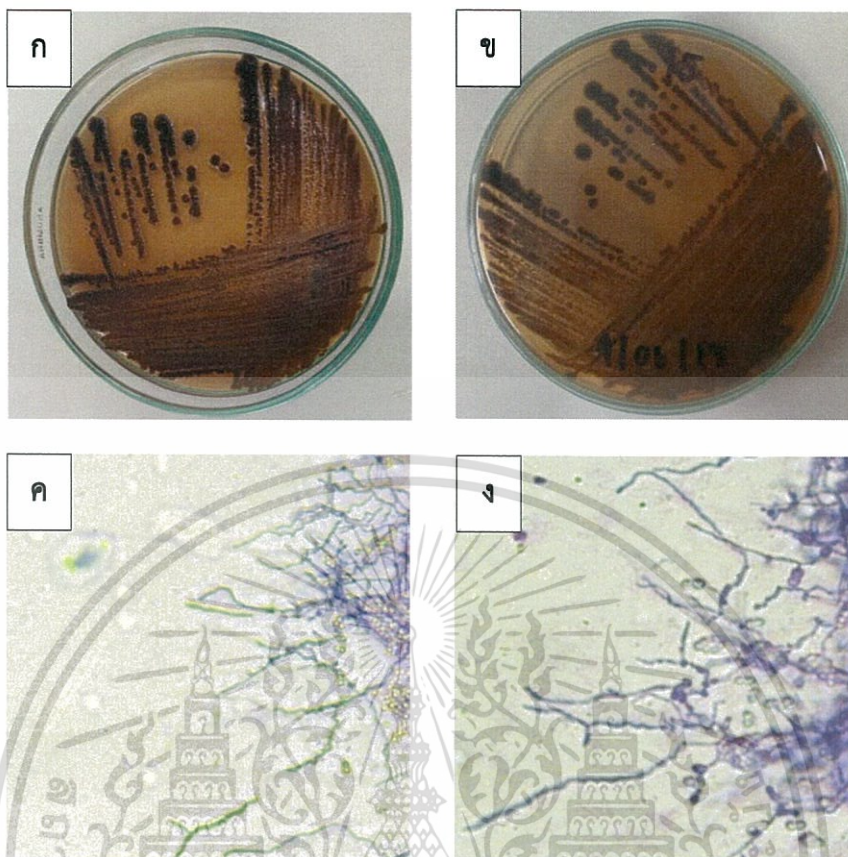
เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL9219 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Olive เส้นใยใต้อาหารสี Dark Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous



**รูปที่ 4.25** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32210

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32210 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32210 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32210 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32210 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

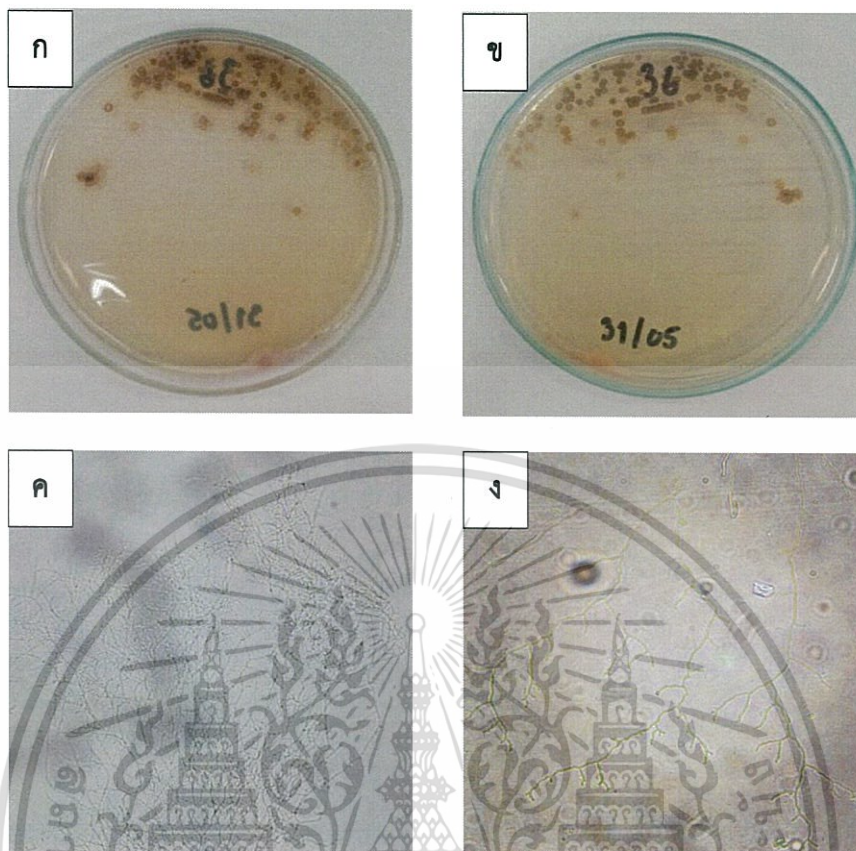
เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลินัส JSL32210 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive Gray เส้นใยใต้อาหารสี Moderate Yellow Green ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสายสปอร์คล้ายขอ



**รูปที่ 4.26** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลต JSL82115

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลต JSL82115 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลต JSL82115 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลต JSL82115 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลต JSL82115 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูลันซิสไอโซเลต JSL82115 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Grayish Olive เส้นใยใต้อาหารสี Dark Yellowish Brown สร้างรงควัตถุสี Strong Greenish Yellow และมีลักษณะสปอร์เป็นสายแบบ Bisporous



รูปที่ 4.27 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ JSL41136

(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ JSL41136 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

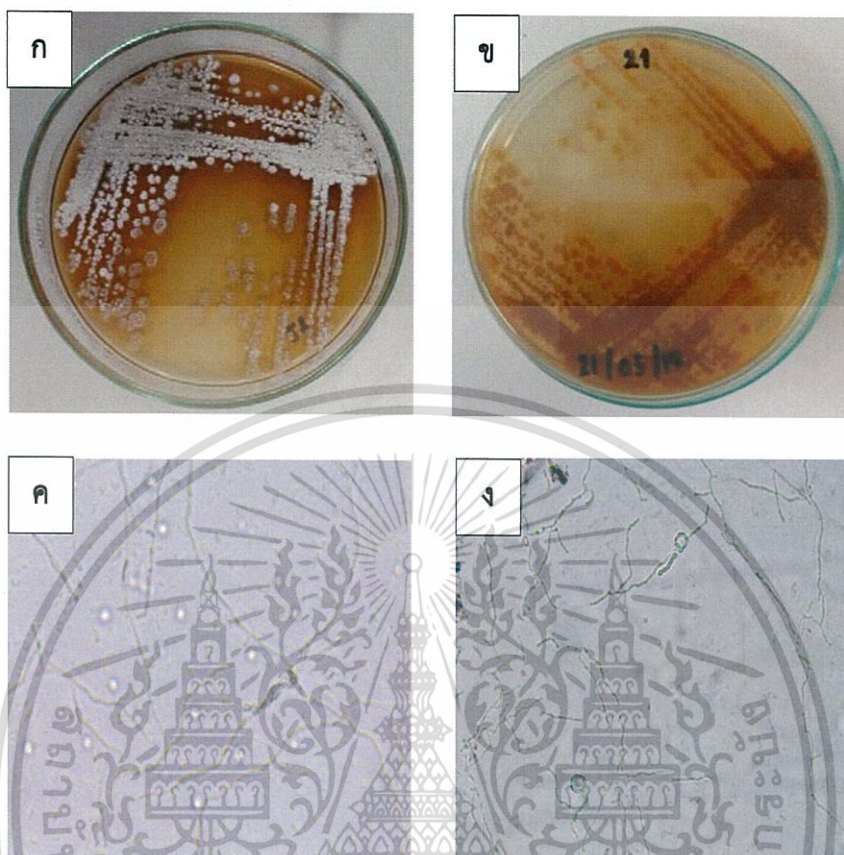
(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ JSL41136 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ JSL41136 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ JSL41136 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ JSL41136 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive เส้นใยใต้อาหารสี Light Olive สร้างรงควัตถุสี Dark Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous

## กลุ่มที่ 7 กลุ่มของแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสีธรรมชาติ (Neutral)



**รูปที่ 4.28** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221

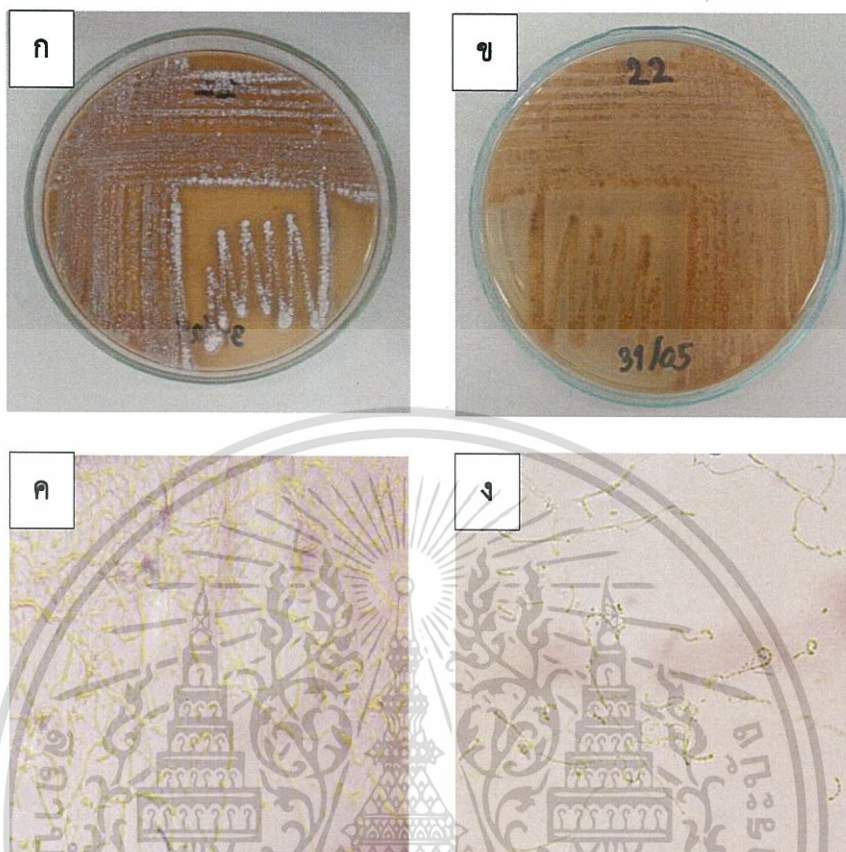
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

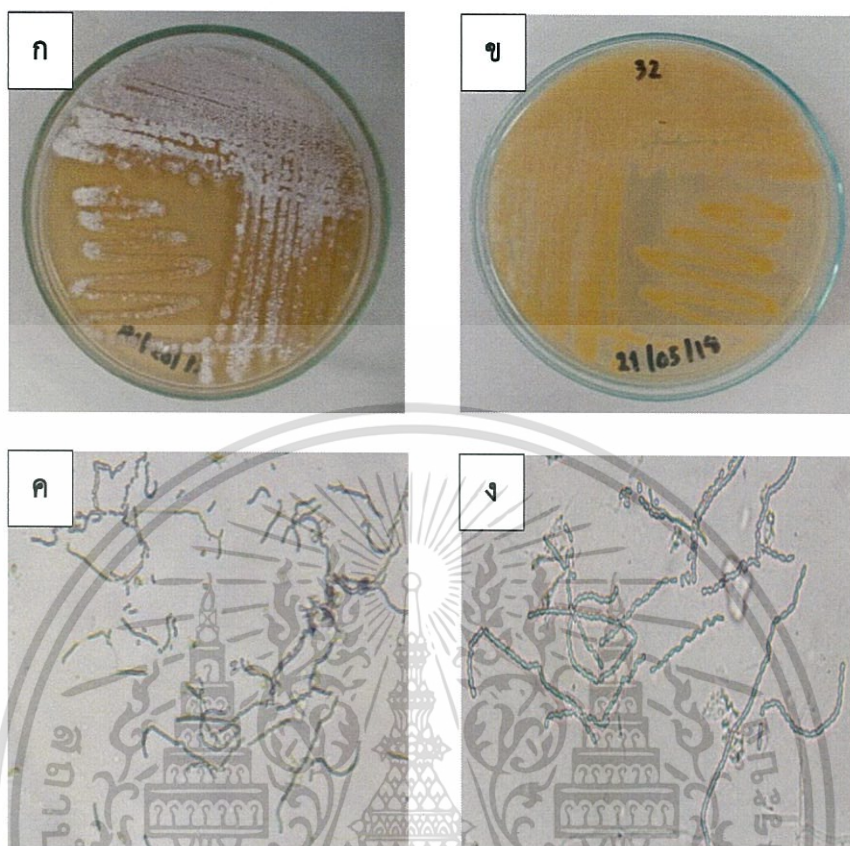
เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Gray เส้นใยได้ อาหารสี Moderate Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสายสปอร์ คล้ายขอ



**รูปที่ 4.29** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสิดินทรีย์ไฮโดรไลติก JSL92222

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสิดินทรีย์ไฮโดรไลติก JSL92222 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสิดินทรีย์ไฮโดรไลติก JSL92222 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสิดินทรีย์ไฮโดรไลติก JSL92222 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสิดินทรีย์ไฮโดรไลติก JSL92222 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสิดินทรีย์ไฮโดรไลติก JSL92222 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Medium Gray เส้นใยใต้อาหารสี Brilliant Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสายสปอร์คล้ายขอ



**รูปที่ 4.30** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอสเลท JSL92232

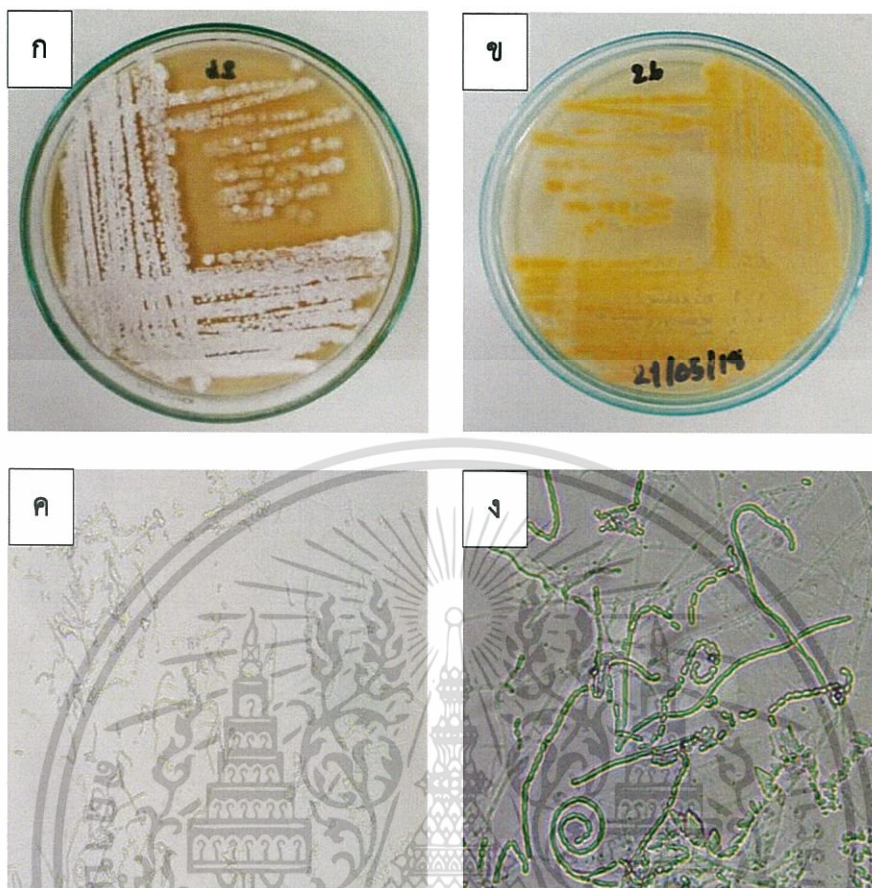
(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอสเลท JSL92232 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอสเลท JSL92232 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอสเลท JSL92232 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอสเลท JSL92222 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

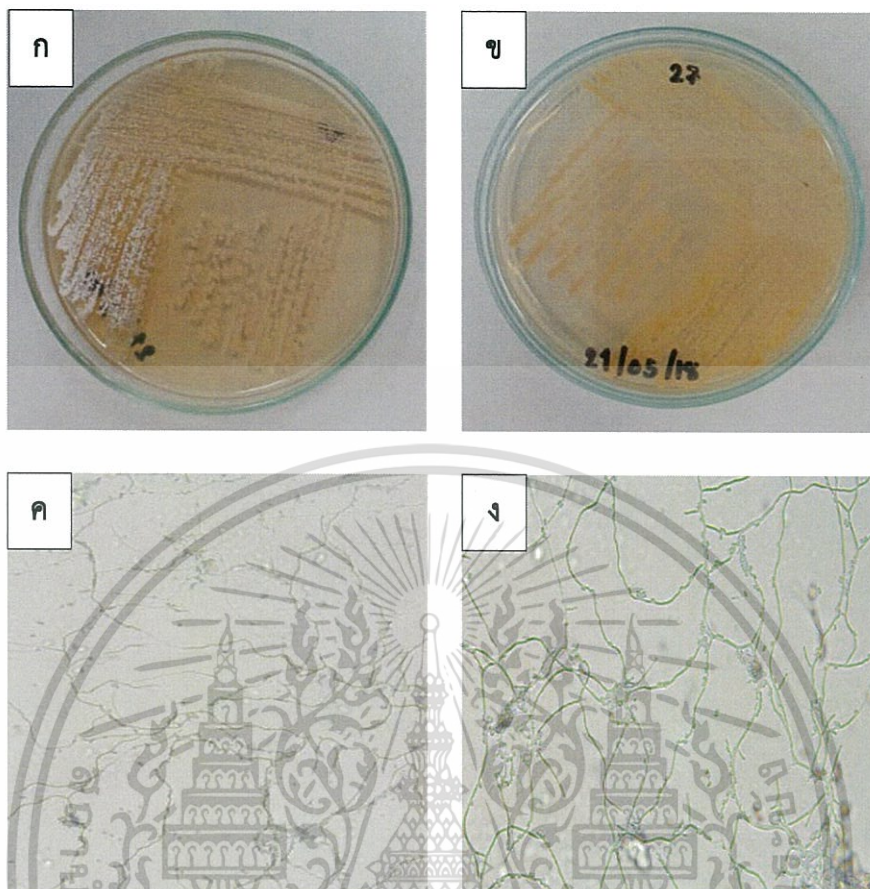
เชื้อแอสเพอร์จิลลัสไอสเลท JSL92232 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Gray เส้นใยใต้อาหารสี Light Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสายสปอร์ตรง



**รูปที่ 4.31** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ไอโซเลท JSL102226

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ไอโซเลท JSL102226 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ไอโซเลท JSL102226 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ไอโซเลท JSL102226 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ไอโซเลท JSL102226 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซ์ไอโซเลท JSL102226 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Gray เส้นใยใต้อาหารสี Moderate Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสายสปอร์คล้ายขอ



**รูปที่ 4.32** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิสไอโซเลท JSL92227

(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิสไอโซเลท JSL92227 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

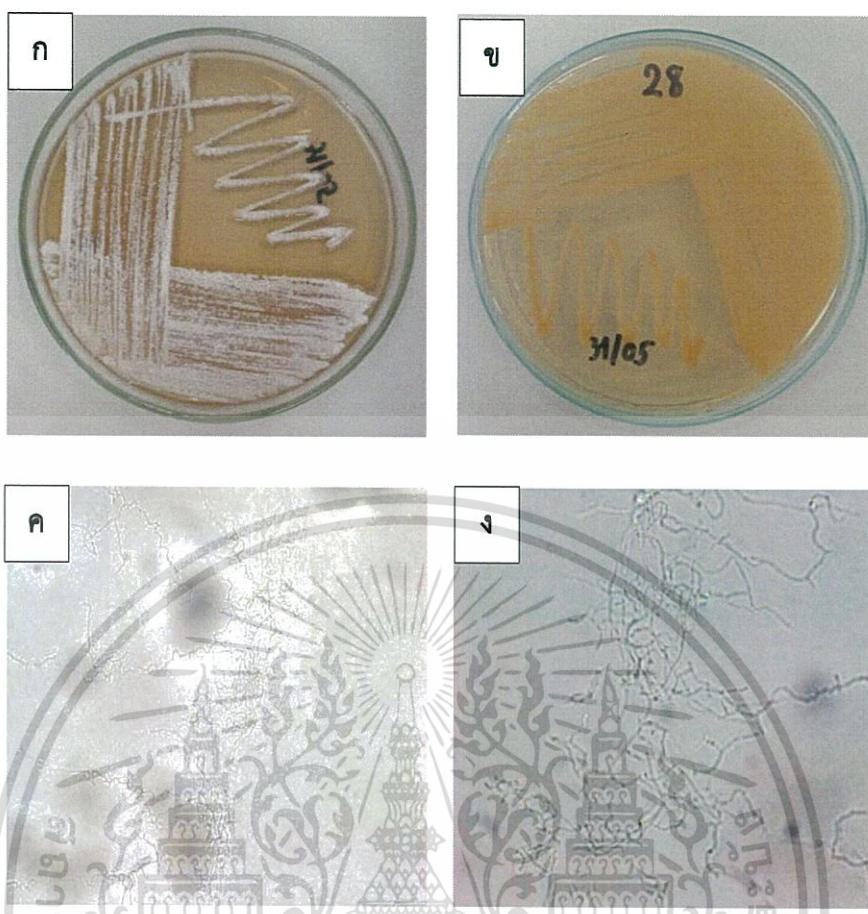
(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิสไอโซเลท JSL92227 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิสไอโซเลท JSL92227 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40

(ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิสไอโซเลท JSL102226 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไนดูแลนซิสไอโซเลท JSL92227 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยใต้อาหารสี Brilliant Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.33** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL92228

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL92228 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL92228 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL92228 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 40
- (ง) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL92228 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

เชื้อแอสเพอริลลัสไอดีเอสแอล JSL92228 มีการสร้างเส้นใยอากาศสี White เส้นใยใต้อาหารสี Light Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากคัดแยกโดยวิธีที่ 1 และ 2  
จำนวน 33 ไอโซเลตด้วยระบบสี The NBS/ISCC Color System

| กลุ่ม | หมายเลข<br>ไอโซเลต | สีเส้นใยบนอาหาร                    | สีเส้นใยใต้อาหาร                   | สีรงควัตถุ                        |
|-------|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1     | JSL9215            | #35170C<br>Dark Brown              | #4B3621<br>Dark Yellowish<br>Brown | #9B8127 Dark<br>Greenish Yellow   |
|       | JSL91123           | #4D220E Deep<br>Brown              | #4D220E<br>Deep Brown              | #CEA262 Graynish<br>Yellow        |
| 2     | JSL61119           | #FF8E00 Vivid<br>Orange Yellow     | #FF8E00<br>Vivid Orange Yellow     | #FFCF40<br>Brilliant Yellow       |
|       | JSL61120           | #F6A600 Vivid<br>Orange Yellow     | #F6A600<br>Vivid Orange Yellow     | #FFCF40<br>Brilliant Yellow       |
| 3     | JSL82116           | #4B3621<br>Dark Yellowish<br>Brown | #4B3621<br>Dark Yellowish<br>Brown | #BEB72E Strong<br>Greenish Yellow |
|       | JSL92131           | #593315<br>Deep Yellowish<br>Brown | #5E490F Moderate<br>Olive          | #D4AF37 Strong<br>Yellow          |
|       | JSL82134           | #3F2512<br>Dark Yellowish<br>Brown | #3F2512<br>Dark Yellowish<br>Brown | #BE8A3D Dark Orange<br>Yellow     |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ได้จากคัดแยกโดยวิธีที่ 1 และจำนวน 33 ไอโซเลท ด้วยระบบสี The NBS/ISCC Color System (ต่อ)

| กลุ่ม | หมายเลขไอโซเลท | สีเส้นใยบนอาหาร            | สีเส้นใยใต้อาหาร                   | สีรงควัตถุ                               |
|-------|----------------|----------------------------|------------------------------------|--|
| 4     | JSL8111        | #BFB8A5<br>Yellowish Gray  | #AB9144<br>Dark Yellow             | #CED23A<br>Brilliant Yellow<br>Green     |
|       | JSL5112        | #BFB8A5<br>Yellowish Gray  | #593319<br>Deep Brown              | #945D0B<br>Light Olive Brown             |
|       | JSL10113       | #BFB8A5<br>Yellowish Gray  | #52442C<br>Dark Grayish Olive      | #E9E450<br>Brilliant Greenish<br>Yellow  |
|       | JSL31111       | #52442C Grayish<br>Olive   | #B57900<br>Deep Yellow             | #D79D41 Moderate<br>Yellow               |
|       | JSL32212       | #F0EAD6<br>Yellowish White | #D4AF37<br>Strong Yellow           | ไม่สร้างรงควัตถุที่<br>สามารถละลายน้ำได้ |
|       | JSL32213       | #F3E5AB<br>Pale Yellow     | #D4AF37 Strong<br>Yellow           | ไม่สร้างรงควัตถุที่<br>สามารถละลายน้ำได้ |
|       | JSL32214       | #BFB8A5<br>Yellowish Gray  | #5E490F Moderate<br>Olive          | #9B9400<br>Greenish Yellow               |
|       | JSL52129       | #52442C<br>Grayish Olive   | #4B3621<br>Dark Yellowish<br>Brown | #BEB72E<br>Strong Greenish<br>Yellow     |
|       | JSL82117       | #AB9144<br>Dark Yellow     | #AB9144<br>Dark Yellow             | #BEB72E<br>Strong Greenish<br>Yellow     |
|       | JSL61130       | #AF8D13<br>Deep Yellow     | #AB9144<br>Dark Yellow             | #C9AE5D<br>Moderate Yellow               |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ได้จากคัดแยกโดยวิธีที่ 1 และ 2 จำนวน 33 ไอโซเลท ด้วยระบบสี The NBS/ISCC Color System (ต่อ)

| กลุ่ม | หมายเลข ไอโซเลท | สีเส้นใยบนอาหาร                 | สีเส้นใยใต้อาหาร                 | สีรงควัตถุ                               |
|-------|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|--|
| 5     | JSL82118        | #64400F Moderate<br>Olive Brown | #6C541E Moderate<br>Olive Brown  | #BEB72E<br>Strong Greenish<br>Yellow     |
|       | JSL92135        | #6C541E Moderate<br>Olive Brown | #867E36<br>Light Olive           | #C9AE5D<br>Moderate Yellow               |
| 6     | JSL10214        | #9A8776<br>Light Olive Gray     | #4D4234<br>Olive Gray            | #AB9144<br>Dark Yellow                   |
|       | JSL9216         | #5E490F Moderate<br>Olive       | #52442C<br>Grayish Olive         | #E9E450<br>Brilliant Greenish<br>Yellow  |
|       | JSL9217         | #846A20<br>Light Olive          | #846A20 Light<br>Olive           | #E9E450 Brilliant<br>Greenish Yellow     |
|       | JSL9228         | #52244C Grayish<br>Olive        | #52442C<br>Grayish Olive         | #E9E450 Brilliant<br>Greenish Yellow     |
|       | JSL9219         | #5E490F Moderate<br>Olive       | #98943E Dark<br>Greenish Yellow  | ไม่สร้างรงควัตถุที่<br>สามารถละลายน้ำได้ |
|       | JSL32210        | #8A8776 Light<br>Olive Gray     | #8B8940 Moderate<br>Yellow Green | ไม่สร้างรงควัตถุที่<br>สามารถละลายน้ำได้ |
|       | JSL82115        | #52442C Grayish<br>Olive        | #4B3621 Dark<br>Yellowish Brown  | #BEB72E Strong<br>Greenish Yellow        |
|       | JSL41136        | #867E36 Light<br>Olive          | #867E36 Light<br>Olive           | #98943E Dark<br>Greenish Yellow          |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากคัดแยกโดยวิธีที่ 1 และ 2 จำนวน 33 ไอโซเลท ด้วยระบบสี The NBS/ISCC Color System (ต่อ)

| กลุ่ม | หมายเลข ไอโซเลท | สีเส้นใยบนอาหาร     | สีเส้นใยใต้อาหาร         | สิ่งรบกวน                            |
|-------|-----------------|---------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 7     | JSL92221        | #B9B8B5 Light Gray  | #C9AE5D Moderate Yellow  | ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ |
|       | JSL92222        | #848482 Medium Gray | #FADA5E Brilliant Yellow | ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ |
|       | JSL92232        | #C2A894 Light Gray  | #F8DE7E Light Yellow     | ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ |
|       | JSL102226       | #B9B8B5 Light Gray  | #C9AE5D Moderate Yellow  | ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ |
|       | JSL92227        | #F2F3F4 White       | #FADA5E Brilliant Yellow | ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ |
|       | JSL92228        | #F2F3F4 White       | #FFD35F Light Yellow     | ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 แสดงลักษณะโคโลนีเดี่ยวของแอกติโนมัยซีททั้ง 33 ไอโซเลท ที่แยกได้จากวิธีที่ 1 และ 2



รูปที่ 4.34 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของแอกติโนมัยซีททั้ง 33 ไอโซเลท ที่แยกได้จากวิธีที่ 1 และ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีท

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างนั้น ได้มีการทำการทดสอบทางชีวเคมีทั้งหมด 6 การทดสอบ ได้แก่ การทดสอบการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar, การทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch Hydrolysis), การทดสอบการย่อยสลายไนเตรท (Nitrate Reduction), การย่อยสลายเจลาติน (Gelatin Liquefaction), การทดสอบความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen Sulfide Production) ดังตารางที่ 4.6 และการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาล 5 ชนิด (ดังวิธีการที่ 3.8) ดังตารางที่ 4.7 (ภาคผนวก ง)

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ได้จากการคัดแยกโดยวิธีที่ 1 และ 2

| กลุ่ม | หมายเลขไอโซเลท | Skim milk (Peptonization) | Starch Hydrolysis | Nitrate Reduction | Gelatin Liquefaction | Hydrogen Sulfide Production |
|-------|----------------|---------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1     | JSL9215        | -                         | +++               | -                 | -                    | -                           |
|       | JSL91123       | -                         | -                 | -                 | -                    | -                           |
| 2     | JSL61119       | -                         | +++               | -                 | -                    | -                           |
|       | JSL61120       | -                         | +++               | -                 | +                    | w                           |
| 3     | JSL82116       | -                         | -                 | w                 | -                    | w                           |
|       | JSL92131       | -                         | -                 | w                 | -                    | -                           |
|       | JSL82134       | +                         | -                 | w                 | -                    | -                           |
| 4     | JSL8111        | -                         | +++               | -                 | +                    | w                           |
|       | JSL5112        | -                         | ++                | -                 | +                    | w                           |
|       | JSL10113       | -                         | +                 | -                 | +                    | w                           |
|       | JSL31111       | -                         | -                 | -                 | -                    | -                           |
|       | JSL32212       | -                         | ++                | w                 | +                    | w                           |

\*\*\*หมายเหตุ : + = Positive reaction, - = Negative reaction, w = weakly positive reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากการคัดแยกโดยวิธีที่ 1 และ 2 (ต่อ)

| กลุ่ม | หมายเลข<br>ไอโซเลท | Skim milk<br>(Peptonization) | Starch<br>Hydrolysis | Nitrate<br>Reduction | Gelatin<br>Liquefaction | Hydrogen<br>Sulfide<br>Production |
|-------|--------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 4     | JSL32213           | -                            | +++                  | -                    | -                       | w                                 |
|       | JSL32214           | -                            | +++                  | w                    | -                       | w                                 |
|       | JSL52129           | -                            | +                    | +                    | -                       | -                                 |
|       | JSL82117           | w                            | -                    | +                    | -                       | -                                 |
|       | JSL61130           | -                            | ++                   | -                    | -                       | -                                 |
| 5     | JSL82118           | w                            | -                    | -                    | -                       | -                                 |
|       | JSL92135           | w                            | -                    | +                    | +                       | w                                 |
| 6     | JSL10214           | -                            | +                    | -                    | +                       | w                                 |
|       | JSL9216            | -                            | +++                  | +                    | -                       | w                                 |
|       | JSL9217            | w                            | +++                  | -                    | -                       | -                                 |
|       | JSL9228            | +                            | +                    | -                    | -                       | -                                 |
|       | JSL9219            | +                            | +++                  | -                    | -                       | -                                 |
|       | JSL32210           | -                            | +++                  | -                    | +                       | w                                 |
|       | JSL82115           | -                            | +++                  | -                    | -                       | -                                 |
|       | JSL41136           | -                            | ++                   | w                    | -                       | -                                 |
| 7     | JSL92221           | -                            | +                    | w                    | +                       | w                                 |
|       | JSL92222           | -                            | +                    | -                    | +                       | +                                 |
|       | JSL92232           | -                            | -                    | -                    | -                       | w                                 |
|       | JSL102226          | -                            | -                    | -                    | -                       | w                                 |
|       | JSL92227           | -                            | +                    | w                    | +                       | -                                 |
|       | JSL92228           | -                            | +                    | +                    | -                       | -                                 |

\*\*\*หมายเหตุ : + = Positive reaction, - = Negative reaction, w = weakly positive reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาล 5 ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่ได้จากการคัดแยก  
โดยวิธีที่ 1 และ 2

| กลุ่ม    | หมายเลข<br>ไอโซเลท | Glucose | Lactose | Sucrose | Xylose | Manitol |
|----------|--------------------|---------|---------|---------|--------|---------|
| 1        | JSL9215            | w       | w       | w/G     | +      | -       |
|          | JSL91123           | w       | w       | +       | +      | w/G     |
| 2        | JSL61119           | +/G     | w       | +/G     | +      | w/G     |
|          | JSL61120           | +/G     | -       | +/G     | w      | +       |
| 3        | JSL82116           | -       | w       | +       | +      | +/G     |
|          | JSL92131           | w/G     | w       | +/G     | +      | w       |
|          | JSL82134           | +/G     | w       | w       | +      | w/G     |
| 4        | JSL8111            | +/G     | -       | w/G     | +      | -       |
|          | JSL5112            | +/G     | -       | w/G     | +      | -       |
|          | JSL10113           | +/G     | -       | -       | -      | -       |
|          | JSL31111           | +       | w       | +       | +      | w/G     |
|          | JSL32212           | +       | -       | +       | w      | -/G     |
|          | JSL32213           | +       | -       | -       | -      | +       |
|          | JSL32214           | +       | -       | +/G     | +      | -       |
|          | JSL52129           | +/G     | w       | w       | +      | W       |
|          | JSL82117           | +/G     | -       | +/G     | +      | w/G     |
| JSL61130 | w/G                | w       | w/G     | +       | w      |         |
| 5        | JSL82118           | w       | -       | +       | +      | w       |
|          | JSL92135           | w       | w       | +/G     | +      | w       |

\*\*\*หมายเหตุ : + = Positive reaction, - = Negative reaction, w = weakly positive reaction, G = Gas production

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาล 5 ชนิดของเชื้อแอสโตโมนัสซีทที่ได้จากการคัดแยก โดยวิธีที่ 1 และ 2 (ต่อ)

| กลุ่ม | หมายเลข<br>ไอโซเลท | Glucose | Lactose | Sucrose | Xylose | Manitol |
|-------|--------------------|---------|---------|---------|--------|---------|
| 6     | JSL10214           | +       | -       | -       | -      | -       |
|       | JSL9216            | -       | w       | w/G     | +      | w/G     |
|       | JSL9217            | -       | w       | w/G     | +      | w/G     |
|       | JSL9228            | +/G     | w       | w/G     | w      | w       |
|       | JSL9219            | +       | w       | +/G     | +      | +       |
|       | JSL32210           | +       | -       | +       | +      | -       |
|       | JSL82115           | w       | w       | w/G     | +      | w/G     |
|       | JSL41136           | +/G     | w       | +/G     | +      | w       |
| 7     | JSL92221           | w/G     | -       | -       | +      | -/G     |
|       | JSL92222           | +/G     | -       | -       | w      | -/G     |
|       | JSL92232           | +       | -       | +/G     | w      | -/G     |
|       | JSL102226          | +/G     | w       | +       | w      | +/G     |
|       | JSL92227           | w       | -       | w       | +      | -/G     |
|       | JSL92228           | w       | -       | -       | +      | -/G     |

\*\*\*หมายเหตุ : + = Positive reaction, - = Negative reaction, w = weakly positive reaction, G = Gas production

จากตารางที่ 4.6 และ 4.7 พบว่าเชื้อแอสโตโมนัสซีทจำนวน 33 ไอโซเลท มีผลการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

1. เชื้อแอสโตโมนัสซีททั้ง 7 ไอโซเลท สามารถย่อยโปรตีนบนอาหาร skim milk agar ได้ คิดเป็นร้อยละ 21.21 ของเชื้อแอสโตโมนัสซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL82134, JSL82117, JSL82118, JSL92135, JSL9217, JSL9228 และ JSL9219

2. เชื้อแอสโตโมนัสซีททั้ง 22 ไอโซเลท สามารถย่อยแป้งบนอาหาร ISP4 ได้ คิดเป็นร้อยละ 66.67 ของเชื้อแอสโตโมนัสซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL8111, JSL5112, JSL10113, JSL10214, JSL9215, JSL9216, JSL9217, JSL9228, JSL9219, JSL32210, JSL32212, JSL32213, JSL32214, JSL82115, JSL61120, JSL92221, JSL92222, JSL92227, JSL92228, JSL52129, JSL61130 และ JSL41136

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการรศศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 15 ไอโซเลท สามารถรีดิวซ์ไนเตรทในอาหาร Peptone KNO<sub>3</sub> broth ได้ คิดเป็นร้อยละ 45.45 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL9215, JSL9216, JSL32212, JSL32214, JSL82116, JSL82117, JSL61120, JSL92221, JSL92227, JSL92228, JSL52129, JSL92131, JSL82134, JSL92135 และ JSL41136

4. เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 11 ไอโซเลทสามารถย่อยเจลาตินในอาหาร Bouillon gelatin broth ได้ คิดเป็นร้อยละ 33.33 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL8111, JSL5112, JSL10113, JSL10214, JSL32210, JSL32212, JSL61119, JSL92221, JSL92222, JSL92227 และ JSL92135

5. เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 15 ไอโซเลท สามารถผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหาร Tryptone yeast extract agar ได้ คิดเป็นร้อยละ 45.45 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL8111, JSL5112, JSL10113, JSL10214, JSL9216, JSL32210, JSL32212, JSL32213, JSL32214, JSL82116, JSL92221, JSL92222, JSL102226, JSL92232 และ JSL92135

6. การทดสอบการใช้น้ำตาลทั้ง 5 ชนิด คือ กลูโคส, แลคโตส, ซูโครส, ไซโลส และแมนนิทอล มีผลการทดสอบดังต่อไปนี้

6.1 การใช้น้ำตาลกลูโคส เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 30 ไอโซเลท สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ คิดเป็นร้อยละ 90.90 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL8111, JSL5112, JSL10113, JSL10214, JSL9215, JSL9228, JSL9219, JSL32210, JSL31111, JSL32212, JSL32213, JSL32214, JSL82115, JSL82117, JSL82118, JSL61119, JSL61120, JSL92221, JSL92222, JSL91123, JSL102226, JSL92227, JSL92228, JSL52129, JSL61130, JSL92131, JSL92232, JSL82134, JSL92135 และ JSL41136

6.2 การใช้น้ำตาลแลคโตส เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 17 ไอโซเลท สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ คิดเป็นร้อยละ 51.51 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL9215, JSL9216, JSL9217, JSL9228, JSL9219, JSL31111, JSL82115, JSL82116, JSL61119, JSL91123, JSL102226, JSL52129, JSL61130, JSL92131, JSL82134, JSL92135 และ JSL41136

6.3 การใช้น้ำตาลซูโครส เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 27 ไอโซเลท สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ คิดเป็นร้อยละ 81.81 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL8111, JSL5112, JSL9215, JSL9216, JSL9217, JSL9228, JSL9219, JSL31111, JSL32212, JSL32214, JSL82115, JSL82116, JSL82117, JSL82118, JSL61119, JSL61120, JSL91123, JSL102226, JSL92227, JSL52129, JSL61130, JSL92131, JSL92232, JSL82134, JSL92135 และ JSL41136

6.4 การใช้น้ำตาลไซโลส เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 30 ไอโซเลท สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ คิดเป็นร้อยละ 90.90 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL8111, JSL5112, JSL9215, JSL9216, JSL9217, JSL9228, JSL9219, JSL32210, JSL31111, JSL32212, JSL32214, JSL82115, JSL82116, JSL82117, JSL82118, JSL61119, JSL61120, JSL92221, JSL92222, JSL91123, JSL102226, JSL92227, JSL92228, JSL52129, JSL61130, JSL92131, JSL92232, JSL82134, JSL92135 และ JSL41136

6.5 การใช้น้ำตาลแมนนิทอล เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 20 ไอโซเลท สามารถใช้น้ำตาลแมนนิทอลได้ คิดเป็นร้อยละ 60.60 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังต่อไปนี้ JSL9216, JSL9217, JSL9228, JSL9219, JSL31111, JSL32213, JSL82115, JSL82116, JSL82117, JSL82118, JSL61119, JSL61120, JSL91123, JSL102226, JSL52129, JSL61130, JSL92131, JSL82134, JSL92135 และ JSL41136

จากผลการศึกษาการย่อยโปรตีนบนอาหาร skim milk agar พบว่าแอกติโนมัยซีทบางไอโซเลทสามารถย่อยโปรตีนได้ เนื่องจากมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยโปรตีนในนมได้ จึงทำให้เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) (Mayilraj, 2010)

จากการศึกษาการย่อยแป้งบนอาหาร ISP4 พบว่าแอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่มีการย่อยแป้งเนื่องจากแอกติโนมัยซีทมีการสร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเป็น exo enzyme โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยแป้งที่เป็น Polysaccharide ให้กลายเป็นตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ (Mayilraj, 2010)

จากการศึกษาการรีดิวซ์ไนเตรทในอาหาร Peptone  $\text{KNO}_3$  broth พบว่าแอกติโนมัยซีทมีการรีดิวซ์ไนเตรทได้เพียงบางส่วน เนื่องจากมีการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนเตรท ถ้ามีไนเตรทอยู่เมื่อหยุดสารละลาย sulphanic acid และตามด้วย  $\alpha$  - naphthylamine จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเป็นสีชมพูอมแดง (Mayilraj, 2010)

จากการศึกษาการย่อยเจลาตินในอาหาร Bouillon gelatin broth พบว่าแอกติโนมัยซีทสามารถย่อยเจลาตินได้เพียงบางไอโซเลท เนื่องจากแอกติโนมัยซีทนั้นสามารถสร้าง exoenzyme แล้วทำการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เมื่อนำไปตรวจผลโดยการนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะพบว่าเจลาตินจะมีความเหลว (Mayilraj, 2010)

จากการศึกษาการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ พบว่า แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เพียงเล็กน้อย เนื่องจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ อาจเกิดจากการย่อยสลายกรดอะมิโนที่มีกำมะถัน โดยเมื่อแหล่งไนโตรเจนหมดลงเชื้อสามารถตรึงกรดอะมิโนที่มีกำมะถัน มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนได้ ซึ่งส่งผลให้ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ หรือสารประกอบกำมะถันอื่นๆ สามารถปล่อยออกมาได้ ซึ่งความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่มีกำมะถัน โดยทั่วไปจะไม่สูงพอที่จะสามารถสังเกตเห็นก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ (Angela *et al.*, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการ ทดสอบการใช้น้ำตาล โดยมี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่า ส่วนใหญ่แอสคิโนมัยซีทสามารถใช้น้ำตาลได้ทุกชนิด โดยสีอาหารในตอนต้นจะมีสีส้มอมแดง หากมีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าแอสคิโนมัยซีทสามารถใช้น้ำตาลได้ แต่หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดง หรือมีสีเข้มขึ้นกว่าหลอดcontrol แสดงว่าแอสคิโนมัยซีทไม่สามารถใช้น้ำตาลได้ แต่มีการใช้สารอื่น ใน nutrient broth เป็นแหล่งพลังงาน โดยบางหลอดจะมีแก๊สเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าแอสคิโนมัยซีทสามารถเจริญใน fermentation broth และเกิดแก๊สจากการเมตาบอลิซึม (ธีระชัย, 2541)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.6 การศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงที่เหมาะสม

นำเชื้อแอสคิโนมัยซีที่คัดแยกได้ มาทำการชีดบนอาหาร YEME แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน (ดังวิธีการที่ 3.9, ภาคผนวก จ) พบว่า ได้ผลการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีที่อุณหภูมิต่างๆ ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีที่อุณหภูมิสูง

| กลุ่ม | หมายเลข<br>ไอโซเลท | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) |       |     |    |    |    |
|-------|--------------------|----------------------------|-------|-----|----|----|----|
|       |                    | 45                         | 50    | 55  | 60 | 65 | 70 |
| 1     | JSL9215            | ++++                       | +++++ | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL91123           | +++                        | +     | -   | -  | -  | -  |
| 2     | JSL61119           | +++++                      | -     | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL61120           | +++++                      | -     | -   | -  | -  | -  |
| 3     | JSL82116           | +++++                      | ++    | +   | -  | -  | -  |
|       | JSL92131           | +++++                      | ++++  | +++ | -  | -  | -  |
|       | JSL82134           | +++                        | +++   | ++  | -  | -  | -  |
| 4     | JSL8111            | +++                        | ++++  | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL5112            | +++                        | ++++  | -   | -  | -  | -  |

\*\*\* หมายถึง +++++ หมายถึง เชื้อแอสคิโนมัยซีที่เจริญได้ดีที่สุด

++++ หมายถึง เชื้อแอสคิโนมัยซีที่เจริญได้ดี

+++ หมายถึง เชื้อแอสคิโนมัยซีที่เจริญได้ปานกลาง

++ หมายถึง เชื้อแอสคิโนมัยซีที่เจริญได้น้อย

+ หมายถึง เชื้อแอสคิโนมัยซีที่เจริญได้น้อยมาก

- หมายถึง เชื้อแอสคิโนมัยซีที่เจริญไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อุณหภูมิสูง (ต่อ)

| กลุ่ม | หมายเลข<br>ไอโซเลท | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) |       |     |    |    |    |
|-------|--------------------|----------------------------|-------|-----|----|----|----|
|       |                    | 45                         | 50    | 55  | 60 | 65 | 70 |
| 4     | JSL10113           | ++++                       | ++++  | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL31111           | +++++                      | ++++  | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL32212           | +++++                      | +++   | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL32213           | +++++                      | +     | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL32214           | +++++                      | +++++ | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL52129           | ++                         | +++   | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL82117           | ++++                       | +     | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL61130           | ++                         | -     | -   | -  | -  | -  |
| 5     | JSL82118           | +++++                      | +     | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL92135           | ++++                       | +++   | -   | -  | -  | -  |
| 6     | JSL10214           | ++++                       | ++++  | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL9216            | +++                        | +++++ | +++ | -  | -  | -  |
|       | JSL9217            | +++++                      | -     | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL9228            | +++                        | +++++ | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL9219            | +++++                      | ++++  | +   | -  | -  | -  |
|       | JSL32210           | +++++                      | ++++  | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL82115           | +++                        | ++++  | -   | -  | -  | -  |
|       | JSL41136           | +++++                      | ++++  | -   | -  | -  | -  |

\*\*\* หมายถึง +++++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดีที่สุด

++++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดี

+++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ปานกลาง

++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้น้อย

+ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้น้อยมาก

- หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### ตารางที่ 4.8 แสดงผลการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อุณหภูมิสูง (ต่อ)

| กลุ่ม | หมายเลข<br>ไอโซเลท | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) |    |    |    |    |    |
|-------|--------------------|----------------------------|----|----|----|----|----|
|       |                    | 45                         | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 |
| 7     | JSL92221           | +++++                      | -  | -  | -  | -  | -  |
|       | JSL92222           | +++++                      | -  | -  | -  | -  | -  |
|       | JSL92232           | +++                        | -  | -  | -  | -  | -  |
|       | JSL102226          | +++++                      | -  | -  | -  | -  | -  |
|       | JSL92227           | ++++                       | -  | -  | -  | -  | -  |
|       | JSL92228           | +++                        | -  | -  | -  | -  | -  |

\*\*\* หมายถึง +++++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดีที่สุด

++++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ดี

+++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ปานกลาง

++ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้น้อย

+ หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้น้อยมาก

- หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญไม่ได้

จากตารางที่ 4.8 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีเพียงบางไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่ 50 และ 55 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 60, 65, และ 70 องศาเซลเซียสนั้นเชื้อแอคติโนมัยซีทไม่สามารถเจริญได้ การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อุณหภูมิต่างๆ มีดังนี้

1. เชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 33 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยคิดเป็นร้อยละ 100 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ ประกอบไอโซเลทดังต่อไปนี้ JSL9215, JSL91123, JSL102226, JSL92227, JSL92228, JSL61119, JSL61120, JSL82116, JSL92131, JSL82134, JSL8111, JSL5112, JSL10113, JSL31111, JSL32212, JSL32213, JSL32214, JSL52129, JSL82117, JSL61130, JSL82118, JSL92135, JSL10214, JSL9216, JSL9217, JSL9228, JSL9219, JSL32210, JSL82115, JSL41136, JSL92221, JSL92222 และ JSL92232

2. เชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 23 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยคิดเป็นร้อยละ 69.69 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ ประกอบไอโซเลทดังต่อไปนี้ JSL9215,

JSL91123, JSL82116, JSL92131, JSL82134, JSL8111, JSL5112, JSL10113, JSL31111, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

JSL32212, JSL32213, JSL32214, JSL52129, JSL82117, JSL82118, JSL92135, JSL10214, JSL9216, JSL9228, JSL9219, JSL32210, JSL82115 และ JSL41136

3. เชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยคิดเป็นร้อยละ 15.15 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ ประกอบไอโซเลทดังต่อไปนี้ JSL82116, JSL92131, JSL82134, JSL9216 และ JSL9219

จากผลการศึกษาการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทดังกล่าว จัดได้ว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้นั้น เป็นแอกติโนมัยซีทที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic actinomyces) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gousterova *et al.*, (2014) ซึ่งได้ทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เกาะลิฟงตันแล้วพบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทส่วนมากเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส

โดยแอกติโนมัยซีทที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophilic actinomyces) นั้นมีการเจริญอยู่ที่อุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง โดยอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 40-80 องศาเซลเซียส (Tortora *et al.*, 2007) แอกติโนมัยซีทที่ชอบอุณหภูมิสูง นั้นมีอยู่ 2 ประเภท คือ strictly thermophilic และ moderately thermophilic actinobacteria โดย strictly thermophilic นั้นสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 37-65 องศาเซลเซียส แต่มีการเจริญที่เหมาะสมจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส และพวก moderately thermophilic actinobacteria เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 28-60 องศาเซลเซียสและมีการเจริญที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิการเจริญเติบโตที่เหมาะสม (Jiang and Xu, 1993) ดังนั้นแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง นั้นจัดเป็นแอกติโนมัยซีทในกลุ่มของ moderately thermophilic actinobacteria

#### 4.7 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น

นำแอสติโนมายซีทที่ทำการคัดแยกได้ จำนวน 33 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 074, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370, *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Candida albicans* ATCC 5239 ด้วยวิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น (ดังวิธีการที่ 3.10.1) (ภาคผนวก จ)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

| กลุ่ม | หมายเลข<br>ไอโซเลท | ขอบเขตการยับยั้งเชื่อมทดสอบ (มิลลิเมตร) |     |                  |      |                    |     |                  |     |                      |     |                    |     |
|-------|--------------------|---|-----|------------------|------|--------------------|-----|------------------|-----|----------------------|-----|--------------------|-----|
|       |                    | <i>E. coli</i>                          |     | <i>S. aureus</i> |      | <i>B. subtilis</i> |     | <i>M. luteus</i> |     | <i>P. aeruginosa</i> |     | <i>C. albicans</i> |     |
|       |                    | ซ้าย                                    | ขวา | ซ้าย             | ขวา  | ซ้าย               | ขวา | ซ้าย             | ขวา | ซ้าย                 | ขวา | ซ้าย               | ขวา |
| 1     | JSL9215            | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL91123           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
| 2     | JSL61119           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL61120           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
| 3     | JSL82116           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL92131           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL82134           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
| 4     | JSL8111            | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL5112            | -                                       | -   | 13.55            | 9.35 | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |

\*\*\*หมายเหตุ - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (ต่อ)

| กลุ่ม | หมายเลข<br>ไอโซเลท | ขอบเขตการยับยั้งเชื่อมทดสอบ (มิลลิเมตร) |     |                  |      |                    |     |                  |     |                      |     |                    |     |
|-------|--------------------|---|-----|------------------|------|--------------------|-----|------------------|-----|----------------------|-----|--------------------|-----|
|       |                    | <i>E. coli</i>                          |     | <i>S. aureus</i> |      | <i>B. subtilis</i> |     | <i>M. luteus</i> |     | <i>P. aeruginosa</i> |     | <i>C. albicans</i> |     |
|       |                    | ซ้าย                                    | ขวา | ซ้าย             | ขวา  | ซ้าย               | ขวา | ซ้าย             | ขวา | ซ้าย                 | ขวา | ซ้าย               | ขวา |
| 4     | JSL10113           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL31111           | -                                       | -   | 4.85             | 6.15 | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL32212           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL32213           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL32214           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL52129           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL82117           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL61130           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
| 5     | JSL82118           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL92135           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
| 6     | JSL10214           | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |
|       | JSL9216            | -                                       | -   | -                | -    | -                  | -   | -                | -   | -                    | -   | -                  | -   |

\*\*\* หมายเหตุ - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (ต่อ)

| กลุ่ม | หมายเลข<br>ไอโซเลท | ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มิลลิเมตร) |      |                  |       |                    |       |                  |      |                      |      |                    |       |
|-------|--------------------|--|------|------------------|-------|--------------------|-------|------------------|------|----------------------|------|--------------------|-------|
|       |                    | <i>E. coli</i>                         |      | <i>S. aureus</i> |       | <i>B. subtilis</i> |       | <i>M. luteus</i> |      | <i>P. aeruginosa</i> |      | <i>C. albicans</i> |       |
|       |                    | ซ้าย                                   | ขวา  | ซ้าย             | ขวา   | ซ้าย               | ขวา   | ซ้าย             | ขวา  | ซ้าย                 | ขวา  | ซ้าย               | ขวา   |
| 6     | JSL9217            | -                                      | -    | -                | -     | 8.15               | 7.50  | -                | -    | -                    | -    | 18.10              | 11.05 |
|       | JSL9228            | -                                      | -    | -                | -     | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | -                  | -     |
|       | JSL9219            | -                                      | -    | -                | -     | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | 20.10              | 12.15 |
|       | JSL32210           | -                                      | -    | -                | -     | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | -                  | -     |
|       | JSL82115           | -                                      | -    | -                | -     | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | -                  | -     |
|       | JSL41136           | -                                      | -    | -                | -     | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | -                  | -     |
| 7     | JSL92221           | 9.15                                   | 6.15 | 22.65            | 19.15 | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | -                  | -     |
|       | JSL92222           | -                                      | -    | -                | -     | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | 9.00               | 6.05  |
|       | JSL92232           | -                                      | -    | -                | -     | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | -                  | -     |
|       | JSL102226          | -                                      | -    | 4.55             | 4.00  | 10.45              | 11.15 | 5.55             | 3.05 | 7.55                 | 3.00 | -                  | -     |
|       | JSL92227           | -                                      | -    | -                | -     | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | -                  | -     |
|       | JSL92228           | -                                      | -    | -                | -     | -                  | -     | -                | -    | -                    | -    | -                  | -     |

\*\*\*หมายเหตุ - ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

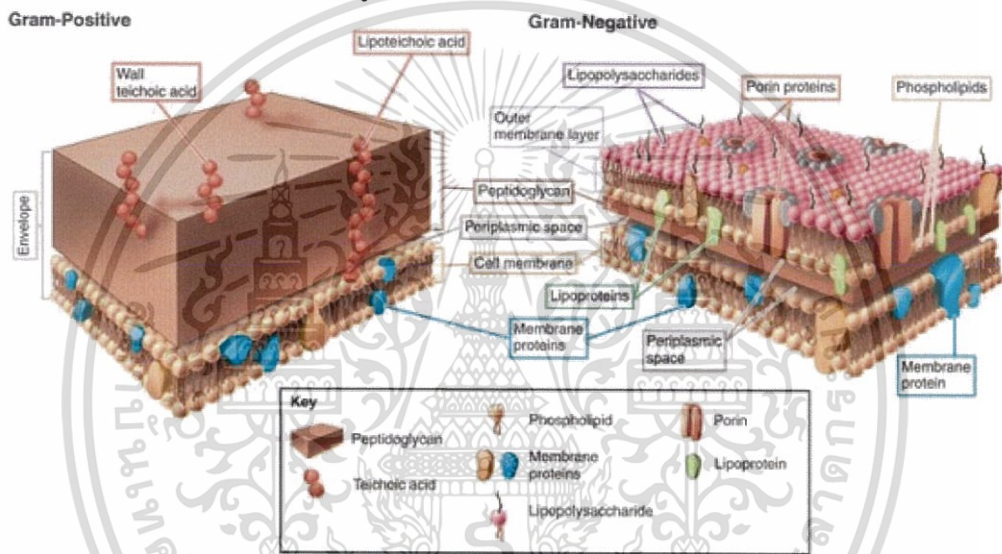
จากการทำการทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่ามีเชื้อแอกติโนมัยซีท 7 ไอโซเลทที่สามารถผลิตสารยับยั้งทางชีวภาพได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และจำนวนไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบต่างๆ แสดงดังต่อไปนี้

1. การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลท ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังนี้ JSL92221 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 7.65 มิลลิเมตร
2. การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบว่ามี 4 ไอโซเลท ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังนี้ JSL102226 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 4.27 มิลลิเมตร, JSL5112 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 11.45 มิลลิเมตร, JSL31111 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 5.5 มิลลิเมตร และ JSL92221 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 20.9 มิลลิเมตร
3. การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่ามี 2 ไอโซเลท ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังนี้ JSL102226 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 10.80 มิลลิเมตร และ JSL9217 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 7.82 มิลลิเมตร
4. การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* พบว่ามี 1 ไอโซเลท ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังนี้ JSL102226 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 4.3 มิลลิเมตร
5. การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่ามี 1 ไอโซเลท ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังนี้ JSL102226 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 5.27 มิลลิเมตร
6. การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* พบว่ามี 3 ไอโซเลท ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ ประกอบด้วยไอโซเลท ดังนี้ JSL9217 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 14.57 มิลลิเมตร, JSL9219 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 16.12 มิลลิเมตร และ JSL92222 มีค่าบริเวณยับยั้งเฉลี่ย เท่ากับ 7.52 มิลลิเมตร

จากการทดลองพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abussaud *et al.* (2010) โดยพบว่า 6 ไอโซเลทมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ นั่นคือ *E.coli* และทุกไอโซเลทมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก นั่นคือ *S.aureus* และมี 7 ไอโซเลทสามารถสร้างสารในการยับยั้งเชื้อราโดยมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. albicans* ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

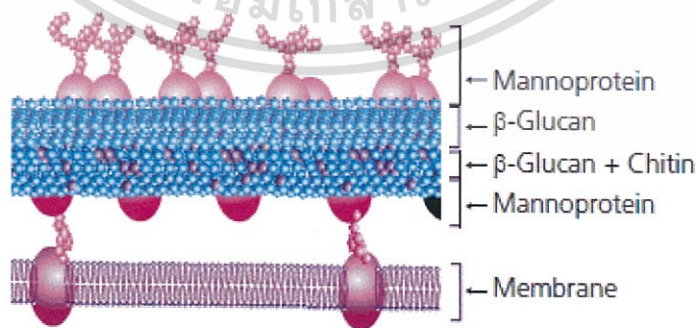
ผลจากการศึกษาการทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพเบื้องต้น (Pre-test) จะพบได้ว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกนั้นมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งสูงที่สุดมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ นั่นเป็นเพราะว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบนั้นมีความแข็งแรงมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบบมีเยื่อหุ้มชั้นนอกที่เป็นไขมันปกคลุมชั้น peptidoglycan มีลักษณะคล้ายแซนวิช และแบคทีเรียแกรมลบบยังมี lipopolysaccharide ที่เป็นผนังเซลล์ชั้นนอกและโปรตีนปกคลุมชั้นของ

peptidoglycan จึงทำให้ป้องกันยาปฏิชีวนะที่จะเข้ามาได้ (Audra *et al*, 2007; Beveridge, 1999) ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกจะมีชั้นของเพปติโดไกลแคนหนาล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ ไม่มีเมมเบรนต่อหุ้มรอบผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่ง (ดังรูปที่ 4.34) (พงชัย, 2555) ดังนั้นแบคทีเรียแกรมลบที่มีองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ที่มีความหนาแน่นมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (ฤทธิรงค์, 2548) จึงมีความสามารถในการทนทานต่อยาปฏิชีวนะซึ่งทำให้ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพเบื้องต้น (Pre-test) ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์นั้นประกอบด้วย เบต้า-กลูแคน 30-34 %, แมนแนน 31 %, และโคติน 5-8 % รวมถึง สารประเภทอื่นๆ ได้แก่ โปรตีน 13 % และไขมัน 9 % (สายสมร, 2560) (ดังรูปที่ 4.35)



รูปที่ 4.35 แสดงรูปผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก และผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา : <http://mybioblogpro.blogspot.com/2015/07/what-is-gram-negative-bacteria.html>



รูปที่ 4.36 แสดงรูปผนังเซลล์ของยีสต์

ที่มา : <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biofiles/antifungals.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.8 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเทคนิค Agar disc diffusion

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ทำการคัดเลือกไว้โดยวิธีการทดสอบการออกฤทธิ์เบื้องต้น จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ JSL102226, JSL51112, JSL31111, JSL9217, JSL9219, JSL92221 และ JSL92222 มาทำการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเทคนิค Agar disc diffusion โดยนำส่วนของน้ำหมักและส่วนของตัวเซลล์มาสกัดด้วย เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบด้วยเทคนิค Agar disc diffusion โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นดิสก์ whatman ขนาด 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ คือ *Escherichia coli* ATCC 074, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370, *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Candida albicans* ATCC 5239



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion

| หมายเลข<br>ไอโซเลท | ความเข้มข้น<br>(50 mg/ml) | บริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร) |                  |                    |                 |                      |                    |
|--------------------|---------------------------|---|------------------|--------------------|-----------------|----------------------|--------------------|
|                    |                           | <i>E. coli</i>                                | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>M. uteus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
| JSL5112            | น้ำหมัก                   | -   | 10.02            | -                  | -               | -                    | -                  |
|                    | ตัวเซลล์                  | -   | -                | -                  | -               | -                    | -                  |
| JSL9217            | น้ำหมัก                   | -   | -                | 8.12               | -               | -                    | -                  |
|                    | ตัวเซลล์                  | -   | -                | -                  | -               | -                    | -                  |
| JSL9219            | น้ำหมัก                   | -   | -                | -                  | -               | -                    | -                  |
|                    | ตัวเซลล์                  | -   | -                | -                  | -               | -                    | -                  |
| JSL31111           | น้ำหมัก                   | -   | -                | -                  | -               | -                    | -                  |
|                    | ตัวเซลล์                  | -   | -                | -                  | -               | -                    | -                  |
| JSL92221           | น้ำหมัก                   | 8.09  | -                | -                  | -               | -                    | -                  |
|                    | ตัวเซลล์                  | -   | -                | -                  | -               | -                    | -                  |

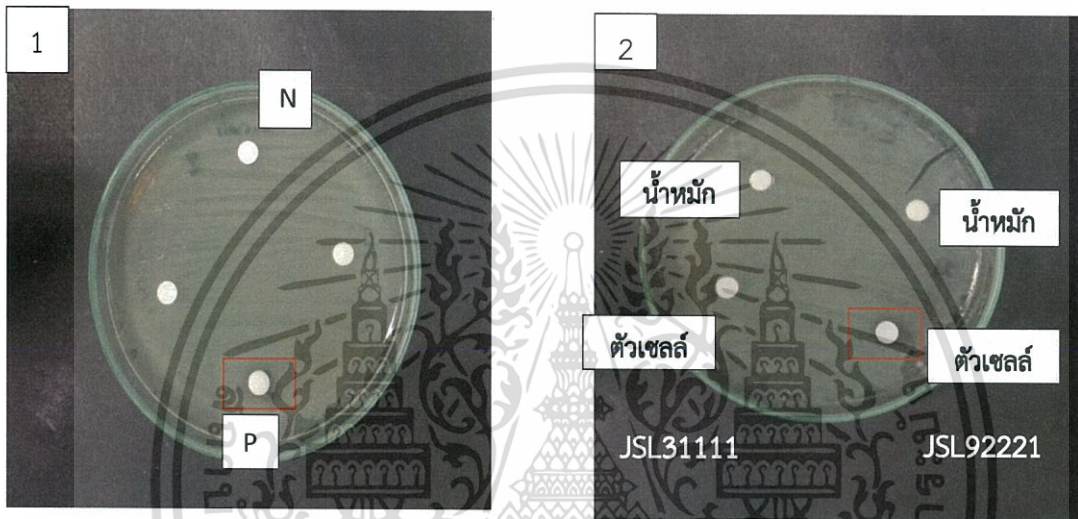
\*\*\*หมายเหตุ B= สารสกัดหยาบส่วนของน้ำหมัก, C= สารสกัดหยาบส่วนของเซลล์และเส้นใย, -= ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

ตารางที่ 4.10 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีท ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion (ต่อ)

| หมายเลข<br>ไอโซเลท | ความเข้มข้น<br>(50 mg/ml) | บริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร) |                  |                    |                  |                      |                    |
|--------------------|---------------------------|---|------------------|--------------------|------------------|----------------------|--------------------|
|                    |                           | <i>E. coli</i>                                | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>M. luteus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
| JSL92222           | น้ำหมัก                   | -   | -                | -                  | -                | -                    | -                  |
|                    | ตัวเซลล์                  | -   | -                | -                  | -                | -                    | -                  |
| JSL102226          | น้ำหมัก                   | -   | -                | -                  | -                | 7.22                 | -                  |
|                    | ตัวเซลล์                  | -   | -                | -                  | -                | -                    | -                  |

\*\*\*หมายเหตุ B= สารสกัดหยาบส่วนของน้ำหมัก, C= สารสกัดหยาบส่วนของเซลล์และเส้นใย, -= ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

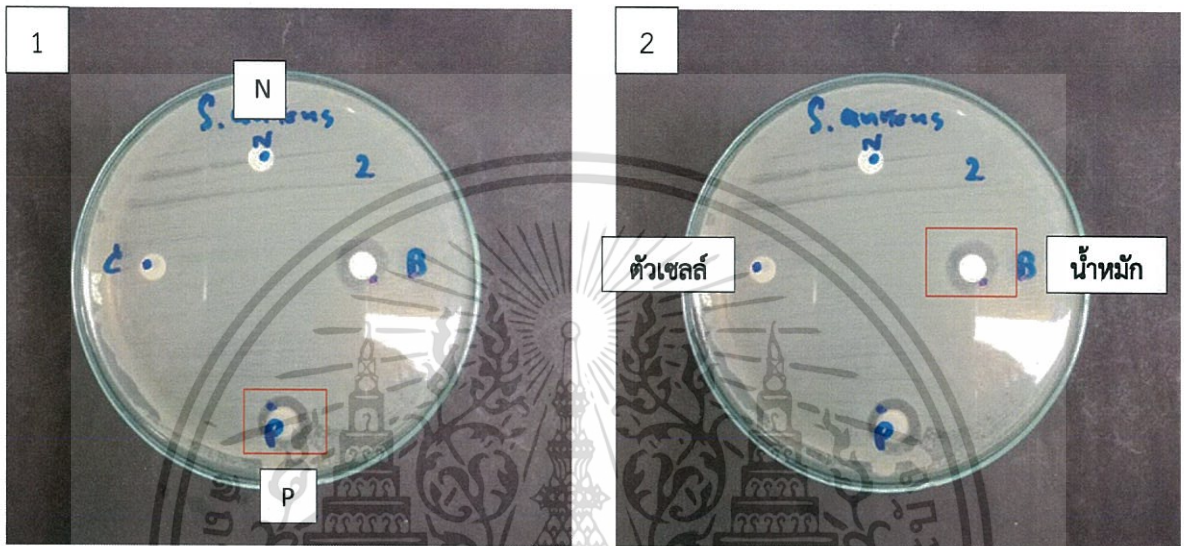
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 074 ของเชื้อแอกติโนมัยซีท หมายเลข JSL5112, JSL9217, JSL9219, JSL31111, JSL92222 และ JSL102226 พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนอาหาร Muller-Hinton agar จากทั้งสารสกัดหยาบส่วนของน้ำหมักและส่วนเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีท และเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL92221 พบว่ามีวงใส (Clear zone) บนอาหาร Muller-Hinton agar จากสารสกัดหยาบส่วนของตัวเซลล์ โดยมี positive control เป็นยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 1.5 µg/ml และมี negative control เป็น methanol



**รูปที่ 4.37** (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 074 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 074 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL92221 ในส่วนของตัวเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

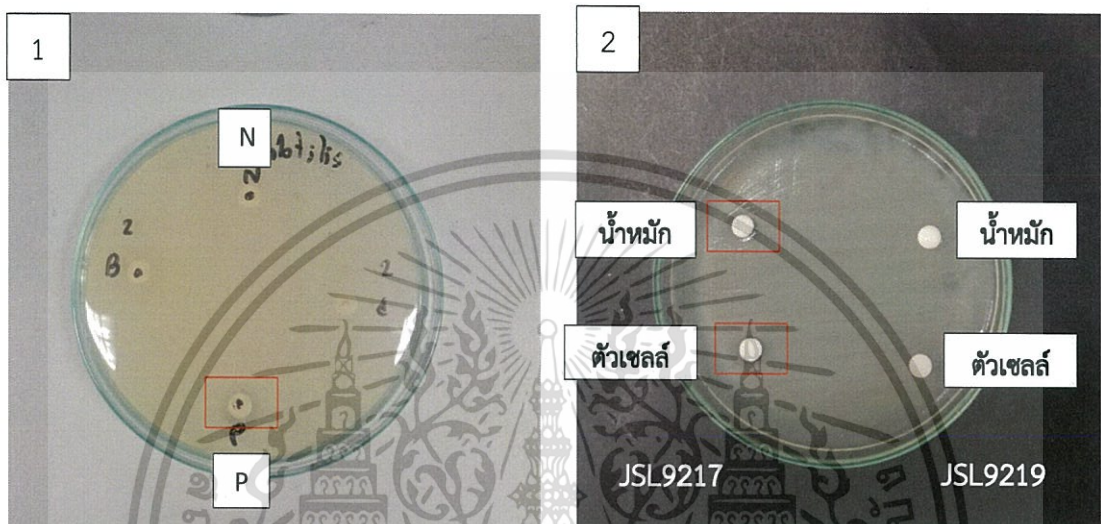
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 พบว่าแอสติโนมัยซีทหมายเลข JSL5112 เกิดวงใส (Clear zone) บนอาหาร Muller-Hinton agar จากสารสกัดหยาบของน้ำหมัก โดยมี positive control เป็นยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 1.5  $\mu\text{g/ml}$  และมี negative control เป็น methanol



**รูปที่ 4.38** (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 74648 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ของเชื้อแอสติโนมัยซีทหมายเลข JSL5112 ในส่วนของน้ำหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

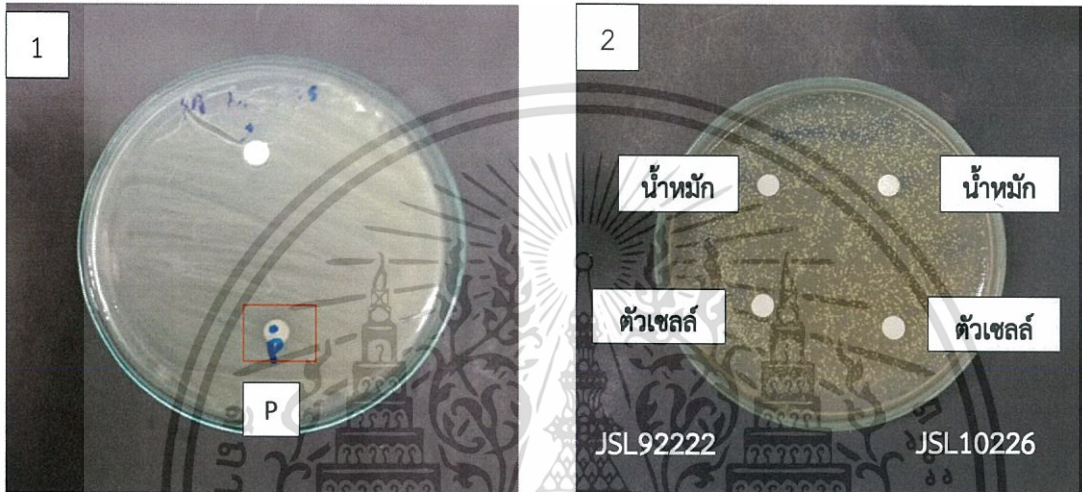
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 1248 พบว่าแอสติโนมายซีท หมายเลข JSL9217 เกิดวงใส (Clear zone) บนอาหาร Muller-Hinton agar จากสารสกัดหยาบส่วนของน้ำหมัก โดยมี positive control เป็นยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 1.5  $\mu\text{g/ml}$  และมี negative control เป็น methanol



**รูปที่ 4.39** (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 1248 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 1248 ของเชื้อแอสติโนมายซีทหมายเลข JSL9217 ในส่วนของน้ำหมัก และส่วนของตัวเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

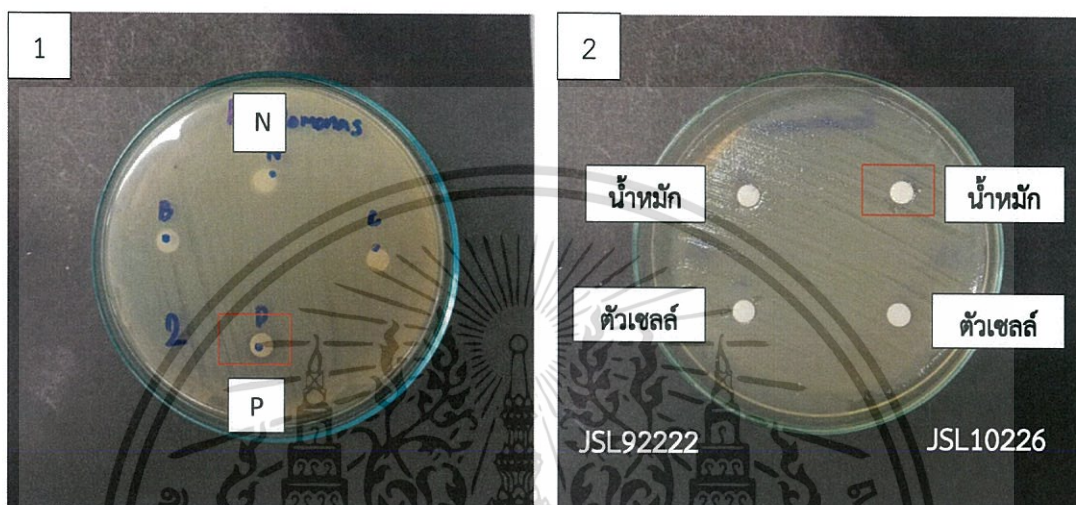
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL5112 JSL9217, JSL9219, JSL31111, JSL92221, JSL92222 และJSL102226 พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนอาหาร Muller-Hinton agar จากทั้งสารสกัดหยาบส่วนของน้ำหมัก และส่วนเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีท โดยมี positive control เป็นยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 1.5 µg/ml และมี negative control เป็น methanol



**รูปที่ 4.40** (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทหมายเลข JSL102222 และหมายเลข JSL102226 ในส่วนของน้ำหมัก และส่วนของตัวเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

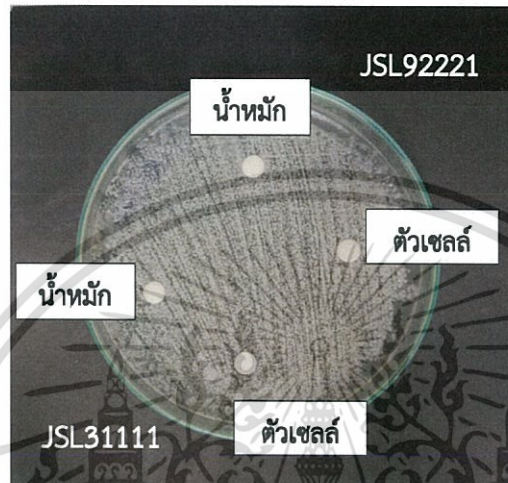
จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 พบว่าแอคติโนไมซีทหมายเลข JSL102226 เกิดวงใส (Clear zone) บนอาหาร Muller-Hinton agar จากสารสกัดหยาดส่วนของน้ำหมัก โดยมี positive control เป็นยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 1.5  $\mu\text{g/ml}$  และมี negative control เป็น methanol



**รูปที่ 4.41** (1) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 ของ positive control (P) และ negative control (N), (2) แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 ของเชื้อแอคติโนไมซีทหมายเลข JSL102226 ในส่วนของน้ำหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 5239 ของเชื้อแอคติโนมัยซีท หมายเลข JSL5112, JSL9217, JSL9219, JSL31111, JSL92221, JSL92222 และ JSL102226 พบว่าไม่เกิดวงใส (Clear zone) บนอาหาร Muller-Hinton agar จากทั้งสารสกัดหยาบส่วนของน้ำหมักและส่วนเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีท



**รูปที่ 4.42** แสดงผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 5239 ของเชื้อแอคติโนมัยซีทหมายเลข JSL31111 และหมายเลข JSL92221 ในส่วนของน้ำหมัก และส่วนของตัวเซลล์

การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเทคนิค Agar disc diffusion พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ สามารถออกฤทธิ์ได้ดีเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก แต่เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบกลับมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ไม่ดี ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบมีความแตกต่างกัน

เนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะโดยแอคติโนมัยซีท เป็นการผลิตสารที่ไม่จำเป็นต้องการเจริญหรือการดำรงชีวิต แต่สร้างเพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งสารปฏิชีวนะนี้จัดเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) โดยสร้างขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญในระยะ Stationary phase ซึ่งเป็นช่วงสุดท้ายของการเจริญ สารปฏิชีวนะนั้นผลิตได้ในปริมาณน้อยต่างจากสาร (Primary Metabolite) ที่เชื้อสามารถผลิตได้ปริมาณมากในระยะต้นของการเจริญเติบโต (สุจรรนา, 2556)

## 4.9 ผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทเริ่มจากการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะจำนวน 7 ไอโซเลท จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Yeast extract-malt extract agar (YEME) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำไปมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Sterile blade) ค่อยๆ ขูดเชื้อแอกติโนมัยซีทออกจากผิวหน้าอาหาร นำใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) จากนั้นทำการสกัดฟอสโฟลิปิด (ดังวิธีการทดลองที่ 3.11.1) จากนั้นนำไปสกัดฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วยการเติม คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เพื่อให้เซลล์แตก และทำการระเหยแห้ง นำส่วนที่เหลือมาทำการ resuspension ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 6-10 ไมโครลิตร จากนั้นใช้อ้อโต้ปีเปตดูดสารที่ใส่มาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาด 20 X 20 เซนติเมตร ยี่ห้อ Merck ครั้งละ 2 ไมโครลิตร จนครบ 60 ไมโครลิตร โดยทำการจุดสารมาตรฐาน ได้แก่ L- $\alpha$  phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt from egg yolk lecithin (PG), 3-sn phosphatidylethanolamine from bovine brain (PE), cardiolipin sodium from bovine heart (CL) เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบกับ unknown spot

Mobile phase ที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:12:15:4 ปริมาตร/ปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่น TLC ที่สปอตแล้วมาใส่ไว้ใน tank ปล่อยให้แห้งให้สารละลายพาตัวอย่างขึ้นมาจนประมาณ 3 ส่วน 4 ของความสูงของแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ออก ตั้งทิ้งไว้ให้แผ่น TLC แห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำแผ่นไปฉีดพ่นด้วย Molybdenum blue spray reagent จากนั้นทิ้งไว้จนเห็นจุด (spot) ของฟอสโฟลิปิดบนแผ่น TLC จากนั้นให้ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดต่างๆ บนแผ่น TLC แล้วจึงวัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่ เพื่อใช้ในการคำนวณ หาค่า  $R_f$

จากการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีท 7 ไอโซเลท มาทำ Thin layer chromatography สามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 4.42 ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบกับจุด unknown spot กับ standard ที่ได้หยดไว้ซึ่งจะเกิด 3 สปอตเรียงกันได้แก่ CL PE และ PG ตามลำดับ จุด standardที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการเปรียบเทียบเป็นจุดอ้างอิงและใช้ในการระบุชนิดของฟอสโฟลิปิดของสารตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษา

ผลการศึกษาการทำ TLC และฉีดพ่นด้วย Molybdenum blue spray reagent เมื่อทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที จะเห็นจุดสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC ซึ่งเป็นสเปคของตัวอย่างของไอโซเลทหมายเลข JSL5112, JSL9217, JSL9219, JSL31111, JSL92221, JSL92222 และ JSL102226 โดยแต่ละไอโซเลทมีผลของฟอสโฟลิปิด โดยผลการทดลองนี้ยังได้ทำการเทียบระยะพา ( $R_f$ ) ของสารละลายฟอสโฟลิปิดชนิด PS และ PI ของงานวิจัย Klanbut (2013) (ดังรูปที่ 4.43) ได้ผลดังต่อไปนี้

ไอโซเลทหมายเลข JSL5112 พบว่ามีฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG) Phosphatidylethaolamine (PE) Cardiolipin (CL) นอกจากนี้คาดว่าจะยังพบ Phosphatidylserine (PS) และอนุพันธ์ของ PE เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Standard)

ไอโซเลทหมายเลข JSL9217 พบว่ามีฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethaolamine (PE) และ Cardiolipin (CL) นอกจากนี้คาดว่าจะยังพบ Phosphatidylserine (PS) และ อนุพันธ์ของ PE เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Standard)

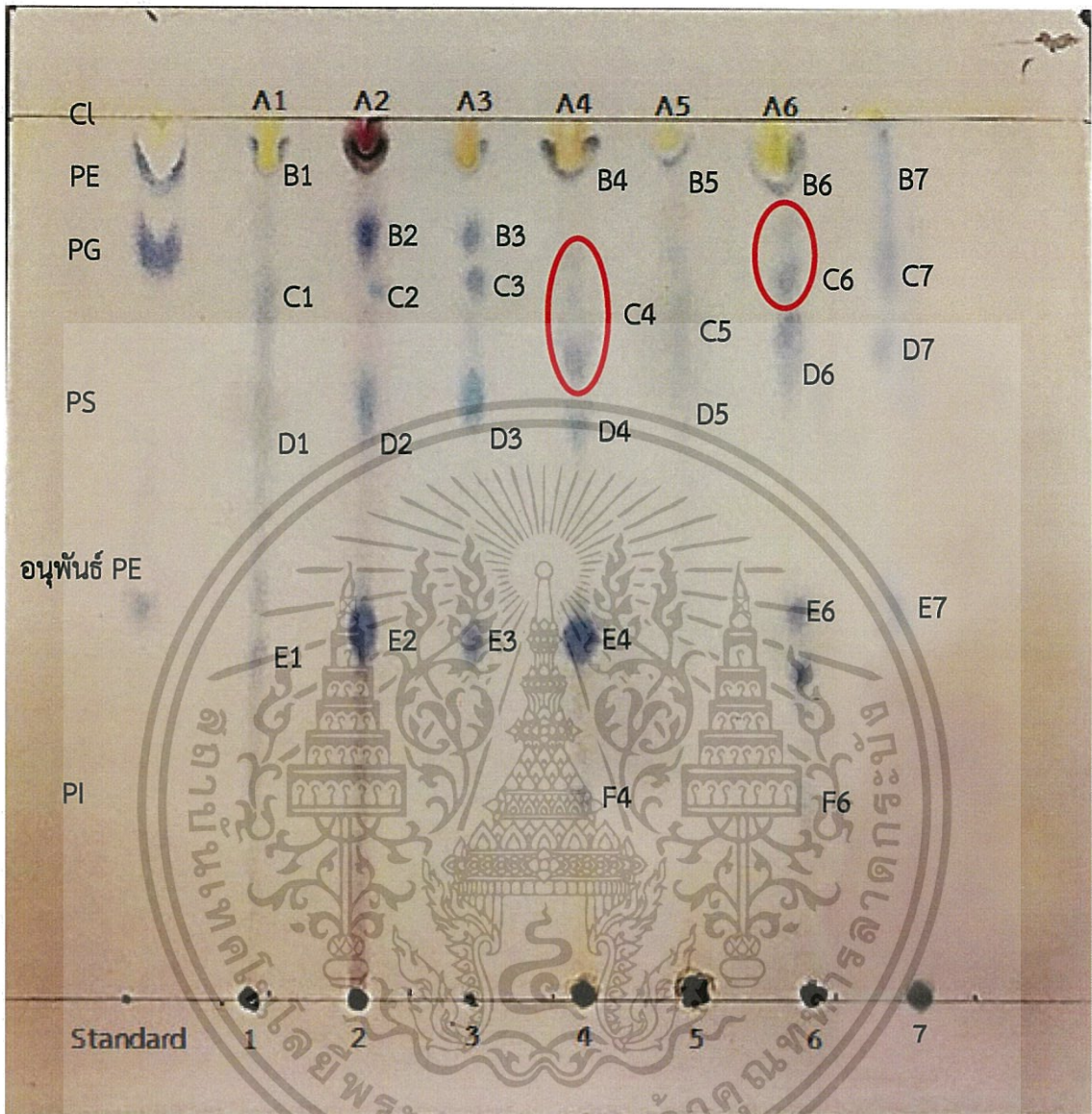
ไอโซเลทหมายเลข JSL9219 พบว่ามีฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethaolamine (PE) และ Cardiolipin (CL) นอกจากนี้คาดว่าจะยังพบ Phosphatidylserine (PS) และอนุพันธ์ของ PE เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Standard)

ไอโซเลทหมายเลข JSL31111 พบว่ามีฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethaolamine (PE) และ Cardiolipin (CL) นอกจากนี้คาดว่าจะยังพบ Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylinositol (PI) และอนุพันธ์ของ PE เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Standard)

ไอโซเลทหมายเลข JSL92221 พบว่ามีฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylethaolamine (PE) และ Cardiolipin (CL) นอกจากนี้คาดว่าจะยังพบ Phosphatidylserine (PS) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Standard)

ไอโซเลทหมายเลข JSL92222 พบว่ามีฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethaolamine (PE) และ Cardiolipin (CL) นอกจากนี้คาดว่าจะยังพบ Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylinositol (PI) และอนุพันธ์ของ PE เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Standard)

ไอโซเลทหมายเลข JSL102226 พบว่ามีฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG) และ Phosphatidylethaolamine (PE) นอกจากนี้คาดว่าจะยังพบ Phosphatidylserine (PS) และอนุพันธ์ของ PE เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Standard)



**รูปที่ 4.43** แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโตกราฟที่เทียบกับสารมาตรฐาน(Standard) ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลทหมายเลข JSL5112 (1), JSL9217 (2), JSL9219 (3), JSL31111 (4), JSL92221 (5), JSL92222 (6) และJSL102226 (7) ที่ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast extract-malt extract agar (YEME)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการคำนวณค่า Rate of flow ( $R_f$ ) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากบริเวณที่ได้ทำการสเปดสารตัวอย่าง เทียบกับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Solvent front) โดยตัวทำละลายที่เป็น Mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:12:15:4 ปริมาตร/ปริมาตร ตามลำดับ สารแต่ละชนิดจะมีค่า  $R_f$  คงที่เสมอ ดังนั้นค่า  $R_f$  จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการพิสูจน์ชนิดของสาร ในการคำนวณหาค่า  $R_f$  ของสารจะหาได้จากอัตราส่วนระยะทางที่สารเคลื่อนที่เทียบกับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ผลของค่า  $R_f$  ของแต่ละไอโซเลทแสดงดังตารางที่ 4.11

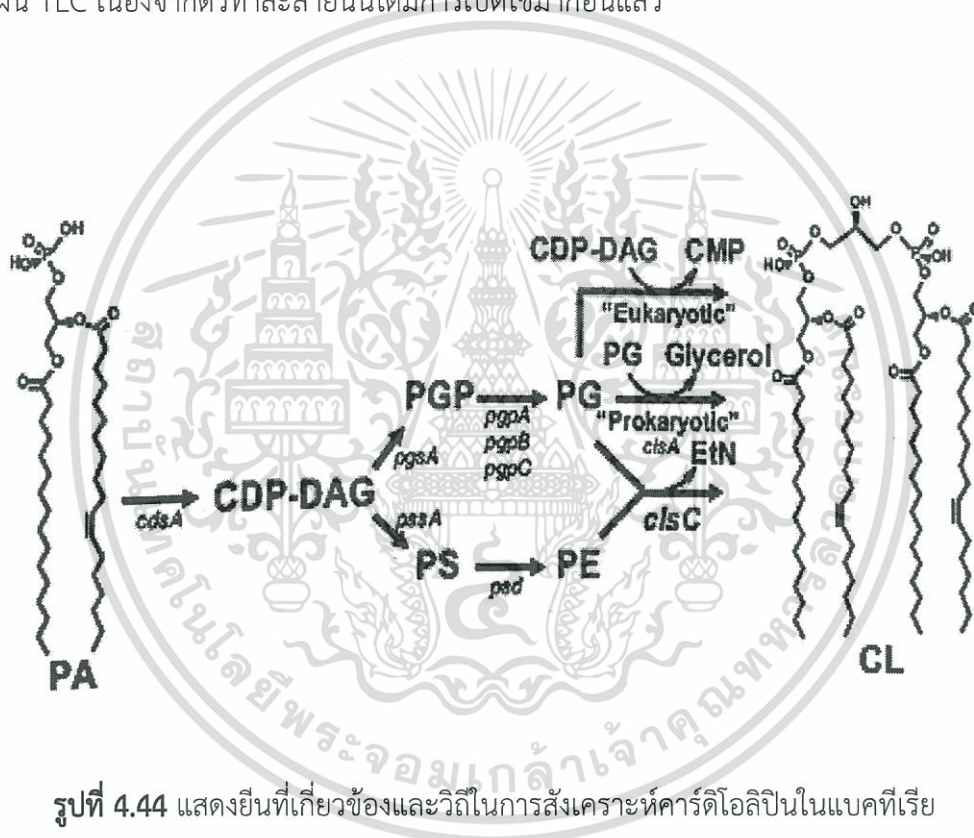
**ตารางที่ 4.11** แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีทที่ถูกคัดเลือก 7 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

| หมายเลขไอโซเลท | ชนิดของฟอสโฟลิปิด         |           |                               |           |                  |           |
|----------------|---------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|------------------|-----------|
|                | Phosphatidylglycerol (PG) |           | Phosphatidylethanolamine (PE) |           | Cardiolipin (CL) |           |
|                | ตำแหน่ง                   | ค่า $R_f$ | ตำแหน่ง                       | ค่า $R_f$ | ตำแหน่ง          | ค่า $R_f$ |
| Standard       | PG                        | 0.82      | PE                            | 0.93      | CL               | 0.99      |
| JSL5112        | C1                        | 0.82      | B1                            | 0.93      | A1               | 0.98      |
| JSL9217        | C2                        | 0.83      | B2                            | 0.88      | A2               | 0.97      |
| JSL9219        | C3                        | 0.83      | B3                            | 0.88      | A3               | 0.97      |
| JSL31111       | C4                        | 0.76      | B4                            | 0.85      | A4               | 0.98      |
| JSL92221,      | C5                        | 0.80      | B5                            | 0.94      | A5               | 0.97      |
| JSL92222       | C6                        | 0.84      | B6                            | 0.93      | A6               | 0.99      |
| JSL102226      | C7                        | 0.83      | B7                            | 0.92      | -                | -         |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากทฤษฎีการสร้างฟอสโฟลิปิดในแบคทีเรียพบว่า การที่จะสังเคราะห์ CL ได้นั้นจะต้องมีสารตั้งต้นที่เป็น PG และ PE ก่อน ดังรูปที่ 4.42 ดังนั้นหากเกิดสเปคตรัม TLC นั้นแสดงว่ามีการเปลี่ยน PG และ PE เพื่อที่จะสังเคราะห์ CL เนื่องจากการที่จะสังเคราะห์ CL นั้น จะต้องอาศัยตัวกลางที่เป็น PG และ PE (Tan *et al.*, 2012)

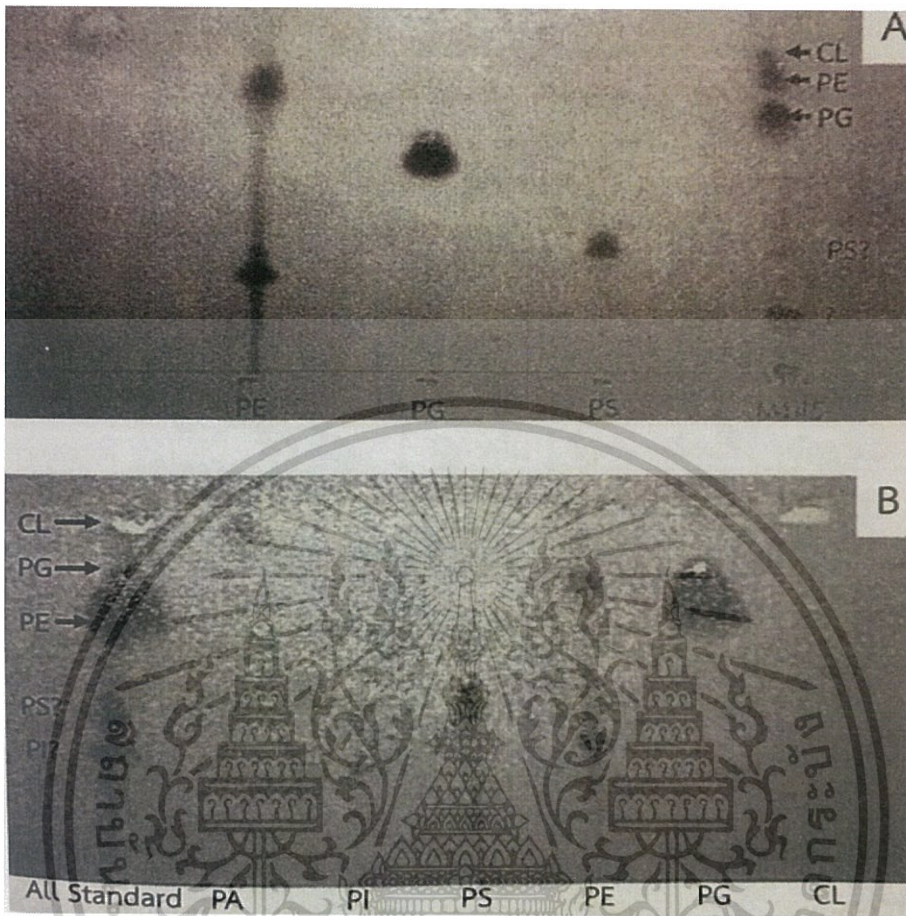
จากการทดลองข้างต้นนั้นพบว่า บางสเปคตรัมของฟอสโฟลิปิดนั้นยังไม่ค่อยชัดเจนเนื่องจากปริมาณของตัวเซลล์นั้นน้อยเกินไปไม่ถึง 100 มิลลิกรัม จึงส่งผลให้เกิดจางๆไม่เข้มเท่าที่ควร นอกจากนี้ยังเกิดลายน้ำบนแผ่น TLC เนื่องจากตัวทำละลายนั้นได้มีการเปิดใช้มาก่อนแล้ว



รูปที่ 4.44 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องและวิถีในการสังเคราะห์คาร์ดิโอลิพินในแบคทีเรีย

(Tan *et al.*, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.45** แสดงระยะการพา ( $R_f$ ) ของสารละลายฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน (PLs standard)

A: แผ่นโครมาโตกราฟฟีแสดงตำแหน่งของฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน 4 ชนิด Phosphatidic acid (PA), phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE) และ Cardiolipin (CL) ช่องที่ 1, 2, 3, 4 และช่องที่ 5 เมื่อจุดสารละลายตัวอย่างทั้ง 4 จุด ในจุดเดียวกัน จากนั้นปล่อยให้สาร developed ในสารละลายคลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:12:15:4 ปริมาตร/ปริมาตร ตามลำดับ

B: แผ่นโครมาโตกราฟฟีแสดงตำแหน่งของฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน 6 ชนิด Phosphatidic acid (PA), phosphatidylinositolmannosides (PI), Phosphatidylserine (PS), phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE) และ Cardiolipin (CL) โดยช่องที่ 1 เป็นการสเปดสารละลายตัวอย่างทั้ง 6 ชนิดภายในจุดเดียวกัน ส่วนในช่องที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เป็นการสเปดฟอสโฟลิปิดมาตรฐานแบบแยกจุด จากนั้นปล่อยให้สาร developed ในสารละลายคลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:12:15:4 ปริมาตร/ปริมาตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.10 รวมผลการทดลองของเชื้อแอกติโนมัยซีททั้ง 7 ไอโซเลทที่ได้รับการคัดเลือก

จากการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น (Pre-test) สามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท 7 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบโดยการสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักของเชื้อแอกติโนมัยซีท

หมายเลขไอโซเลท JSL5112 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อย ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง ครั้งที่ 2 เมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2561 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 5 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 5.338 กรัม และอุณหภูมิ ณ จุดเก็บอยู่ที่ 52 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแอกติโนมัยซีทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสี และรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร และใต้อาหาร โดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/ISCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค Slide culture พบว่าแอกติโนมัยซีทสร้างเส้นใยอาหารสี Yellowish Gray เส้นใยใต้อาหารสี Deep Brown สร้างรงควัตถุสี Light Olive Brown และมีลักษณะเป็นสปอร์คล้ายขอบนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) และทำการศึกษาชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยแป้ง การย่อยเจลาติน ผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซโลสได้ นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลทนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 4.46 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL5112

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL5112บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL5112 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL5112 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

หมายเลขไอโซเลท JSL9217 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อย ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง ครั้งที่ 2 เมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2561 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 9 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 5.798 กรัม และอุณหภูมิ ณ จุดเก็บอยู่ที่ 53 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแอกติโนมัยซีทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสี และรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหาร และได้ผิวอาหาร โดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/ISCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค Slide culture พบว่าแอกติโนมัยซีทมีการสร้างเส้นใยอากาศสี Light Olive เส้นใยใต้อาหารสี Light Olive สร้างรงควัตถุสี Brilliant Greenish Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยแป้ง การย่อยโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar และสามารถใช้น้ำตาลแลคโตส ซูโครส ไซโลส และแมนนิทอลได้นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลทนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Candida albicans*



**รูปที่ 4.47** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9217

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9217 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9217 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9217 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

หมายเลขไอโซเลท JSL9219 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ็อน ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง ครั้งที่ 2 เมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2561 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 9 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 5.798 กรัม และอุณหภูมิ ณ จุดเก็บอยู่ที่ 53 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแอกติโนมัยซีทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสี และรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร และใต้ผิวหนังอาหาร โดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/ISCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค Slide culture พบว่าแอกติโนมัยซีทมีการสร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Olive เส้นใยใต้อาหารสี Dark Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่สามารถละลายน้ำได้ และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยแป้ง การย่อยโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส ซูโครส โซโลส และแมนนิทอลได้ นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลทนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans*



**รูปที่ 4.48** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9219

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9219 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9219 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL9219 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

หมายเลขไอโซเลท JSL31111 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อย ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง ครั้งที่ 2 เมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2561 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 9 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 6.093 กรัม และอุณหภูมิ ณ จุดเก็บอยู่ที่ 61 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแอกติโนมัยซีทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสี และรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร และใต้อาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/ISCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค Slide culture พบว่าแอกติโนมัยซีทมีการสร้างเส้นใยอากาศสี Grayish Olive เส้นใยใต้อาหารสี Deep Yellow สร้างรงควัตถุสี Brilliant Moderate Yellow และมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยวแบบ Monosporous บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส แลคโตส ซูโครส ไซโลส และแมนนิทอลได้ นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลทนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 4.49 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL31111 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

หมายเลขไอโซเลท JSL92221 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อย ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง ครั้งที่ 2 เมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2561 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 9 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 6.728 กรัม และอุณหภูมิ ณ จุดเก็บอยู่ที่ 52 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแอกติโนมัยซีทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสี และรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหาร และได้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/ISCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค Slide culture พบว่าแอกติโนมัยซีทสร้างเส้นใยอาหารสี Light Gray สร้างเส้นใยใต้อาหารสี Moderate Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ มีลักษณะเป็นสปอร์คล้ายอบบนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยแป้ง การย่อยเจลาติน สามารถรีดิวซ์ไนเตรทผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสได้ นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลทนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 4.50 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221

(ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92221 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

หมายเลขไอโซเลท JSL92222 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อย ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง ครั้งที่ 2 เมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2561 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 9 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 6.728 กรัม และอุณหภูมิ ณ จุดเก็บอยู่ที่ 52 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแอกติโนมัยซีทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสี และรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหาร และได้ผิวอาหาร โดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/ISCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค Slide culture พบว่าแอกติโนมัยซีทสร้างเส้นใยอาหารสี Medium Gray สร้างเส้นใยใต้อาหารสี Brilliant Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ มีลักษณะเป็นสปอร์คล้ายขอบนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการย่อยแป้ง ผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสได้ นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลทนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans*



**รูปที่ 4.51** ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92222

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92222 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92222 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL92222 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100

หมายเลขไอโซเลท JSL102226 เป็นเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อ ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง ครั้งที่ 2 เมื่อ 11 กุมภาพันธ์ 2561 ณ จุดเก็บตัวอย่างที่ 10 โดยตัวอย่างดินมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ มีน้ำหนักของตัวอย่างดินอยู่ที่ 5.897 กรัม และอุณหภูมิ ณ จุดเก็บอยู่ที่ 49.5 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแอกติโนมัยซีทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยสังเกตสี และรงควัตถุของโคโลนีที่เจริญบนผิวอาหาร และได้ผิวอาหารโดยการเปรียบเทียบกับระบบสี The NBS/ISCC Color System และสังเกตลักษณะของสปอร์ด้วยเทคนิค Slide culture พบว่าแอกติโนมัยซีทสร้างเส้นใยอาหารสี Light Gray สร้างเส้นใยใต้อาหารสี Moderate Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ มีลักษณะเป็นสปอร์คล้ายขอบนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทมีความสามารถในการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้ง 5 ชนิด นอกจากนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลทนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa*



รูปที่ 4.52 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL102226

- (ก) ลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL102226บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL102226 บนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ระยะเวลา 14 วัน
- (ค) ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท JSL102226 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 100 เท่า

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อแอสโตโมนัสซีทจากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง พบว่า สามารถแยกเชื้อแอสโตโมนัสซีทได้ 33 ไอโซเลท เจริญบนอาหาร Yeast extract Malt extract (YEME) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี ทดสอบการเจริญของเชื้อแอสโตโมนัสซีทที่อุณหภูมิต่างๆทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น และทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสโตโมนัสซีทที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า แอสโตโมนัสซีทสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น พบว่า จากการคัดแยกแอสโตโมนัสซีททั้งหมด 33 ไอโซเลท มีเพียง 7 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังนี้

เชื้อแอสโตโมนัสซีท ไอโซเลทที่ JSL5112 สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้เฉลี่ย 11.45 มิลลิเมตร

เชื้อแอสโตโมนัสซีท ไอโซเลทที่ JSL9217 สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 1248 ได้เฉลี่ย 7.5 มิลลิเมตร และเชื้อ *Candida albicans* ATCC 5239 ได้เฉลี่ย 14.5 มิลลิเมตร

เชื้อแอสโตโมนัสซีท ไอโซเลทที่ JSL9219 สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 5239 ได้เฉลี่ย 16.13 มิลลิเมตร

เชื้อแอสโตโมนัสซีท ไอโซเลทที่ JSL31111 สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้เฉลี่ย 5.5 มิลลิเมตร

เชื้อแอสโตโมนัสซีท ไอโซเลทที่ JSL92221 สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 074 ได้เฉลี่ย 7.65 มิลลิเมตร และเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้เฉลี่ย 20.9 มิลลิเมตร

เชื้อแอสโตโมนัสซีท ไอโซเลทที่ JSL92222 สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 5239 ได้เฉลี่ย 7.77 มิลลิเมตร

เชื้อแอสโตโมนัสซีท ไอโซเลทที่ JSL102226 สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้เฉลี่ย 4.28 มิลลิเมตร และเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 1248 ได้เฉลี่ย 11.05 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้เฉลี่ย 8.6 มิลลิเมตร และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 ได้เฉลี่ย 5.28 มิลลิเมตร

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อแอกติโนมัยซีท 5 ไอโซเลท มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* TISTR118 *Bacillus subtilis* ATCC 1248 *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และนอกจากนี้แอกติโนมัยซีทเพียง 2 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

ผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดที่ทำการเก็บเกี่ยวในวันที่ 7 พบว่าเชื้อมีฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE) และ Cardiolipin (CL) นอกจากนี้พบว่ายังพบ Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylinositol (PI) และอนุพันธ์ของ PE

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องปัจจัยหรือสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีท เพื่อให้ได้สารในปริมาณที่มากยิ่งขึ้นและสอดคล้องกับการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์เบื้องต้น

5.2.2 เนื่องจากงานวิจัยนี้มีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งทางชีวภาพกับแบคทีเรียและยีสต์เท่านั้น จึงอยากให้มีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งกับเชื้อราเพิ่มขึ้น

5.2.3 จากศึกษาวิจัยในครั้งนี้ อยากให้มีการนำสารต่างๆที่แอกติโนมัยซีทผลิตขึ้น นำมาศึกษาและพัฒนาต่อไป เพื่อประยุกต์ใช้ให้เข้ากับทางอุตสาหกรรมมากยิ่งขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

- กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. (2555). "ความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียในดิน." รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- คณิงกานต์ กลั่นบุศย์. (2559). การเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหารเหลวและการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อ เอกสารประกอบการเรียนวิชาปฏิบัติการสรีรวิทยาของจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จามจุรี เกตุบัวขาว นิชาภา ชมภู สุพัตรา ชาวสวน. (2555). การคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากมูลสัตว์เพื่อใช้ในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรเบื้องต้น. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- จิตติ ท่าไว. (2557). *แอกติโนแบคทีเรียเทคนิคการแยกและคัดเลือกเชื้อ*. กรุงเทพฯ: แดเน็กซ์อินเตอร์คอร์ปอเรชั่น.
- ชฎฎากาญจน์ สิงห์โตทอง. (2557). *การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากพืชบางชนิดในมหาวิทยาลัยศิลปากรและคุณสมบัติทางชีวภาพ*. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา: ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. (2546). *แอกติโนมัยซีทที่หายากในดินจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกกราช และสถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณจากกลกิจ จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา.
- ธีระชัย ธนानันท์. (2541). *ปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยา*. ปทุมธานี: โครงการตำรา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต.
- ธนภพ โสทรโยม, เกศรินทร์ เพ็ชรรัตน์, นพพร สุกุลยืนยงสุข, ดวงกมล ตั้งสถิตพร, ดวงรัตน์ แซ่ตั้ง และกิตติ ช้องประเสริฐ. (2558). *การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย Escherichia coli และ Salmonella spp. ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่*. คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.
- นวลรัตน์ หนูขาว. (2554). การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Ralstonia solanacearum ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- นิตยา รัตนานนท์ และ พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์. (2012). foodnetworksolution. เข้าถึงได้จาก Food Network Solution: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1093/phospholipid->
- ประสงค์ หล้าสะอาด และ จิตรเกษม หล้าสะอาด. (2557). *คัมภีร์ชีววิทยา*. กรุงเทพฯ: พ.ศ พัฒนา,บจก. สนพ.
- พงษ์ หาญยุทธนากร. (2555). โครงสร้างและหน้าที่ของผนังเซลล์. *คู่มือประกอบสื่อการสอน วิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม.*
- ภาวดีกัญญา ปัญจวัฒน์,. (2555). Brian metabolism. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ยุวดี มหาศักดิ์สิริ. (2546). "การแยกแอสตีโนมายซีทีที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินรังปลวกในประเทศไทย." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา,จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนารณ ศรีวิบูลย์, มรกต สุขโชติรัตน์ และ ชินจิ โตกุยามา. (2548). "แอสตีโนมายซีทีสายพันธุ์ใหม่จากดินชายฝั่งทาสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา." ใน 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology,18-20 October 2005.
- ฤทธิรงค์ พรหมมาศ, พงษ์เทพ วิไลพันธ์ และ พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์. (2548). *การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพจากฟองน้ำทะเล*. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- ลลิตา วัชงเงิน. (2554). "การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอสตีโนมายซีทีหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ลักษมี ศุกระกาญจนะ. (2556). *การคัดแยกและการศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอสตีโนมายซีทีที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ*. ปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตมหาวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- วาสิณี ธรรมสถิต, ศุจินันท์ ยาประเสริฐ และเมธี เอกเสวตอนันต์. (2552). การแยกและการตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอสตีโนมายซีทีที่แยกได้จากบริเวณบ่อน้ำพุร้อนจังหวัดกระบี่. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วิมลมาศ โพธิ์รัมย์. (2555). *การวิเคราะห์หมีกีสได้จากปากกาลูกกลิ้งด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีและการวิเคราะห์ภาพ*. มหาวิทยาลัยศิลปากร: ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สายพิน ไชยน์นันทน์. (2547). *จุลินทรีย์ดิน*. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สายสมร โพธิระหงษ์ และ ฉลอง วชิราภากร. (2560). ผลของการเสริมผนังเซลล์ยีสต์ต่อผลผลิตแก๊สและการย่อยได้โดยใช้เทคนิคการวัดผลผลิตแก๊สในหลอดทดลอง. *แก่นเกษตร*, 53-57.
- สุจรรยา ฉายแสง. (2556). "การแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีสจากข้าวและกระชาย : สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์การต้านอนุมูลอิสระและการต้านเซลล์มะเร็ง" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร, 82-83.
- สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง. (2560). การคัดแยกและศึกษาสมบัติบางประการของแอกติโนแบคทีเรียที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพทางชีววิทยา ของโบราณสถานในอุทยานประวัติศาสตร์สุโขทัย. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์*, 107-117.
- อุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน . (2560). Retrieved from กรมอุทยานแห่งชาติ: [http://park.dnp.go.th/visitor/nationparkshow.php?PTA\\_CODE=1058](http://park.dnp.go.th/visitor/nationparkshow.php?PTA_CODE=1058)
- อานัฐ ตันโซ. (2550). *เกษตรธรรมชาติประยุกต์*. ศูนย์ข้อมูลเกษตรธรรมชาติแม่โจ้ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- อรสา พรฤทธิ์. (27 ธันวาคม 2559). chemyeasy. เข้าถึงได้จาก Chemistry classroom: [http://chemyeasy.blogspot.com/p/blog-page\\_31.html](http://chemyeasy.blogspot.com/p/blog-page_31.html)
- Anansiriwattana, W. Tanasupawat, S. Amnuoyopol, S. and Suwanborirux, K. (2006). Identification and antimicrobial activities of actinomycetes from soils in Samed Island, and geldanamycin from strain PC4 - 3. *Thai J. Pharm. Sci*, 49-56.
- Angela, L. Linderholm, C. L. (2007). Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 1418.
- Ball, A. E. (1987). Respiratory chian composition and activity in some thermotolerant *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 61-66.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiotics*, 1-26.
- Bowen, T. Stackebrandt, E. Dorsch, M. and Embley, T.M. (1989). The phylogeny of *Amycolata autotrophica*, *Kibdelosporangium aridum* and *Saccharothrix australiensis*. *L. Gen Microbiol*, 2529-2536.
- Chaudhary, N. and Prabhu, S. (2016). Thermophilic Actinomycetes from Hot Water Spring Capable of Producing Ezymes of Industrial Importance. *International Journal of Research Studies in Bioscience*, 29-35.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Cho, S.H. Hwang, C.W. Chung, H.K. and Yang, C.S. (1994). A new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. *K J Appl Microbiol Biotechnol*, 22:561–563.
- Couch, J. (1963). Some new genera and species of the Actinoplanaceae. *L. Elisha Mitchell. Sci. Soc*, 53-70.
- Couch, J.N. and Bland, C.E. (1974). The Actinoplanaceae. In: R.E. Buchanan and N.E. Gibbons(Eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Williams and Wilkins.Baltimore*, 706-723.
- Embley, T.M. Simida, J. and Stackebrandt, E. (1988). The phylogeny of mycolateless wallchemotype IV actinomycetes and description of Pseudonocardiaaceae fam.nov. *Syst. Appl. Microbiol*, 11: 44-52.
- Gousterova, A. Paskaleva, D. and Vasileva-Tonkova, E. (2014). Characterization of Culturable Thermophilic Actinobacteria from Livingston Island, Antarctica. *International Research Journal of Biological Sciences*, 30-36.
- Hayakawa, M. and Nonomura, H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. *J Ferment Technol*, 65:501–509.
- Henssen, A. (1957). Beitrge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten. *Arch. Microbiol*, 26: 373-414.
- Holt, J. G. (1994). Microbial Community Profiling of Active Oleophilic Bacteria involved in Bioreactor-based Crude-oil Polluted Sediment Treatment. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition. Williams and Wacket, Baltimore, Washington DC.
- Jiang C. and Xu, L. (1993). Actinomycete diversity in unusual habitats. *Actinomycetes*, 4: 47–57.
- Jongrungruangchok, S. Tanasupawat, S. and i Kudo, T. (2008). Micromonospora chaiyaphumensis sp. nov., isolated from Thai soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 924–928.
- Khalid, F. Nayef, A.M. and Fouad, A.M. (2014). Antimicrobial activities of some thermophiles isolated from Jordan hot springs. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences*, 2320–4087.

- Kishore, P. (2011). *Isolation, charaterizaion aand identification of Actinobacteria of Mangrove ecosystem, Bhitarkanika,Odisha*. Project of Master of science in life science. National Institute of Technology Rourkela, Odisha .
- Klanbut, K. (2013). The role of phospholipid in the growth and development of *Streptomyces*. A thesis for the degree of Doctor of philosophy. University of Strathcyde.
- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 20: 435-443.
- Linuma, S. yokota, T. Hasegawas, and T, Tanamura. (1994). Actinocorallia gen. nov., a new genus of the order Actinomycetales. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 44: 235-245.
- Martin, A. (1961). *Introduction to soil Microbiology*. New York: John Wiley And Sons, Inc.
- McCarthy, AJ. and. Williams, ST. (1990). "Methods for Studying the Ecology of Actinomycetes". Academic Press Limited, London.
- Meklat, A. Sabaou, N. Zitouni, A. Mathieu, F. and Lebrihi, A. (2011). Isolation,taxonomy, and antagonistic properties of halophilic Actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol*, 77:6710–6714.
- Miyadoh, H. (1997). *Atlas of Actinomycetes. The Society of Actinomycetes Japan*. Japan: Asakura Publishing Co.,Ltd.
- Moncheva, P. Tishkov, S. Dimitrova, N. Chipeva, V. Antonova-Nikolova, S.and Bogatzevska, N. (2002). CHARACTERISTICS OF SOIL ACTINOMYCETES FROM ANTARCTICA. *JOURNAL OF CULTURE COLLECTIONS*, 3-14.
- Nguyen, T.M. and Kim, J. (2015). Description of *Streptomyces fabae* sp. nov.,a producer of antibiotics against microbial pathogens, isolated from soybean (*Glycine max*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 4151–4156.
- Okoro, C.K. Brown, R. Jones, A.L. Andrews, B.A. Asenjo, J.A. Goodfellow, M. and Bull, A.T. (2009). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*, 121-133.
- Pandey, A. Ali, I. Butola, K.S. Chatterji, T. and Singh, V. (2011). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACTINOMYCETES FROM SOIL AND EVALUATION OF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF ACTINOMYCETES AGAINST. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 384-392.

- Qin, S. Li, J. Chen, H.H. Zhao, G.Z. Zhu, W.Y. Jiang. C.L. Xu, L.H. and Li, W.J. (2009). Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare Actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in. *Appl Environ Microbiol*, 75:6176–6186.
- Rheims, H. Schumnn, P. Rohde, M. and Stackebrandt, E. (1998). *Verrucospora giffhonensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family Micromonosporaceae. *Int. Syst. Bacteriol*, 48: 1119-1127.
- Sandoval-Calderon M, G. O.-G. (2009:284). A eukaryote-like cardiolipin synthase is present in *Streptomyces coelicolor* and in most actinobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 17383–17390.
- Sateesh, V.N. and Rathod, J.L. (2011). Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*, 3(10): 48-53.
- Shivlatal, L. S. (2015). Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Front.Microbiol*.6, 1014.
- Stackebrandt, E. Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for new hierarchic classification system, *Actinobacteris classic* nov. *Int. Syst bacteriol*, 47(2): 279-491.
- Polsue, P. (2016, May 6). Pangpungpond. Retrieved from <https://pangpungpond.blogspot.com/2016/05/phosphatidylserine.html>
- Subramani, R. and Aalbersberg, W. (2013). Culturable rare Actinomycetes : diversity, isolation and marine natural product discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 9291–9321.
- tamura, T. Hayakawa, M. and hatano, K. (1997). A new genus of order Actinomycetales, *Spiriliplanes* gen. nov., with description of *Spiriliplanes yamanashiensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47: 97-102.
- Thakur D, Yadav A, Gogoi BK, Bora TC. (2007). Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. de Mycologie Médicale*, 242-249.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Thawai, C. (2012). Isolation and Characterization of Antibiotic-producing Actinomycetes from hot spring sediment of Thailand. 215-219.
- Thawai, C. Tanasupawat, S. Itoh, T. Suwanborirux, K. and Kudo, T. (2004). *Micromonospora auratinigra* sp. nov., isolated from a peat swamp forest in Thailand. *Actinomycetologica*, 18: 8-14.
- Thurnkul, N. and Huanraluek, N. (2017). Isolation of Actinomycetes from Termite Mound in Srtsatchanalai District Sukhothai Province for silk fiber dyeing. *PSRU Journal of Science and Technology*, 1-8.
- Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. (2007). *Microbiology: An Introduction*. San Francisco, CA: Pearson; Benjamin Cummings.; CA: Pearson; Benjamin Cummings.
- Wheeler, K.P, a. W. (1970). Structure and Function of Biological Membranes. *Molecular Biology*, 326.
- Xu, L.H. Tiang, Y.Q. Zhang, Y.F. Zhao, L.X. and Jiang, C.L. (1998). *Streptomyces thermogriseus*, a new species of the genus *Streptomyces* from soil, lake and hot-spring. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1089-1 093.
- Yallop CA, Edwards C, Williams ST. (1997). Isolation and growth physiology of novel thermoactinomycetes. *J. Appl. Microbiol*, 685-692.
- Yi Jiang, Qinyuan Li, Xiu Chen and Chenglin Jiang. (2011). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, 39-57.
- Zhang, Z. Wang, Y. and Ruan, J. (1998). Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 411-422.
- Zvyagintsev, A. I. (2010). Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia desert steppe zone. *Microbiology*, 98-108.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร โดยอาหารจะถูกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิตั้งที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 1. Zhang'Starch Soil Extract Agar (ZSSE) (Zhang, 2011)

|                  |       |           |
|------------------|-------|-----------|
| Soluble starch   | 5.0   | กรัม      |
| KNO <sub>3</sub> | 1.0   | กรัม      |
| Soil extracts    | 1,000 | มิลลิลิตร |
| Agar             | 10.0  | กรัม      |
| pH 7.2           |       |           |

เติม Nalidixic acid 50mg/L และ Nystatin 100mg/L

#### 2. Yeast extract – Malt extract agar (YEME)

|               |      |      |
|---------------|------|------|
| Yeast extract | 3.0  | กรัม |
| Malt extract  | 3.0  | กรัม |
| Peptone       | 5.0  | กรัม |
| Glucose       | 10.0 | กรัม |
| Agar          | 20.0 | กรัม |
| pH 7.0-7.2    |      |      |

#### 3. Yeast extract – Malt extract broth (YEME)

|               |      |      |
|---------------|------|------|
| Yeast extract | 3.0  | กรัม |
| Malt extract  | 3.0  | กรัม |
| Peptone       | 5.0  | กรัม |
| Glucose       | 10.0 | กรัม |
| pH 7.0-7.2    |      |      |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ISP Medium 4 (International *Streptomyces* Project Medium 4 หรือ Inorganic Salts Starch Agar)

|   |      |      |
|---|------|------|
| Soluble starch                                  | 10.0 | กรัม |
| CaCO <sub>3</sub>                               | 2.0  | กรัม |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2.0  | กรัม |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 1.0  | กรัม |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O           | 1.0  | กรัม |
| MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O           | 1.0  | กรัม |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O           | 1.0  | กรัม |
| NaCl  | 1.0  | กรัม |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O           | 1.0  | กรัม |
| Agar  | 20.0 | กรัม |

6. Tryptone yeast extract agar

|               |      |      |
|---------------|------|------|
| Tryptone      | 5.0  | กรัม |
| Yeast extract | 3.0  | กรัม |
| Agar          | 20.0 | กรัม |
| pH 7.0-7.2    |      |      |

7. Boullion gelatin broth

|              |     |           |
|--------------|-----|-----------|
| Peptone      | 1.0 | กรัม      |
| Meat extract | 0.5 | กรัม      |
| NaCl         | 0.5 | กรัม      |
| Gelatin      | 15  | กรัม      |
| Water        | 100 | มิลลิลิตร |
| pH 7.0-7.2   |     |           |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Peptone KNO<sub>3</sub> broth

|                  |     |           |
|------------------|-----|-----------|
| Peptone          | 1.0 | กรัม      |
| KNO <sub>3</sub> | 0.1 | กรัม      |
| NaCl             | 0.5 | กรัม      |
| Water            | 100 | มิลลิลิตร |
| pH 7.0           |     |           |

## 9. Skim milk agar

|                             |      |      |
|-----------------------------|------|------|
| Pancreatic digest of casein | 5.0  | กรัม |
| Yeast extract               | 2.5  | กรัม |
| Glucose                     | 1.0  | กรัม |
| Skim milk                   | 50.0 | กรัม |
| Agar                        | 15.0 | กรัม |
| pH 7.0                      |      |      |

## 10. Nutrient agar (NA)

|              |      |      |
|--------------|------|------|
| Peptone      | 5.0  | กรัม |
| Beef extract | 3.0  | กรัม |
| Agar         | 15.0 | กรัม |
| pH 7.0       |      |      |

## 11. Muller Hinton agar (MHA)

|                            |       |      |
|----------------------------|-------|------|
| Beef extract               | 2.0   | กรัม |
| Acid Hydrolysate of casein | 17.50 | กรัม |
| Starch                     | 1.50  | กรัม |
| Agar                       | 17.0  | กรัม |
| pH 7.2-7.4                 |       |      |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 12. Sabouraud dextrose agar (SDA)

|            |      |      |
|------------|------|------|
| Dextrose   | 40.0 | กรัม |
| Peptone    | 10.0 | กรัม |
| Agar       | 15.0 | กรัม |
| pH 5.4-5.8 |      |      |

## 13. Phenol red glucose broth

|                  |       |      |
|------------------|-------|------|
| Proteose peptone | 10.0  | กรัม |
| Beef extract     | 1.0   | กรัม |
| Glucose          | 10.0  | กรัม |
| NaCl             | 5.0   | กรัม |
| Phenol red       | 0.025 | กรัม |
| pH 7.4           |       |      |

## 14. Phenol red lactose broth

|                  |       |      |
|------------------|-------|------|
| Proteose peptone | 10.0  | กรัม |
| Beef extract     | 1.0   | กรัม |
| Lactose          | 10.0  | กรัม |
| NaCl             | 5.0   | กรัม |
| Phenol red       | 0.025 | กรัม |
| pH 7.4           |       |      |

## 15. Phenol red sucrose broth

|                  |       |      |
|------------------|-------|------|
| Proteose peptone | 10.0  | กรัม |
| Beef extract     | 1.0   | กรัม |
| Sucrose          | 10.0  | กรัม |
| NaCl             | 5.0   | กรัม |
| Phenol red       | 0.025 | กรัม |
| pH 7.4           |       |      |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 16. Phenol red xylose broth

|                  |       |      |
|------------------|-------|------|
| Proteose peptone | 10.0  | กรัม |
| Beef extract     | 1.0   | กรัม |
| Xylose           | 10.0  | กรัม |
| NaCl             | 5.0   | กรัม |
| Phenol red       | 0.025 | กรัม |
| pH 7.4           |       |      |

## 17. Phenol red manitol broth

|                  |       |      |
|------------------|-------|------|
| Proteose peptone | 10.0  | กรัม |
| Beef extract     | 1.0   | กรัม |
| Manitol          | 10.0  | กรัม |
| NaCl             | 5.0   | กรัม |
| Phenol red       | 0.025 | กรัม |
| pH 7.4           |       |      |








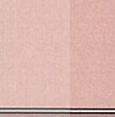





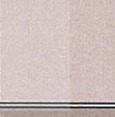

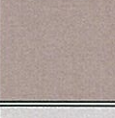

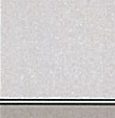

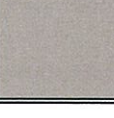


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

## กระดาศสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System)

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System)

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


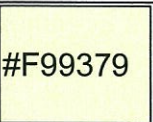

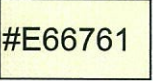

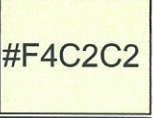

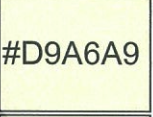





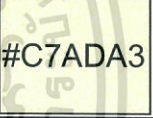

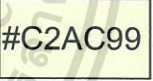



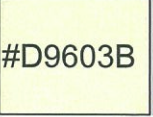

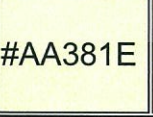
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

| Red                                  |                                   |         |  |         |  |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---------|--|---------|--|
| <b>v.R 11 Vivid Red</b>              | (1-9R)<br>5R3.9/15.4<br>OUT       | #C10020 |  | #BE0032 |  |
| <b>s.R 12 Strong Red</b>             | (1-7R)<br>4R4.4/12.1              | #BF2233 |  | #BC3F4A |  |
| <b>deep R 13 Deep Red</b>            | (1-9R)<br>5.1R2.8/10.1            | #7B001C |  | #841B2D |  |
| <b>v.deep R 14 Very Deep Red</b>     | (1-9R)<br>6.5R1.7/8.4             | #4F0014 |  | #5C0923 |  |
| <b>m.R 15 Moderate Red</b>           | (1-7R)<br>3.8R4.4/9.1             | #AB343A |  | #AB4E52 |  |
| <b>d.R 16 Dark Red</b>               | (1-9R)<br>4.0R2.8/6.8             | #681C23 |  | #722F37 |  |
| <b>v.d.R 17 Very Dark Red</b>        | (1-6R)<br>2R1.2/4.8               | #320A18 |  | #3F1728 |  |
| <b>l.gy.R 18 Light Grayish Red</b>   | (1-8R)<br>5.3R5.9/3.5             | #B17267 |  | #AD8884 |  |
| <b>gy.R 19 Grayish Red</b>           | (1-8R)<br>4R4.4/4.8               | #8C4743 |  | #905D5D |  |
| <b>d.gy.R 20 Dark Grayish Red</b>    | (1-6R)<br>2.9R2.7/2.1             | #482A2A |  | #543D3F |  |
| <b>Blackish R 21 Blackish Red</b>    | (1-6R)<br>3.9R0.8/1.7<br>OUT      | #1F0E11 |  | #2E1D21 |  |
| <b>rGy 22 Reddish Gray</b>           | (1-9R,9R-1YR,1-2YR)<br>7R5.4/1.3  | #8B6C62 |  | #8F817F |  |
| <b>d.rGy 23 Dark Reddish Gray</b>    | (1-9R,9R-1YR)<br>6R3.4/1          | #523C36 |  | #5C504F |  |
| <b>rBlack 24 Reddish Black</b>       | (1-9R,9R-1YR)<br>2R0.9/0.9 OUT    | #1E1112 |  | #282022 |  |
| Yellowish Pink                       |                                   |         |  |         |  |
| <b>v.yPk 25 Vivid Yellowish Pink</b> | (4-9R,9R-1YR,1-2YR)<br>8R8/13 OUT | #FF845C |  | #FFB7A5 |  |


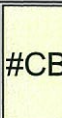

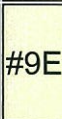

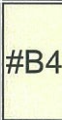



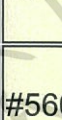





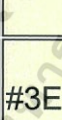



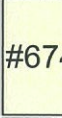

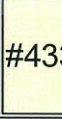


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|  |                                     |         |   |         |  |
|--|-------------------------------------|---------|---|---------|--|
| <b>m.rO 37 Moderate Reddish Orange</b>         | (7-9R,9R-1YR,1-2YR)<br>9.3R5.5/9.2  | #D35339 |    | #CB6D51 |    |
| <b>d.rO 38 Dark Reddish Orange</b>             | (7-9R,9R-1YR,1-2YR)<br>9.3R4/9.1    | #9B2F1F |    | #9E4732 |    |
| <b>gy.rO 39 Grayish Reddish Orange</b>         | (8-9R,9R-1YR,1-3YR)<br>0.4YR5.4/6.2 | #B85D43 |    | #B4745E |    |
| Reddish Brown                                  |                                     |         |   |         |  |
| <b>s.rBr 40 Strong Reddish Brown</b>           | (9R-1YR,1-2YR)<br>0.3YR3.1/9.9      | #7F180D |    | #882D17 |    |
| <b>deep rBr 41 Deep Reddish Brown</b>          | (6-9R,9R-1YR,1-2YR)<br>1.6YR1.5/8.3 | #490005 |    | #56070C |    |
| <b>l.rBr 42 Light Reddish Brown</b>            | (8-9R,9R-1YR,1-3YR)<br>0.5YR5.5/4.1 | #AA6651 |   | #A87C6D |   |
| <b>m.rBr 43 Moderate Reddish Brown</b>         | (6-9R,9R-1YR,1-3YR)<br>9R3.4/5.2    | #712F26 |  | #79443B |  |
| <b>d.rBr 44 Dark Reddish Brown</b>             | (6-9R,9R-1YR,1-3YR)<br>9.6R1.3/3.6  | #321011 |  | #3E1D1E |  |
| <b>l.gy.rBr 45 Light Grayish Reddish Brown</b> | (1-5YR)<br>2.9YR5.4/2.3             | #966A57 |  | #977F73 |  |
| <b>gy.rBr 46 Grayish Reddish Brown</b>         | (6-9R,9R-1YR,1-3YR)<br>9R3.4/2.4    | #5E3830 |  | #674C47 |  |
| <b>d.gy.rBr 47 Dark Grayish Reddish Brown</b>  | (6-9R,9R-1YR,1-3YR)<br>9R2/2        | #371F1C |  | #43302E |  |
| Orange   |                                     |         |   |         |  |
| <b>v.O 48 Vivid Orange</b>                     | (2-7YR)<br>4.1YR6.5/15<br>OUT       | #FF6800 |  | #F38400 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|  |  |                    |         |  |
|--|--|--------------------|---------|--|
| <b>d.gy.Br 62 Dark Grayish Brown</b>       | (3-8YR)<br>5.5YR2/1.5                      | #32221A            | #3E322C |  |
| <b>l.brGy 63 Light Brownish Gray</b>       | (2-8YR,8YR-1Y,1-4Y)<br>7YR5.4/1.2          | #8B6D5C            | #8E8279 |  |
| <b>brGy 64 Brownish Gray</b>               | (1-8YR,8YR-1Y,1-4Y)<br>5.65R3.4/0.9        | #503D33            | #5B504F |  |
| <b>brBlack 65 Brownish Black</b>           | (1-8YR,8YR-1Y,1-4Y)<br>7.8YR0.6/0.9<br>OUT | #140F0B            | #28201C |  |
| Orange Yellow                              |  |                    |         |  |
| <b>v.OY 66 Vivid Orange Yellow</b>         | (7-8YR,8YR-1Y)<br>8.6YR7.3/15.2<br>OUT     | #FF8E00            | #F6A600 |  |
| <b>brill.OY 67 Brilliant Orange Yellow</b> | (7-8YR,8YR-1Y)<br>0.1Y8.1/10.5<br>OUT      | #FFB02E            | #FFC14F |  |
| <b>s.OY 68 Strong Orange Yellow</b>        | (7-8YR,8YR-1Y)<br>9.1YR7.1/11.6            | #FF8E0D            | #EAA221 |  |
| <b>deep OY 69 Deep Orange Yellow</b>       | (7-8YR,8YR-1Y)<br>8.6YR6/12.1<br>OUT       | #D76E00            | #C98500 |  |
| <b>l.OY 70 Light Orange Yellow</b>         | (7-8YR,8YR-1Y)<br>9.4YR8.3/6.8             | #FFB961<br>see #35 | #FBC97F |  |
| <b>m.OY 71 Moderate Orange Yellow</b>      | (7-8YR,8YR-1Y)<br>8.7YR7.2/8.3             | #F7943C            | #E3A857 |  |
| <b>d.OY 72 Dark Orange Yellow</b>          | (7-8YR,8YR-1Y) 9.3YR6/7.9                  | #C37629            | #BE8A3D |  |
| <b>p.OY 73 Pale Orange Yellow</b>          | (7-8YR,8YR-1Y)<br>9.2YR8.7/4.4             | #FFCA86            | #FAD6A5 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

| Yellowish Brown                                  |                                |         |  |         |  |
|--|--------------------------------|---------|--|---------|--|
| <b>s.yBr 74 Strong Yellowish Brown</b>           | (7-8YR,8YR-1Y)<br>8.8YR4.6/8.5 | #95500C |  | #996515 |  |
| <b>deep yBr 75 Deep Yellowish Brown</b>          | (8YR-1Y)<br>8.8YR3.1/5         | #593315 |  | #654522 |  |
| <b>l.yBr 76 Light Yellowish Brown</b>            | (7-8YR,8YR-1Y)<br>8.7YR6.5/5   | #BB8B54 |  | #C19A6B |  |
| <b>m.yBr 77 Moderate Yellowish Brown</b>         | (8YR-1Y)<br>9.5YR4.4/3.9       | #7D512D |  | #826644 |  |
| <b>d.yBr 78 Dark Yellowish Brown</b>             | (8YR-1Y)<br>9.4YR2.3/3.3       | #3F2512 |  | #4B3621 |  |
| <b>l.gy.yBr 79 Light Grayish Yellowish Brown</b> | (8YR-1Y)<br>9.7YR6.4/2.5       | #B48764 |  | #AE9B82 |  |
| <b>gy.yBr 80 Grayish Yellowish Brown</b>         | (8YR-1Y)<br>9.5YR4.6/2.1       | #785840 |  | #7E6D5A |  |
| <b>d.gy.yBr 81 Dark Grayish Yellowish Brown</b>  | (8YR-1Y)<br>8.8YR2.5/1.6       | #3D2B1F |  | #483C32 |  |
| Yellow   |                                |         |  |         |  |
| <b>v.Y 82 Vivid Yellow</b>                       | (1-7Y)<br>3.3Y8/14.3 OUT       | #FFB300 |  | #F3C300 |  |
| <b>brill.Y 83 Brilliant Yellow</b>               | (1-7Y)<br>4.4Y8.7/8.9          | #FFCF40 |  | #FADA5E |  |
| <b>s.Y 84 Strong Yellow</b>                      | (1-7Y)<br>3.7Y7.2/9.3          | #E59E1F |  | #D4AF37 |  |
| <b>deep Y 85 Deep Yellow</b>                     | (1-7Y)<br>3.7Y5.9/9.1          | #B57900 |  | #AF8D13 |  |
| <b>l.Y 86 Light Yellow</b>                       | (1-7Y)<br>4.3Y8.8/6.8          | #FFD35F |  | #F8DE7E |  |
| <b>m.Y 87 Moderate Yellow</b>                    | (1-7Y)<br>3.8Y7.1/6.5          | #D79D41 |  | #C9AE5D |  |
| <b>d.Y 88 Dark Yellow</b>                        | (1-7Y)<br>3.9Y6/6.4            | #B07D2B |  | #AB9144 |  |
| <b>p.Y 89 Pale Yellow</b>                        | (1-7Y)<br>4.7Y9/3.8            | #FFDB8B |  | #F3E5AB |  |
| <b>gy.Y 90 Grayish Yellow</b>                    | (1-9Y)<br>4.4Y7.2/3.8          | #CEA262 |  | #C2B280 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|  |   |         |  |         |  |
|--|---|---------|--|---------|--|
| <b>d.gy.Y 91 Dark Grayish Yellow</b>         | (1-7Y)<br>3.8Y5.9/4                             | #A47C45 |  | #A18F60 |  |
| <b>yWhite 92 Yellowish White</b>             | (7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY)<br>4.5Y9.2/1.2 | #FFE2B7 |  | #F0EAD6 |  |
| <b>yGy 93 Yellowish Gray</b>                 | (7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY)<br>3.8Y7.4/1.4 | #CAA885 |  | #BFB8A5 |  |
| Olive Brown                                  |   |         |  |         |  |
| <b>l.OIBr 94 Light Olive Brown</b>           | (1-4Y)<br>2.1Y4.9/7.9                           | #945D0B |  | #967117 |  |
| <b>m.OIBr 95 Moderate Olive Brown</b>        | (1-4Y)<br>2.7Y3.6/5.5                           | #64400F |  | #6C541E |  |
| <b>d.OIBr 96 Dark Olive Brown</b>            | (1-4Y)<br>2Y1.9/2.2                             | #302112 |  | #3B3121 |  |
| Greenish Yellow                              |   |         |  |         |  |
| <b>v.gY 97 Vivid Greenish Yellow</b>         | (7-9Y,9Y-2GY)<br>9.1Y8.2/12<br>OUT              | #F4C800 |  | #DCD300 |  |
| <b>brill.gY 98 Brilliant Greenish Yellow</b> | (7-9Y,9Y-2GY)<br>9.8Y8.8/9.5                    | #FFDC33 |  | #E9E450 |  |
| <b>s.gY 99 Strong Greenish Yellow</b>        | (7-9Y,9Y-2GY)<br>9.2Y7.2/9.2                    | #CCA817 |  | #BEB72E |  |
| <b>d.gY 100 Deep Greenish Yellow</b>         | (7-9Y,9Y-2GY)<br>9.2Y5.9/9.2<br>OUT             | #9F8200 |  | #9B9400 |  |
| <b>l.gY 101 Light Greenish Yellow</b>        | (7-9Y,9Y-2GY)<br>9.8Y8.9/7                      | #FFDE5A |  | #EAE679 |  |
| <b>m.gY 102 Moderate Greenish Yellow</b>     | (7-9Y,9Y-2GY)<br>9.5Y7.1/6.5                    | #C4A43D |  | #B9B459 |  |
| <b>d.gY 103 Dark Greenish Yellow</b>         | (7-9Y,9Y-2GY)<br>9.4Y5.9/6.3                    | #9B8127 |  | #98943E |  |
| <b>p.gY 104 Pale Greenish Yellow</b>         | (7-9Y,9Y-2GY)<br>9.5Y9/4.2                      | #FFDF84 |  | #EBE8A4 |  |
| <b>gy.gY 105 Grayish Greenish Yellow</b>     | (7-9Y,9Y-2GY)<br>9Y7.2/3.9                      | #C4A55F |  | #B9B57D |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

| Olive  |                                    |         |  |         |  |
|--|------------------------------------|---------|--|---------|--|
| <b>l.OI 106 Light Olive</b>  | (4-9Y,9Y-2GY)<br>8.2Y5.1/5.6       | #846A20 |  | #867E36 |  |
| <b>m.OI 107 Moderate Olive</b>   | (4-9Y,9Y-2GY)<br>7.6Y3.8/5.4       | #5E490F |  | #665D1E |  |
| <b>d.OI 108 Dark Olive</b>   | (4-9Y,9Y-2GY)<br>8.9Y2.4/3.1       | #362C12 |  | #403D21 |  |
| <b>l.gy.OI 109 Light Grayish Olive</b>                                   | (4-9Y,9Y-2GY)<br>7.85Y5.5/2.5      | #8B734B |  | #8C8767 |  |
| <b>gy.OI 110 Grayish Olive</b>   | (4-9Y,9Y-2GY)<br>8Y3.6/2           | #52442C |  | #5B5842 |  |
| <b>d.gy.OI 111 Dark Grayish Olive</b>                                    | (4-9Y,9Y-2GY)<br>9.7Y2/1.8         | #2B2517 |  | #363527 |  |
| <b>l.OIGy 112 Light Olive Gray</b>                                       | (4-9Y,9Y-2GY,2-4GY)<br>6.9Y5.5/1.3 | #887359 |  | #8A8776 |  |
| <b>OIGy 113 Olive Gray</b>   | (4-9Y,9Y-2GY,2-4GY)<br>8.1Y3.5/0.9 | #4D4234 |  | #57554C |  |
| <b>OI Black 114 Olive Black</b>  | (4-9Y,9Y-2GY,2-4GY)<br>9Y1.1/0.9   | #121910 |  | #25241D |  |
| Yellow Green   |                                    |         |  |         |  |
| <b>v.YG 115 Vivid Yellow Green</b><br>not vivid yellowish green see #129 | (2-8GY)<br>5.4GY6.8/11.2<br>OUT    | #93AA00 |  | #8DB600 |  |
| <b>brill.YG 116 Brilliant Yellow Green</b>                               | (2-8GY)<br>4.9GY8.2/9.1            | #CED23A |  | #BDDA57 |  |
| <b>s.YG 117 Strong Yellow Green</b>                                      | (2-8GY)<br>5.4GY6/8.7              | #7F8F18 |  | #7E9F2E |  |
| <b>deep YG 118 Deep Yellow Green</b>                                     | (2-8GY)<br>7.4GY4.2/7.1            | #425E17 |  | #467129 |  |
| <b>l.YG 119 Light Yellow Green</b>                                       | (2-8GY)<br>5GY8.4/5.6              | #DCD36A |  | #C9DC89 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|   |                                |         |  |         |  |
|---|--------------------------------|---------|--|---------|--|
| <b>m.YG 120 Moderate Yellow Green</b>                             | (2-8GY)<br>4.8GY6/5            | #8B8940 |  | #8A9A5B |  |
| <b>p.YG 121 Pale Yellow Green not pale yellowish green</b>        | (9Y-2GY,2-8GY)<br>3.4GY8.7/2.4 | #F0D698 |  | #DADFB7 |  |
| <b>gy.YG 122 Grayish Yellow Green not grayish yellowish green</b> | (9Y-2GY,2-8GY)<br>4.4GY6/2.3   | #90845B |  | #8F9779 |  |
| Olive Green   |                                |         |  |         |  |
| <b>s.OIG 123 Strong Olive Green</b>                               | (2-8GY)<br>4GY3/11<br>OUT      | #0A4500 |  | #404F00 |  |
| <b>deep OIG 124 Deep Olive Green</b>                              | (2-8GY)<br>4GY1.5/11<br>OUT    | #142300 |  | #232F00 |  |
| <b>m.OIG 125 Moderate Olive Green</b>                             | (2-8GY)<br>5.7GY3.6/4.8        | #434B1B |  | #4A5D23 |  |
| <b>d.OIG 126 Dark Olive Green</b>                                 | (2-8GY)<br>8GY2.2/3.6          | #232C16 |  | #2B3D26 |  |
| <b>gy.OIG 127 Grayish Olive Green</b>                             | (2-8GY)<br>4.6GY3.5/2          | #48442D |  | #515744 |  |
| <b>d.gy.OIG 128 Dark Grayish Olive Green</b>                      | (2-8GY)<br>5.4GY2/1.8          | #27261A |  | #31362B |  |
| Yellowish Green   |                                |         |  |         |  |
| <b>v.yG 129 Vivid Yellowish Green see #115</b>                    | (8GY-3G)<br>1.1G5.9/11.2       | #379931 |  | #27A64C |  |
| <b>brill.yG 130 Brilliant Yellowish Green</b>                     | (8GY-3G)<br>0.3G7.7/8.6        | #8CCB5E |  | #83D37D |  |
| <b>s.yG 131 Strong Yellowish Green</b>                            | (8GY-3G)<br>0.4G5.4/8.7        | #478430 |  | #44944A |  |
| <b>deep yG 132 Deep Yellowish Green</b>                           | (8GY-3G)<br>0.9G3.5/9<br>OUT   | #00541F |  | #00622D |  |
| <b>v.deep yG 133 Very Deep Yellowish Green</b>                    | (8GY-3G)<br>10GY1.5/11<br>OUT  | #002800 |  | #003118 |  |
| <b>v.l.yG 134 Very Light Yellowish Green</b>                      | (8GY-3G)<br>0.2G8.6/4.6        | #C6DF90 |  | #B6E5AF |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|   |                                      |                             |  |         |  |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|--|---------|--|
| <b>l.yG 135 Light Yellowish Green</b>       | (8GY-3G)<br>0.7G7.4/5.2              | #007BA7<br>see #167<br>#170 |  | #93C592 |  |
| <b>m.yG 136 Moderate Yellowish Green</b>    | (8GY-3G)<br>0.5G5.5/4.8              | #657F4B                     |  | #679267 |  |
| <b>d.yG 137 Dark Yellowish Green</b>        | (8GY-3G)<br>0.6G3.5/5                | #304B26                     |  | #355E3B |  |
| <b>v.d.yG 138 Very Dark Yellowish Green</b> | (8GY-3G)<br>0.3G1.8/4.3              | #132712                     |  | #173620 |  |
| Green                                       |                                      |                             |  |         |  |
| <b>v.G 139 Vivid Green</b>                  | (3-9G)<br>3.2G4.9/11.1<br>OUT        | #007D34                     |  | #008856 |  |
| <b>brill.G 140 Brilliant Green</b>          | (3-9G)<br>6.2G6.5/8.3                | #47A76A                     |  | #3EB489 |  |
| <b>s.G 141 Strong Green</b>                 | (3-9G)<br>5.8G4.4/8.7<br>OUT         | #006B3C                     |  | #007959 |  |
| <b>deep G 142 Deep Green</b>                | (3-9G)<br>5.1G3/8.1<br>OUT           | #004524                     |  | #00543D |  |
| <b>v.l.G 143 Very Light Green</b>           | (3-9G)<br>6.5G7.8/4.9                | #98C793                     |  | #8ED1B2 |  |
| <b>l.G 144 Light Green</b>                  | (3-9G)<br>6G6.4/5.1                  | #719B6E                     |  | #6AAB8E |  |
| <b>m.G 145 Moderate Green</b>               | (3-9G)<br>6.3G4.5/5.1                | #386646                     |  | #3B7861 |  |
| <b>d.G 146 Dark Green</b>                   | (3-9G)<br>6.6G2.8/4.6                | #203A27                     |  | #1B4D3E |  |
| <b>v.d.G 147 Very Dark Green</b>            | (3-9G)<br>8G1.8/3                    | #16251C                     |  | #1C352D |  |
| <b>v.p.G 148 Very Pale Green</b>            | (8GY-3G,3-9G)<br>7.3G8.8/1.9         | #D8DEBA                     |  | #C7E6D7 |  |
| <b>p.G 149 Pale Green</b>                   | (8GY-3G,3-9G,9G-10BG)<br>7.6G6.4/1.7 | #8D917A                     |  | #8DA399 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|  |  |         |         |  |
|--|--|---------|---------|--|
| <b>d.gGy 156 Dark Greenish Gray</b>        | (4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG)<br>1.5BG3.5/0.9 | #45433B | #4E5755 |  |
| <b>gBlack 157 Greenish Black</b>           | (4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 8.7G1/0.7       | #181513 | #1E2321 |  |
| Bluish Green                               |  |         |         |  |
| <b>v.bG 158 Vivid Bluish Green</b>         | (9G-10BG)<br>5BG5/13 OUT                       | #00836E | #008882 |  |
| <b>brill.bG 159 Brilliant Bluish Green</b> | (9G-10BG)<br>2.9BG6/9.6 OUT                    | #009B76 | #00A693 |  |
| <b>s.bG 160 Strong Bluish Green</b>        | (9G-10BG)<br>4.6BG4.5/8.5<br>OUT               | #006D5B | #007A74 |  |
| <b>deep bG 161 Deep Bluish Green</b>       | (9G-10BG)<br>2.8BG2.4/8.3<br>OUT               | #00382B | #00443F |  |
| <b>v.l.bG 162 Very Light Bluish Green</b>  | (9G-10BG)<br>4.4BG8.3/4.6                      | #A0D6B4 | #96DED1 |  |
| <b>l.bG 163 Light Bluish Green</b>         | (9G-10BG)<br>4.6BG6.5/4.9                      | #669E85 | #66ADA4 |  |
| <b>m.bG 164 Moderate Bluish Green</b>      | (9G-10BG)<br>4.6BG4.5/5                        | #2F6556 | #317873 |  |
| <b>d.bG 165 Dark Bluish Green</b>          | (9G-10BG)<br>4.9BG2.7/5 OUT                    | #013A33 | #004B49 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|   |  |                             |  |         |  |
|---|--|-----------------------------|--|---------|--|
| <b>v.d.bG 166 Very Dark Bluish Green</b>    | (9G-10BG)<br>3.6BG1.2/4<br>OUT   | #001D18                     |  | #002A29 |  |
| Greenish Blue                               |  |                             |  |         |  |
| <b>v.gB 167 Vivid Greenish Blue</b>         | (10BG-9B)<br>5B5/13 OUT<br>see #170 #176                                 | #007BA7<br>see #135<br>#170 |  | #0085A1 |  |
| <b>brill.gB 168 Brilliant Greenish Blue</b> | (10BG-9B)<br>4.6B5.9/7.7   | #2A8D9C                     |  | #239EBA |  |
| <b>s.gB 169 Strong Greenish Blue</b>        | (10BG-9B)<br>4.9B4.5/8.4<br>OUT  | #00677E                     |  | #007791 |  |
| <b>deep gB 170 Deep Greenish Blue</b>       | (10BG-9B)<br>5B5/13 OUT<br>see #167 #176<br>same as #167;<br>guess 5B2/9 | #007BA7<br>see #135<br>#167 |  | #2E8495 |  |
| <b>v.l.gB 171 Very Light Greenish Blue</b>  | (10BG-9B)<br>4B8/4   | #A3C6C0                     |  | #9CD1DC |  |
| <b>l.gB 172 Light Greenish Blue</b>         | (10BG-9B)<br>4.5B6.5/5.4   | #649A9E                     |  | #66AABC |  |
| <b>m.gB 173 Moderate Greenish Blue</b>      | (10BG-9B)<br>4.7B4.5/5.2   | #30626B                     |  | #367588 |  |
| <b>d.gB 174 Dark Greenish Blue</b>          | (10BG-9B)<br>3.7B2.7/5 OUT   | #003841                     |  | #004958 |  |
| <b>v.d.gB 175 Very Dark Greenish Blue</b>   | (10BG-9B)<br>5B1.5/3.6 OUT   | #022027                     |  | #002E3B |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

| Blue  |   |         |  |         |  |
|---|---|---------|--|---------|--|
| <b>v.B 176 Vivid Blue, ultramarine</b>            | (9B-5PB,5-7PB)<br>5B5/14 OUT<br>see #167 #170 | #007CAD |  | #00A1C2 |  |
| <b>brill.B 177 Brilliant Blue, celestial blue</b> | (9B-5PB,5-7PB)<br>1.6PB5.9/9.4                | #4285B4 |  | #4997D0 |  |
| <b>s.B 178 Strong Blue, bright blue</b>           | (9B-5PB,5-7PB)<br>2.9PB4.1/10.4<br>OUT        | #00538A |  | #0067A5 |  |
| <b>deep B 179 Deep Blue, royal blue</b>           | (9B-5PB,5-7PB)<br>2.8PB2.5/7.9<br>OUT         | #002F55 |  | #00416A |  |
| <b>v.l.B 180 Very Light Blue, baby blue</b>       | (9B-5PB,5-7PB)<br>2.7PB7.9/6                  | #A6BDD7 |  | #A1CAF1 |  |
| <b>l.B 181 Light Blue, sky blue</b>               | (9B-5PB,5-7PB)<br>1.6PB6.4/6.9                | #6C92AF |  | #70A3CC |  |
| <b>m.B 182 Moderate Blue, cerulean blue</b>       | (9B-5PB,5-7PB)<br>3PB4.3/6.8                  | #395778 |  | #436B95 |  |
| <b>d.B 183 Dark Blue, navy blue</b>               | (9B-5PB,5-7PB)<br>2.2PB1.7/5.5<br>OUT         | #002137 |  | #00304E |  |
| <b>v.p.B 184 Very Pale Blue, cloud blue</b>       | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>1.5PB8.3/3.3        | #C1CACA |  | #BCD4E6 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|  |  |         |         |
|--|--|---------|---------|
| <b>p.B 185 Pale Blue, alic blue</b>                        | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>0.6PB6.5/2.6 | #919192 | #91A3B0 |
| <b>gy.B 186 Grayish Blue, slate blue</b>                   | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>0.2PB4.2/3   | #4A545C | #536878 |
| <b>d.gy.B 187 Dark Grayish Blue</b>                        | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>9.2B2.7/2    | #2C3337 | #36454F |
| <b>blackish B 188 Blackish Blue</b>                        | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>9.8B1.3/1.5  | #161A1E | #202830 |
| <b>bWhite 189 Bluish White</b>                             | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>9.2B9.1/1.2  | #F9DFCF | #E9E9ED |
| <b>l.bGy 190 Light Bluish Gray</b>                         | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>8.2B7.5/1    | #BEADA1 | #B4BCC0 |
| <b>bGy 191 Bluish Gray</b>                                 | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>8.9B5.5/0.9  | #7D746D | #81878B |
| <b>d.bGy 192 Dark Bluish Gray</b>                          | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>0.3PB3.6/1.1 | #464544 | #51585E |
| <b>bBlack 193 Bluish Black</b>                             | (10BG-9B,9B-5PB,5-9PB)<br>9.6B1.1/0.8  | #151719 | #202428 |
| <b>Purplish Blue</b>                                       |  |         |         |
| <b>v.pB 194 Vivid Purplish Blue not very purplish blue</b> | (7-9PB)<br>7.8PB2/12.5                 | #20155E | #30267A |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|   |                          |         |  |         |  |
|---|--------------------------|---------|--|---------|--|
| <b>brill.pB 195 Brilliant Purplish Blue</b> | (7-9PB)<br>7.3PB5.1/9    | #62639B |  | #6C79B8 |  |
| <b>s.pB 196 Strong Purplish Blue</b>        | (7-9PB)<br>8PB4/10.9     | #474389 |  | #545AA7 |  |
| <b>deep pB 197 Deep Purplish Blue</b>       | (7-9PB)<br>7.8PB1.5/8    | #1A153F |  | #272458 |  |
| <b>v.l.pB 198 Very Light Purplish Blue</b>  | (7-9PB)<br>7.4PB7.6/5.2  | #BAACC7 |  | #B3BCE2 |  |
| <b>l.pB 199 Light Purplish Blue</b>         | (7-9PB)<br>7.3PB6/6.5    | #837DA2 |  | #8791BF |  |
| <b>m.pB 200 Moderate Purplish Blue</b>      | (7-9PB)<br>7.9PB3.5/6.5  | #423C63 |  | #4E5180 |  |
| <b>d.pB 201 Dark Purplish Blue</b>          | (7-9PB)<br>8PB1.3/4.3    | #1A162A |  | #252440 |  |
| <b>v.p.pB 202 Very Pale Purplish Blue</b>   | (5-9PB)<br>7PB8/3.7      | #CBBAC5 |  | #C0C8E1 |  |
| <b>p.pB 203 Pale Purplish Blue</b>          | (5-9PB)<br>7PB6/3.9      | #8A7F8E |  | #8C92AC |  |
| <b>gy.pB 204 Grayish Purplish Blue</b>      | (5-9PB)<br>6.9PB3.4/3.8  | #413D51 |  | #4C516D |  |
| Violet                                      |                          |         |  |         |  |
| <b>v.V 205 Vivid Violet</b>                 | (9PB-3P)<br>2P5/14       | #884BAE |  | #9065CA |  |
| <b>brill.V 206 Brilliant Violet</b>         | (9PB-3P)<br>9.9PB5.1/9.4 | #755D9A |  | #7E73B8 |  |
| <b>s.V 207 Strong Violet</b>                | (9PB-3P)<br>0.2P3.7/10.1 | #53377A |  | #604E97 |  |

















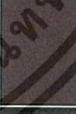





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|                                      |                          |         |  |         |  |
|--------------------------------------|--------------------------|---------|--|---------|--|
| <b>deep V 208 Deep Violet</b>        | (9PB-3P)<br>1.1P1.2/8.6  | #240935 |  | #32174D |  |
| <b>v.I.V 209 Very Light Violet</b>   | (9PB-3P)<br>2P8.5/7 OUT  | #EEBEF1 |  | #DCD0FF |  |
| <b>I.V 210 Light Violet</b>          | (9PB-3P)<br>0.5P5.6/7.1  | #876C99 |  | #8C82B6 |  |
| <b>m.V 211 Moderate Violet</b>       | (9PB-3P)<br>1.4P3.6/7    | #543964 |  | #604E81 |  |
| <b>d.V 212 Dark Violet</b>           | (9PB-3P)<br>1.4P1.3/4.9  | #22132B |  | #2F2140 |  |
| <b>v.p.V 213 Very Pale Violet</b>    | (9PB-3P)<br>9.7PB7.9/3.7 | #D8B1BF |  | #C4C3DD |  |
| <b>p.V 214 Pale Violet</b>           | (9PB-3P)<br>1.3P6/4      | #957B8D |  | #9690AB |  |
| <b>gy.V 215 Grayish Violet</b>       | (9PB-3P)<br>1.2P3.3/3.9  | #46394B |  | #554C69 |  |
| Purple                               |                          |         |  |         |  |
| <b>v.P 216 Vivid Purple</b>          | (3-9P)<br>6P4.5/14.0     | #943391 |  | #9A4EAE |  |
| <b>brill.P 217 Brilliant Purple</b>  | (3-9P) 6P7/11            | #DD80CC |  | #D399E6 |  |
| <b>s.P 218 Strong Purple</b>         | (3-9P)<br>6.5P4.3/9.2    | #803E75 |  | #875692 |  |
| <b>deep P 219 Deep Purple</b>        | (3-9P)<br>6.3P2.7/9.1    | #531A50 |  | #602F6B |  |
| <b>v.deep P 220 Very Deep Purple</b> | (3-9P) 5P1.5/8           | #320B35 |  | #401A4C |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|                                       |   |         |  |         |   |
|---------------------------------------|---|---------|--|---------|---|
| <b>v.I.P 221 Very Light Purple</b>    | (3-9P) 6.5P7.8/5.1  | #E3A9BE |    | #D5BADB |    |
| <b>l.P 222 Light Purple</b>           | (3-9P) 6.2P6.5/6.5  | #BA7FA2 |    | #B695C0 |    |
| <b>m.P 223 Moderate Purple</b>        | (3-9P) 6.6P4.5/7.1  | #7F4870 |    | #86608E |    |
| <b>d.P 224 Dark Purple</b>            | (3-9P) 6.3P2.8/4.9  | #472A3F |    | #563C5C |    |
| <b>v.d.P 225 Very Dark Purple</b>     | (3-9P) 6.9P1/4.5  | #230D21 |    | #301934 |    |
| <b>v.p.P 226 Very Pale Purple</b>     | (9PB-3P, 3-9P)<br>5.5P8.2/3.2                             | #E6BBC1 |   | #D6CADD |   |
| <b>p.P 227 Pale Purple</b>            | (9PB-3P, 3-9P, 9P-3RP, 3-9RP, 9RP-1R)<br>7.9P6.4/3.1      | #AE848B |  | #AA98A9 |  |
| <b>gy.P 228 Grayish Purple</b>        | (9PB-3P, 3-9P, 9P-3RP, 3-9RP, 9RP-1R)<br>8.1P4.5/2.7      | #72525C |  | #796878 |  |
| <b>d.gy.P 229 Dark Grayish Purple</b> | (9PB-3P, 3-9P, 9P-3RP, 3-9RP, 9RP-1R)<br>0.5RP2.8/2       | #452D35 |  | #50404D |  |
| <b>blackish P 230 Blackish Purple</b> | (9PB-3P, 3-9P, 9P-3RP, 3-9RP, 9RP-1R)<br>0.8RP0.9/1.6 OUT | #1D1018 |  | #291E29 |  |
| <b>pWhite 231 Purplish White</b>      | (9PB-3P, 3-9P, 9P-3RP, 3-9RP)<br>2.5RP9/0.8               | #FADBC8 |  | #E8E3E5 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|   |  |         |  |         |  |
|---|--|---------|--|---------|--|
| <b>l.pGy 232 Light Purplish Gray</b>          | (9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP) 0.3RP7.5/1.1            | #C8A99E |  | #BFB9BD |  |
| <b>pGy 233 Purplish Gray</b>                  | (9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 1RP5.5/0.9       | #88706B |  | #8B8589 |  |
| <b>d.pGy 234 Dark Purplish Gray</b>           | (9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 1RP3.6/1         | #564042 |  | #5D555B |  |
| <b>pBlack 235 Purplish Black</b>              | (9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 9.54P0.9/0.6 OUT | #1B1116 |  | #242124 |  |
| Reddish Purple                                |  |         |  |         |  |
| <b>v.rP 236 Vivid Reddish Purple</b>          | (9P-3RP) 1RP3/14 OUT                               | #7E0059 |  | #870074 |  |
| <b>s.rP 237 Strong Reddish Purple</b>         | (9P-3RP) 1.3RP4.4/10.2                             | #9A366B |  | #9E4F88 |  |
| <b>deep rP 238 Deep Reddish Purple</b>        | (9P-3RP) 1RP2.8/9.5                                | #641349 |  | #702963 |  |
| <b>v.deep rP 239 Very Deep Reddish Purple</b> | (9P-3RP) 0.9RP1.9/8.9                              | #470736 |  | #54194E |  |
| <b>l.rP 240 Light Reddish Purple</b>          | (9P-3RP) 0.7RP6/6.9                                | #BB6C8A |  | #B784A7 |  |
| <b>m.rP 241 Moderate Reddish Purple</b>       | (9P-3RP) 0.8RP4.5/7                                | #8C4566 |  | #915C83 |  |
| <b>d.rP 242 Dark Reddish Purple</b>           | (9P-3RP) 1.3RP2.8/4.8                              | #4F273A |  | #5D3954 |  |
| <b>v.d.rP 243 Very Dark Reddish Purple</b>    | (9P-3RP) 1.5RP1/4.8                                | #270A1F |  | #341731 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|  |                                 |         |  |         |  |
|--|---------------------------------|---------|--|---------|--|
| <b>p.rP 244 Pale Reddish Purple</b>          | (9P-3RP)<br>1.3RP6/4.2          | #AC7580 |  | #AA8A9E |  |
| <b>gy.rP 245 Grayish Reddish Purple</b>      | (9P-3RP)<br>1RP4.5/4.2          | #7D4D5D |  | #836479 |  |
| Purplish Pink                                |                                 |         |  |         |  |
| <b>brill.pPk 246 Brilliant Purplish Pink</b> | (9P-3RP,3-9RP)<br>6RP8.5/11 OUT | #FF97BB |  | #FFC8D6 |  |
| <b>s.pPk 247 Strong Purplish Pink</b>        | (9P-3RP,3-9RP)<br>5.6RP6.8/9    | #F6768E |  | #E68FAC |  |
| <b>deep pPk 248 Deep Purplish Pink</b>       | (9P-3RP,3-9RP)<br>4.4RP6/12.2   | #EB5284 |  | #DE6FA1 |  |
| <b>l.pPk 249 Light Purplish Pink</b>         | (9P-3RP,3-9RP)<br>4.6RP8/5.5    | #FFA8AF |  | #EFBBCC |  |
| <b>m.pPk 250 Moderate Purplish Pink</b>      | (9P-3RP,3-9RP)<br>4.6RP6.8/6.7  | #E28090 |  | #D597AE |  |
| <b>d.pPk 251 Dark Purplish Pink</b>          | (3-9RP)<br>6.4RP5.9/7           | #C76574 |  | #C17E91 |  |
| <b>p.pPk 252 Pale Purplish Pink</b>          | (9P-3RP,3-9RP)<br>3.7RP8.4/3.3  | #FDBDBA |  | #E8CCD7 |  |
| <b>gy.pPk 253 Grayish Purplish Pink</b>      | (9P-3RP,3-9RP)<br>3.7RP7/3.5    | #CC9293 |  | #C3A6B1 |  |
| Purplish Red                                 |                                 |         |  |         |  |
| <b>v.pR 254 Vivid Purplish Red</b>           | (3-9RP,9RP-1R)<br>7.6RP4.9/13.6 | #D5265B |  | #CE4676 |  |
| <b>s.pR 255 Strong Purplish Red</b>          | (3-9RP,9RP-1R)<br>7.3RP4.4/11.4 | #B32851 |  | #B3446C |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก แสดงกระดาศีมาตรฐาน (NBS/ISCC Color System) (ต่อ)

|   |                                    |         |  |         |  |
|---|------------------------------------|---------|--|---------|--|
| <b>deep pR 256 Deep Purplish Red</b>          | (3-9RP,9RP-1R)<br>7.3RP2.6/10.1    | #6F0035 |  | #78184A |  |
| <b>v.deep pR 257 Very Deep Purplish Red</b>   | (3-9RP,9RP-1R)<br>6.8RP1.7/8       | #470027 |  | #54133B |  |
| <b>m.pR 258 Moderate Purplish Red</b>         | (3-9RP,9RP-1R)<br>7.1RP4.5/9       | #A73853 |  | #A8516E |  |
| <b>d.pR 259 Dark Purplish Red</b>             | (3-9RP,9RP-1R)<br>7.1RP2.7/6       | #5B1E31 |  | #673147 |  |
| <b>v.d.pR 260 Very Dark Purplish Red</b>      | (3-9RP,9RP-1R)<br>6.6RP0.9/4.8 OUT | #28071A |  | #38152C |  |
| <b>l.gy.pR 261 Light Grayish Purplish Red</b> | (3-9RP,9RP-1R)<br>7.8RP5.9/4.2     | #B27070 |  | #AF868E |  |
| <b>gy.pR 262 Grayish Purplish Red</b>         | (3-9RP,9RP-1R)<br>7RP4.5/5.1       | #8C4852 |  | #915F6D |  |
| Neutral                                       |                                    |         |  |         |  |
| <b>White 263 White</b>                        | (all) 2.5PB9.5/0.2                 | #FFC9D7 |  | #F2F3F4 |  |
| <b>l.Gy 264 Light Gray</b>                    | (all) 6.7Y7.4/0.2                  | #C2A894 |  | #B9B8B5 |  |
| <b>med.Gy 265 Medium Gray</b>                 | (all) 3.3GY5.4/0.1                 | #817066 |  | #848482 |  |
| <b>d.Gy 266 Dark Gray</b>                     | (all) 2.5PB3.5/0                   | #49423D |  | #555555 |  |
| <b>Black 267 Black</b>                        | (all) 2.5PB0.8/0<br>OUT            | #131313 |  | #222222 |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

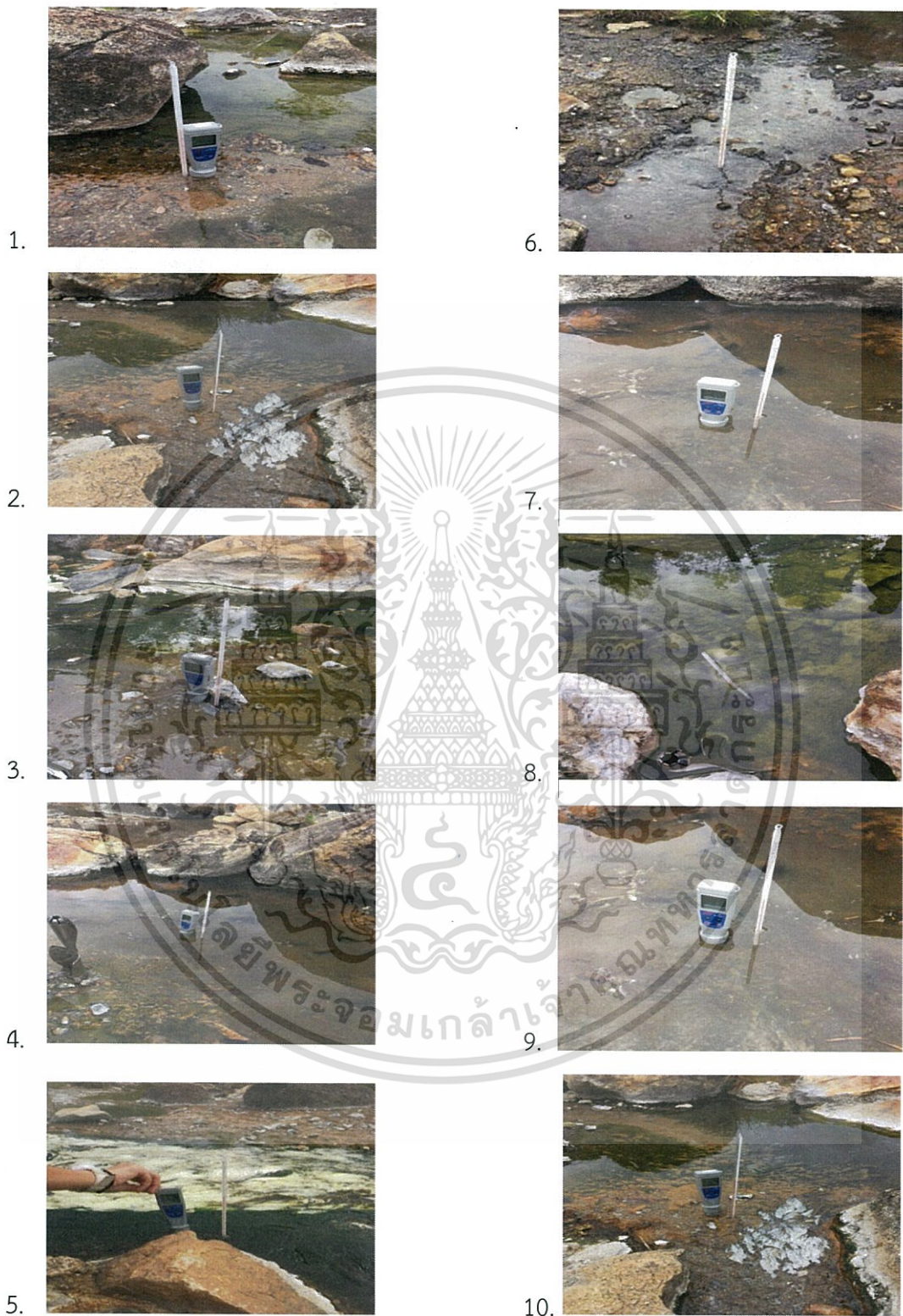
### ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

จุดเก็บตัวอย่างดินเป็นตัวอย่างดินจากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง



**รูป ค.1** แสดงลักษณะภูมิประเทศของบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินจากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน  
ตำบลเมืองปาน จังหวัดลำปาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.2 จุดเก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแอกติโนมัยซีทโดยวิธีที่ 1 เมื่อวันที่ 27 ธันวาคม 2560 เป็นตัวอย่างดินจากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



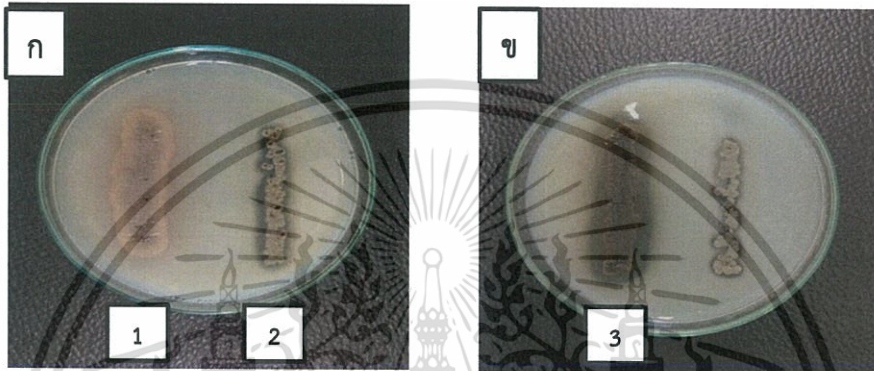
**รูปที่ ค.3** จุดเก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในการตัดแยกแอสติโนมัซิทโดยวิธีที่ 2 เมื่อวันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2561 เป็นตัวอย่างดินจากบ่อน้ำพุร้อนแจ้ซอน จังหวัดลำปาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### ภาพแสดงตัวอย่างผลการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น

#### 1. การทดสอบการย่อยสลายโปรตีน (Peptonization)



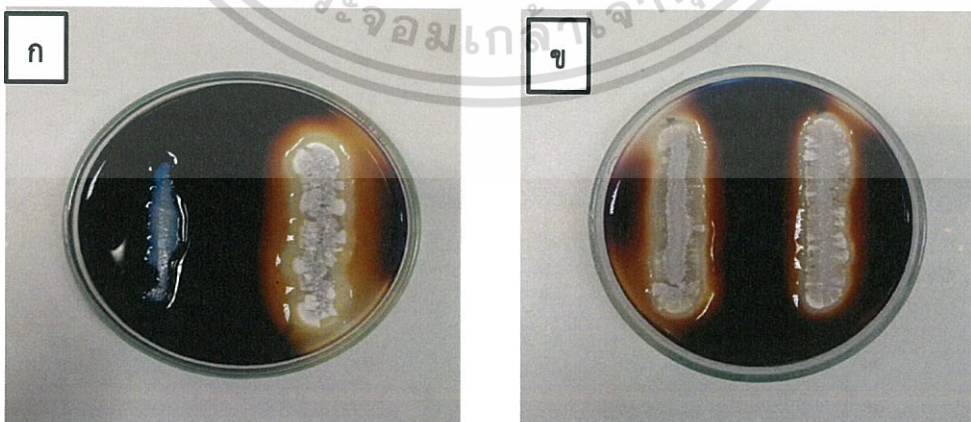
รูปที่ ง.1 แสดงผลการทดสอบการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar

(ก) หมายเลข 1 แสดงผล (-) ไม่เกิดการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar

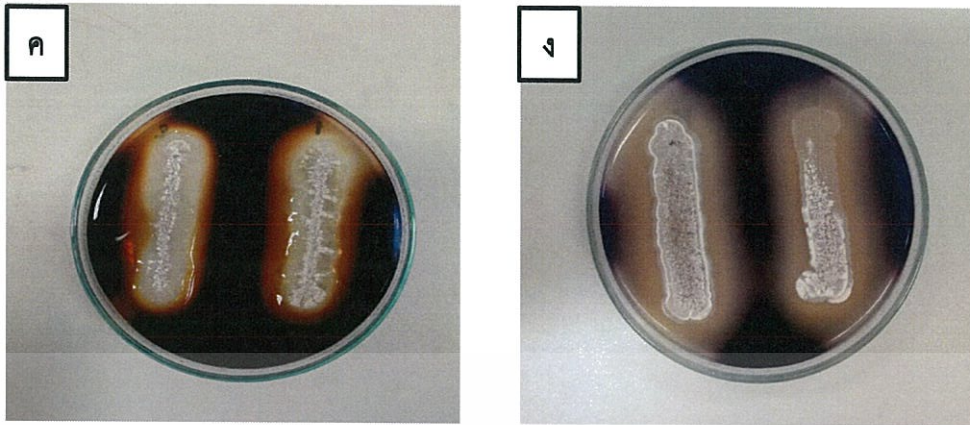
(ก) หมายเลข 2 แสดงผล (w) เกิดการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar เล็กน้อย

(ข) หมายเลข 3 แสดงผล (+) เกิดการย่อยสลายโปรตีนบนอาหาร Skim milk agar

#### 2. การทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch Hydrolysis)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๒.2 แสดงผลการทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar

- (ก) แสดงผล (-) ไม่เกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar (ด้านซ้าย)
- (ข) แสดงผล (w) เกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar เล็กน้อย
- (ค) แสดงผล (+) เกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar น้อย
- (ง) แสดงผล (++) เกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar ปานกลาง
- (จ) แสดงผล (+++) เกิดการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt-starch agar มาก

### 3. การทดสอบย่อยสลายไนเตรท (Nitrate Reduction)

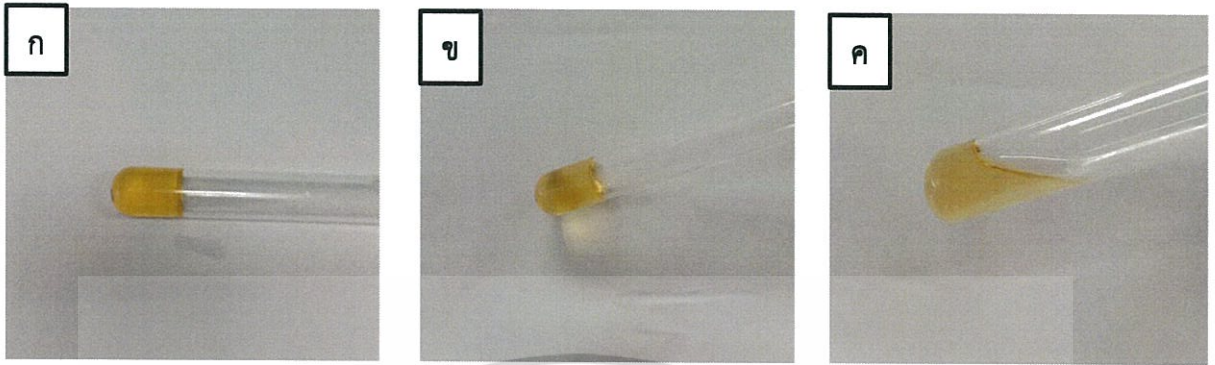


รูปที่ ๒.3 แสดงผลการทดสอบการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone  $\text{KNO}_3$  broth

- (ก) แสดงผล (-) ไม่เกิดการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone  $\text{KNO}_3$  broth
- (ข) แสดงผล (w) เกิดการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone  $\text{KNO}_3$  broth เล็กน้อย
- (ค) แสดงผล (+) เกิดการย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone  $\text{KNO}_3$  broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน (Gelatin Liquefaction)



รูปที่ ๔.๔ แสดงผลการทดสอบการย่อยสลายเจลาตินในอาหาร Bouillon Gelatin Broth

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการย่อยสลายเจลาตินในอาหาร Bouillon Gelatin Broth
- (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการย่อยสลายเจลาตินในอาหาร Bouillon Gelatin Broth
- (ค) แสดงผล (+) เกิดการย่อยสลายเจลาตินในอาหาร Bouillon Gelatin Broth

#### 5. การทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen Sulfide Production)



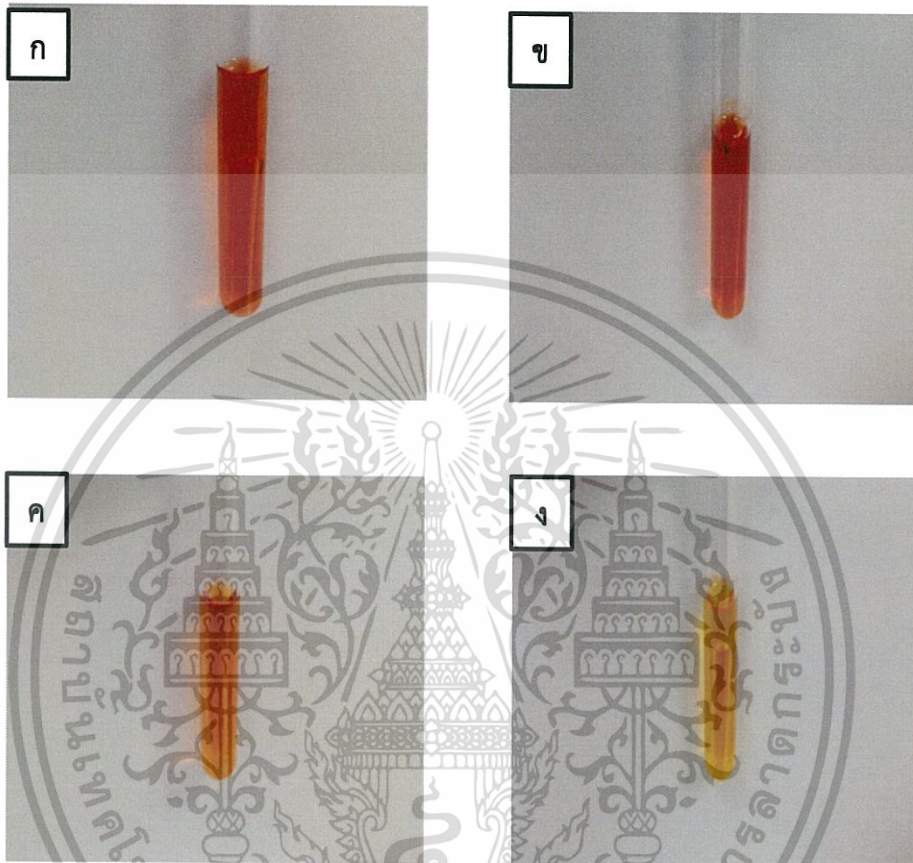
รูปที่ ๕.๕ แสดงผลการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหาร Tryptone-Yeast extract agar slant

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหาร Tryptone-Yeast extract agar slant
- (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหาร Tryptone-Yeast extract agar slant(ค) แสดงผล (w) เกิดการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ในอาหาร Tryptone-Yeast extract agar slant เล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6. การทดสอบการใช้น้ำตาลทั้ง 5 ชนิด

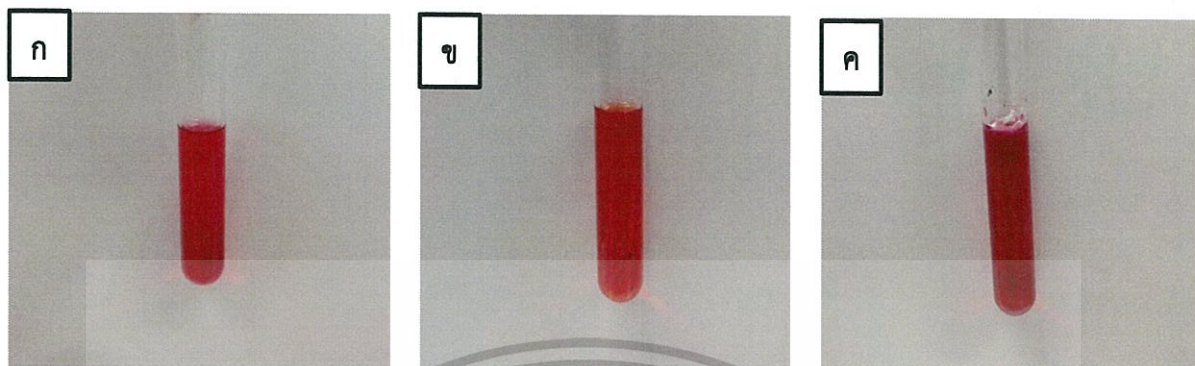
### 6.1 การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อแอกติโนมัยซีท



รูปที่ ๖.6 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหาร Phenol red glucose broth

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหาร Phenol red glucose broth
- (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหาร Phenol red glucose broth
- (ค) แสดงผล (w) เกิดการใช้น้ำตาลกลูโคสเล็กน้อยในอาหาร Phenol red glucose broth
- (ง) แสดงผล (+) เกิดการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหาร Phenol red glucose broth

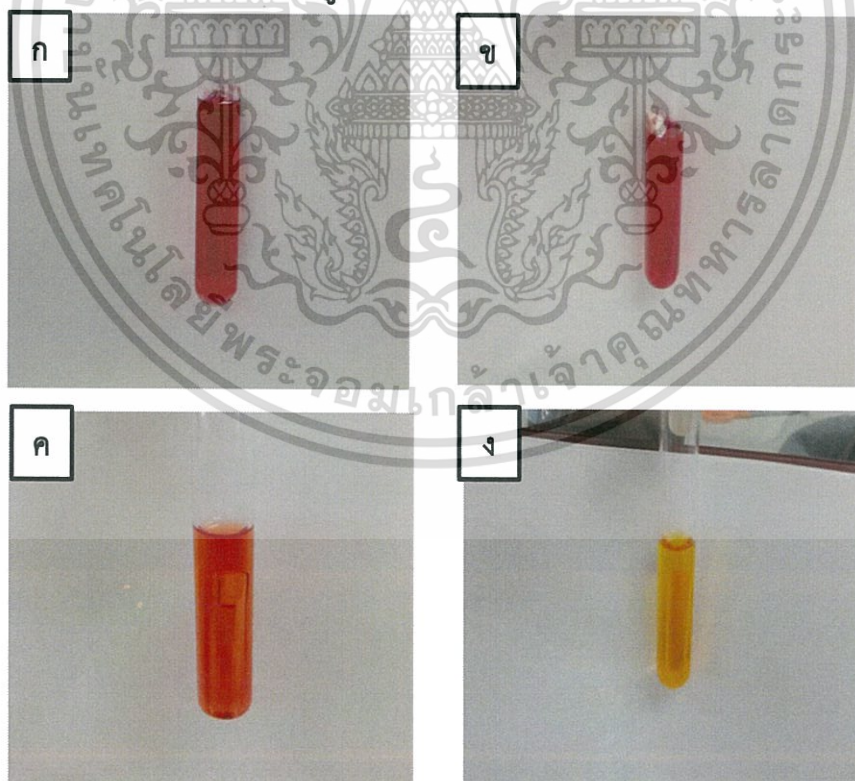
## 6.2 การทดสอบการใช้น้ำตาลแลคโตสของเชื้อแอคติโนมัยซีท



รูปที่ ๗.7 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลแลคโตสในอาหาร Phenol red lactose broth

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการใช้น้ำตาลแลคโตสในอาหาร Phenol red lactose broth
- (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการใช้น้ำตาลแลคโตสในอาหาร Phenol red lactose broth
- (ค) แสดงผล (w) เกิดการใช้น้ำตาลแลคโตสในอาหาร Phenol red lactose broth

## 6.3 การทดสอบการใช้น้ำตาลซูโครสของเชื้อแอคติโนมัยซีท

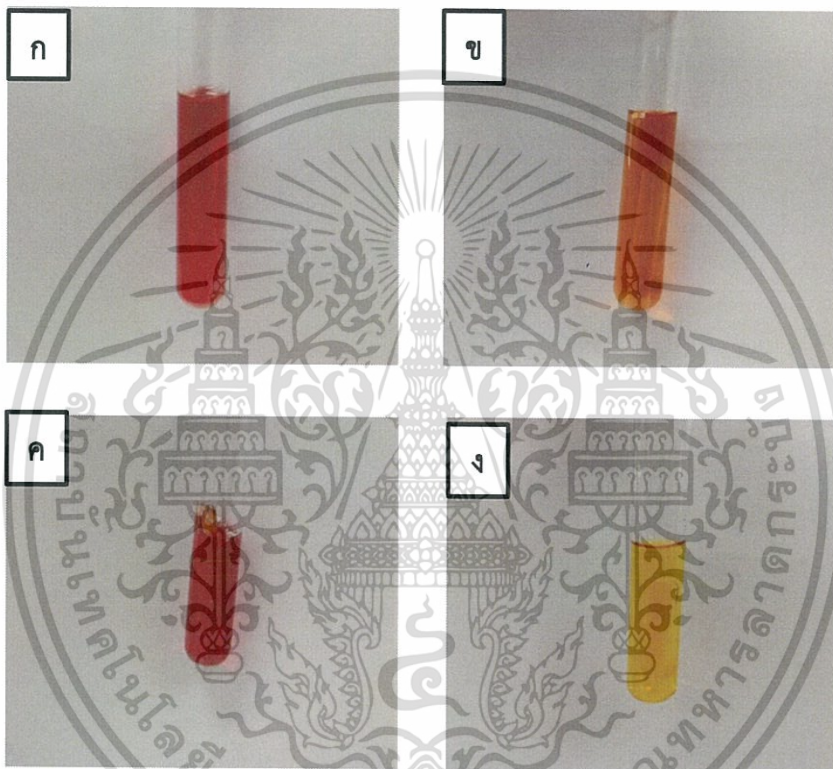


รูปที่ ๗.8 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลซูโครสในอาหาร Phenol red sucrose broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการใช้น้ำตาลซูโครสในอาหาร Phenol red sucrose broth  
 (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการใช้น้ำตาลซูโครสในอาหาร Phenol red sucrose broth  
 (ค) แสดงผล (w) เกิดการใช้น้ำตาลซูโครสเล็กน้อยในอาหาร Phenol red sucrose broth  
 (ง) แสดงผล (+) เกิดการใช้น้ำตาลซูโครสในอาหาร Phenol red sucrose broth

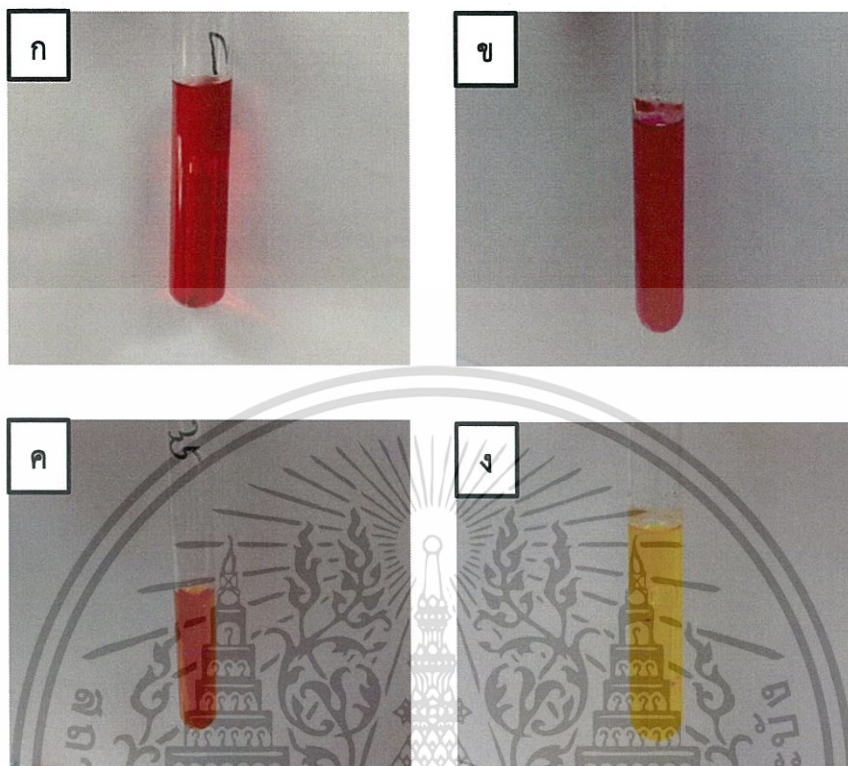
#### 6.4 การทดสอบการใช้น้ำตาลไซโลสของเชื้อแอคติโนมัยซีท



รูปที่ 9.9 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลไซโลสในอาหาร Phenol red xylose broth

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการใช้น้ำตาลไซโลสในอาหาร Phenol red xylose broth  
 (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการใช้น้ำตาลไซโลสในอาหาร Phenol red xylose broth  
 (ค) แสดงผล (w) เกิดการใช้น้ำตาลไซโลสเล็กน้อยในอาหาร Phenol red xylose broth  
 (ง) แสดงผล (+) เกิดการใช้น้ำตาลไซโลสในอาหาร Phenol red xylose broth

### 6.5 การทดสอบการใช้น้ำตาลแมนนิทอลของเชื้อแอคติโนมัยซีท



รูปที่ ๑.10 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลแมนนิทอลในอาหาร Phenol red manitol broth

- (ก) ชุดควบคุมการทดสอบการใช้น้ำตาลแมนนิทอลในอาหาร Phenol red manitol broth
- (ข) แสดงผล (-) ไม่เกิดการใช้น้ำตาลแมนนิทอลในอาหาร Phenol red manitol broth
- (ค) แสดงผล (w) เกิดการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเล็กน้อยในอาหาร Phenol red mannitol broth
- (ง) แสดงผล (+) เกิดการใช้น้ำตาลแมนนิทอลในอาหาร Phenol red manitol broth

## ภาคผนวก จ

## ผลการทดลอง

1. การหาค่าปริมาณของน้ำหนักตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

ตารางที่ จ.1 แสดงปริมาณของน้ำหนักตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแอกติโนมัยซีทโดยวิธีที่ 1 บริเวณบ่อน้ำร้อนแจ้ซ้อน จังหวัด ลำปาง

| จุดที่เก็บ<br>ตัวอย่าง | น้ำหนักภาชนะบรรจุดิน<br>(กรัม) | น้ำหนักสาร<br>แขวนลอยของดินที่<br>เจือจาง<br>(กรัม) | น้ำหนักสารแขวนลอย<br>ของดินและภาชนะหลัง<br>อบ<br>(กรัม) | น้ำหนักดินที่<br>ใช้ในการเจือ<br>จาง<br>(กรัม) |
|------------------------|--------------------------------|---|---|--|
| 1                      | 0.271                          | 6.785   | 1.140   | 5.916  |
| 2                      | 0.283                          | 6.317   | 1.311   | 5.289  |
| 3                      | 0.275                          | 7.018   | 1.200   | 6.093  |
| 4                      | 0.279                          | 7.120   | 1.359   | 6.040  |
| 5                      | 0.276                          | 6.244   | 1.182   | 5.338  |
| 6                      | 0.281                          | 6.879   | 1.066   | 6.094  |
| 7                      | 0.282                          | 7.194   | 1.399   | 6.077  |
| 8                      | 0.275                          | 7.077   | 1.283   | 6.069  |
| 9                      | 0.285                          | 6.548   | 1.040   | 5.798  |
| 10                     | 0.275                          | 6.804   | 1.182   | 5.897  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.2 แสดงปริมาณของน้ำหนักตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกแอกติโนมัยซีทโดยวิธีที่ 2 บริเวณบ่อน้ำร้อนแจ้ซ้อน จังหวัด ลำปาง

| จุดที่เก็บตัวอย่าง | น้ำหนักภาชนะบรรจุดิน (กรัม) | น้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่เจือจาง (กรัม) | น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและภาชนะหลังอบ (กรัม) | น้ำหนักดินที่ใช้ในการเจือจาง (กรัม) |
|--------------------|-----------------------------|--|--|-------------------------------------|
| 1                  | 0.276                       | 7.671                                    | 0.829  | 7.118                               |
| 2                  | 0.281                       | 8.475                                    | 1.258  | 7.498                               |
| 3                  | 0.282                       | 8.483                                    | 1.284  | 7.481                               |
| 4                  | 0.275                       | 8.341                                    | 1.157  | 7.459                               |
| 5                  | 0.284                       | 8.137                                    | 1.150  | 7.271                               |
| 6                  | 0.287                       | 8.342                                    | 1.196  | 7.433                               |
| 7                  | 0.286                       | 8.106                                    | 0.989  | 7.403                               |
| 8                  | 0.279                       | 8.212                                    | 1.012  | 7.479                               |
| 9                  | 0.287                       | 7.650                                    | 1.209  | 6.728                               |
| 10                 | 0.276                       | 7.848                                    | 1.149  | 6.975                               |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง จ.3 แสดงรูปภาพผลการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อุณหภูมิต่างๆ ที่คัดแยกได้จากวิธีที่ 1 และ 2

| หมายเลข<br>ไอโซเลต                                       | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)  |   |  |    |    |    |
|--|--|---|--|----|----|----|
|  | 45   | 50  | 55   | 60 | 65 | 70 |
| JSL8111 (ก)<br>JSL5112 (ข)<br>JSL10113(ค)<br>JSL10214(ง) |   |   | -  | -  | -  | -  |
| JSL9215(ก)<br>JSL9216(ข)<br>JSL9217(ค)<br>JSL9228(ง)     |   |   |   | -  | -  | -  |
| JSL9219 (ก)<br>JSL32210(ข)<br>JSL31111(ค)<br>JSL32212(ง) |  |  |  | -  | -  | -  |

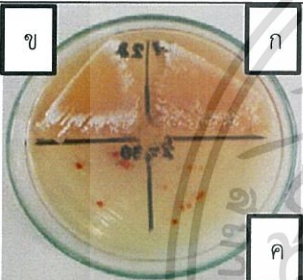


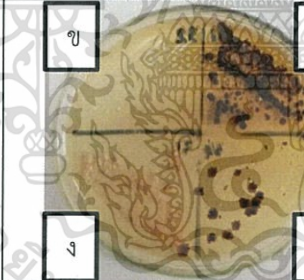

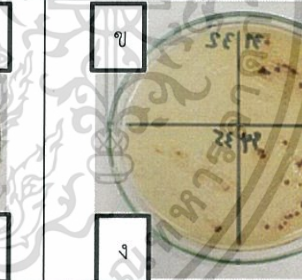



หมายเหตุ : (-) หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทไม่มีการเจริญทั้ง 4 ไอโซเลต

ตาราง จ.3 แสดงรูปภาพผลการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีที่อุณหภูมิต่างๆ ที่คัดแยกได้จากวิธีที่ 1 และ 2 (ต่อ)

| หมายเลข<br>ไอโซเลต | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) |    |    |    |    |    |
|--------------------|-------------------------|----|----|----|----|----|
|                    | 45                      | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 |
| JSL32213 (ก)       |                         |    |    |    |    |    |
| JSL32214 (ข)       |                         |    |    |    |    |    |
| JSL82115 (ค)       |                         |    |    | -  | -  | -  |
| JSL82116 (ง)       |                         |    |    |    |    |    |
| JSL82117 (ก)       |                         |    |    |    |    |    |
| JSL82118 (ข)       |                         |    |    |    |    |    |
| JSL61119 (ค)       |                         |    |    | -  | -  | -  |
| JSL61120 (ง)       |                         |    |    |    |    |    |
| JSL92221 (ก)       |                         |    |    |    |    |    |
| JSL92222 (ข)       |                         |    |    |    |    |    |
| JSL91123 (ค)       |                         |    |    | -  | -  | -  |
| JSL102226 (ง)      |                         |    |    |    |    |    |

หมายเหตุ : (-) หมายถึง เชื้อแอสคิโนมัยซีที่ไม่มีการเจริญทั้ง 4 ไอโซเลต



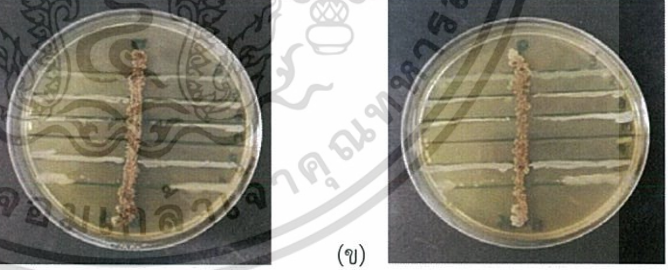
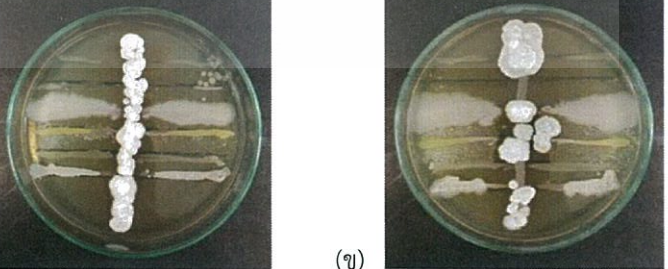
ตาราง จ.3 แสดงรูปภาพผลการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อุณหภูมิต่างๆ ที่คัดแยกได้จากวิธีที่ 1 และ 2 (ต่อ)

| หมายเลข<br>ไอโซเลต   | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)   |   |   |    |    |    |
|--|---|---|---|----|----|----|
|  | 45  | 50  | 55  | 60 | 65 | 70 |
| JSL92227 (ก)<br>JSL92228 (ข)<br>JSL52129 (ค)<br>JSL61130 (ง) |    | -   | -   | -  | -  | -  |
| JSL92131 (ก)<br>JSL92232 (ข)<br>JSL82134 (ค)<br>JSL92135 (ง) | <br> | <br> | <br> | -  | -  | -  |
| JSL41136 (ก)   |   |    | -   | -  | -  | -  |

หมายเหตุ : (-) หมายถึง เชื้อแอคติโนมัยซีทไม่มีการเจริญทั้ง 4 ไอโซเลต

**ตาราง จ.4 แสดงรูปภาพผลการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ**

ผลการศึกษาความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยซีทโดยยับยั้งเชื้อ *Escherichai coli*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

| กลุ่ม | หมายเลขไอโซเลท               | ผลการทดสอบ   |
|-------|------------------------------|--|
| 1     | JSL102226                    |    |
| 4     | JSL5112 (ก)<br>JSL31111 (ข)  |   |
| 6     | JSL9217 (ก)<br>JSL9219 (ข)   |  |
| 8     | JSL92221 (ก)<br>JSL92222 (ข) |  |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ฉ

### การเตรียมสารละลาย McFarland standard No. 0.5

มาตรฐาน McFarland ถูกนำมาใช้ในข้อมูลอ้างอิงในการปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่จะได้รับภายในช่วงที่กำหนด

#### การเตรียมสาร

##### 1. Sulfuric acid, 1% (vol/vol) ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

เติมน้ำ deionized water : DI 90 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติมน้ำ  $\text{H}_2\text{SO}_4$  เข้มข้นปริมาตร 1.0 ml ปรับปริมาตรด้วย DI ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 100 ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดแก้วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี

##### 2. Barium chloride, 1.175% (w/t) ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

ชั่ง  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.175 g เติมลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml เติมน้ำ DI 50 ml ผสมให้เข้ากันดีแล้วเติมน้ำ DI จนครบ 100 ml เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดแก้วไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี

#### การเตรียมมาตรฐาน McFarland

| McFarland standard No.                             | Vol (mL) |       |       |       |       |
|--|----------|-------|-------|-------|-------|
|  | 0.5      | 1     | 2     | 3     | 4     |
| $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.175%) | 0.05     | 0.1   | 0.2   | 0.3   | 0.4   |
| $\text{H}_2\text{SO}_4$ (1%)                       | 9.95     | 9.9   | 9.8   | 9.7   | 9.6   |
| Approx. cell density ( $1 \times 10^8$ CFU/ml)     | 1.5      | 3     | 6     | 9     | 12    |
| % Transmittance (wavelength of 600nm)              | 74.3     | 55.6  | 35.6  | 26.4  | 21.5  |
| Absorbance*  | 0.132    | 0.257 | 0.451 | 0.582 | 0.669 |

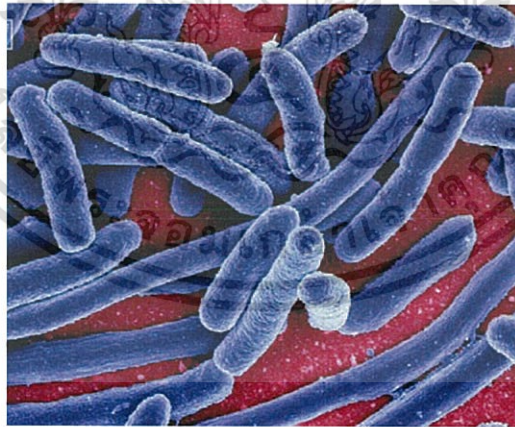
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

# เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆสำหรับการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อ แอกติโนมัยซีท

### 1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง (rod shape) มีขนาดตั้งแต่ 1.1- 1.5 × 2.0 – 6.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming ) สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) มีcapsule หุ้มอยู่รอบๆตัวทำให้เชื้อทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี (Doely, 1989) *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น โดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ *E. coli* เข้าสู่ระบบต่างๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557)

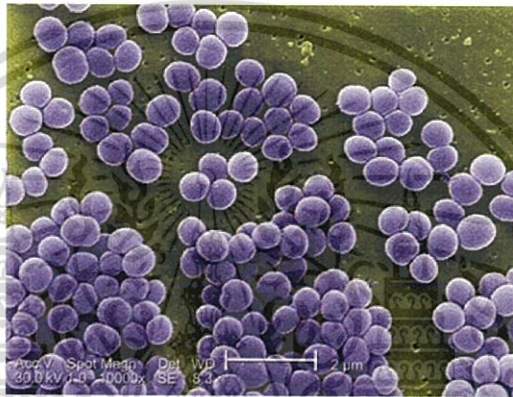


รูปที่ ข.1 แสดงลักษณะของเชื้อ *Escherichia coli*

ที่มา: (Niaidcdc, 2013)

## 2. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วย สายสั้นๆ เป็นกิ่งหรือเป็นลักษณะพวงองุ่น (spherical shape) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศและมีอากาศ (facultative anaerobes) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ 15 – 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ในระดับความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่นการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อ และโรคอาหารเป็นพิษ มีการสร้างเม็ดสีเหลืองในโคโลนี (พิมพ์เพ็ญ, 2549)



รูปที่ ข.2 แสดงลักษณะของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ที่มา : <http://articles.extension.org/pages/28432/staphylococcus-aureus>

### 3. *Bacillus subtilis*

เป็นแบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมบวก (gram positive bacteria) สามารถสร้างแคปซูลและสร้างสปอร์ได้ พบได้ทั่วไปในดิน *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้เพื่อควบคุมและป้องกันโรคพืชจากแบคทีเรียชนิดอื่นได้หลายชนิด เช่น *Erwinia* spp, *Alternaria* spp. และจากเชื้อรา (mold) เช่น *Fusarium* อีกทั้งยังผลิตเอนไซม์ เช่น อะไมเลส (amylase) ใช้ประโยชน์เพื่อย่อยสลายโมเลกุลของ starch hydrolysate และโปรตีเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นเพปไทด์ และเพปไทด์ หรือโปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate) (พิมพ์เพ็ญ, 2549)



รูปที่ ข.3 แสดงลักษณะของเชื้อ *Bacillus subtilis*

ที่มา : <https://www.indiamart.com/proddetail/bacillus-subtilis-3472880512.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. *Micrococcus luteus*

*Micrococcus luteus* เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม (coccus) มีการแบ่งเซลล์แบบ binary fission แบคทีเรียวงศ์นี้จะเกิดการแบ่งมากกว่าหนึ่งแนวทำให้เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มไม่สร้างสปอร์สร้างเม็ดสีได้ ทำให้มีสีต่างๆ เช่น สีชมพู สีแดง สีส้ม เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) (พรเฉลิม พงศ์&รัตนาปนนท์, 2010) สามารถพบได้ทั่วไปในมนุษย์ ฝุ่นละออง เป็นแบคทีเรียที่ไม่อันตรายแต่สามารถติดเชื้อได้ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันลดลง *M. luteus* ไม่เติบโตในที่ที่มียาปฏิชีวนะชนิด bacitracin อีกทั้งมีความสามารถพิเศษในการดูดซับรังสี UV มีเม็ดสีที่ดูดซับรังสียูวียาวได้ระหว่าง 350-475 นาโนเมตร (ชาญณรงค์, 2555)



รูปที่ ๔.4 แสดงลักษณะของเชื้อ *Micrococcus luteus*

ที่มา : <https://www.alamy.com/stock-photo-sem-micrococcus-luteus-bacteria-52600954.html>

### 5. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Pseudomonadaceae สามารถเคลื่อนที่ได้โดย flagellum 1 เส้นที่ติดอยู่ตรงหัว มีขนาด 0.5–1.0× 1.5-5.0 ไมโครเมตร ปกติจะพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช เป็น normal flora ในลำไส้คน ยังสามารถทำให้เกิดโรคในทั้งคน สัตว์ แมลงและต้นไม้ เป็นเชื้อโรคฉวยโอกาส จะมีการติดเชื้อมักกับผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือป่วยมากๆ หรือผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล (Honestdocs, 2560)



รูปที่ ๕.5 แสดงลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

ที่มา : <http://www.sci-news.com/medicine/antibiotic-octapeptin-drug-resistant-bacteria-05678.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6. *Candida albicans*

*Candida albicans* เป็นยีสต์ที่มีรูปร่างแบบวงรี (oval shape) และทรงไข่ (ellipsoidal shape) ที่ไม่มีแคปซูลห่อหุ้ม เพิ่มจำนวนได้โดยการแตกหน่อ (budding) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25-37 องศาเซลเซียส สามารถก่อโรคได้ทั้งคนและสัตว์ ซึ่งในภาวะร่างกายมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ยีสต์กลุ่มนี้จะไม่ก่อโรค แต่หากสมดุลระหว่างแบคทีเรียกับยีสต์ในร่างกายเปลี่ยนไป เช่น อวัยวะนั้นมีการอักเสบ ยีสต์นี้จะเจริญเติบโตในปริมาณที่มากเกินไปจนก่อให้เกิดโรคขึ้นได้ (เกียรติคุณ, 2013)



รูปที่ ๖.6 แสดงลักษณะของเชื้อ *Candida albicans*

ที่มา : [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida\\_albicans\\_\(Pathogenesis\)](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Candida_albicans_(Pathogenesis))

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวอภิญญา ฟิ่งน้ำ  
E-mail ryoma\_love\_day@hotmail.com

### ประวัติการศึกษา

2556 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์)

โรงเรียนสิริรัตนาธร

2560 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



ชื่อ-นามสกุล นางสาวออรยา กานต์กัมภ์สกุล  
E-mail kgunsgul@hotmail.com

### ประวัติการศึกษา

2556 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์)

โรงเรียนเซนต์โยเซฟพิพัส

2560 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 20 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นางสาวอภิญญา พึ่งน้ำ รหัสประจำตัว 57050917

นางสาวออรยา กานต์กัณฑ์สกุล รหัสประจำตัว 57050918

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ และฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทีที่แยกได้จากดินบ่อน้ำพุร้อนธรรมชาติแจ้ซ็อน จังหวัดลำปาง

ชื่อภาษาอังกฤษ Antimicrobial activity and phospholipid profile of actinomycetes isolated from hot spring soil sample, Chae son National Park, Lampang

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษามาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักษราวirus 0.93%

ลงชื่อ อภิญญา พึ่งน้ำ

( อภิญญา พึ่งน้ำ )

นักศึกษา

ลงชื่อ ออรยา กานต์กัณฑ์สกุล

( ออรยา กานต์กัณฑ์สกุล )

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ศ. / รศ. / ผศ. / ดร. / อ. ดร. ดนัยกานต์ กลิ่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ ดนัยกานต์ กลิ่นบุศย์

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้