ฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท จากดินป่าชายเลนสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ

PHOSPHOLIPIDS AND ANTIMICROBIAl ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM BANGPU RECREATION CENTER MANGROVE FOREST SOIL, SAMUTPRAKAN

ศรสวรรค์ อินพุ่ม
สวรส เลิศสัฒนนนท์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

ฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท จากดินป่าชายเลนสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ
PHOSPHOLIPIDS AND ANTIMICROBIAl ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM BANGPU RECREATION CENTER MANGROVE FOREST SOIL, SAMUTPRAKAN

ศรสวรรค์ อินพุ่ม
สวรส เลิศสัฒนนนท์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

PHOSPHOLIPIDS AND ANTIMICROBIAl ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM BANGPU RECREATION CENTER MANGROVE FOREST SOIL, SAMUTPRAKAN

SORNSAWAN INPUM

SAWAROT LEARTSATTANANON

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTIAL MICROBIOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ Phospholipids and Antimicrobial Activity of Actinomycetes from Bangpu Recreation Center Mangrove Forest Soil, Samutprakan
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ศรสวรรค์ อินพุ่ม รหัสนักศึกษา 57050896 นางสาว สวรส เลิศสัฒนนนท์ รหัสนักศึกษา 57050904
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.วีนา ชูโชติ ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว กรรมการ	
ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ศรสวรรค์ อินพุ่ม รหัสนักศึกษา 57050986
	นางสาว สวรส เลิศสัฒนนนท์ รหัสนักศึกษา 57050904
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 39 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากดินป่าชายเลน สถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ นำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ จากนั้นนำมาเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.46, 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้ออยู่ที่ 1 เปอร์เซนต์ ทำการคัดเลือกโดยทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีการ Modified cross-streak เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *Micrococcus luteus* ATCC 2374, *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 746, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 และ *Escherichia coli* ATCC 074 พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้จำนวน 9 ไอโซเลท ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ในอาหาร Yeast extract-Malt extract (YEME) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพด้วยวิธี Agar disc diffusion และ Agar well diffusion ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สูงที่สุด ได้แก่ ไอโซเลทที่ BP3472 ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 746 ขนาด 30.02 จากตัวเซลล์ในชั้นเมทานอล จากนั้นทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography ทั้ง 9 ไอโซเลท พบ 4 ไอโซเลทที่สามารถสร้าง Cadiolipin ได้แก่ ไอโซเลทที่ BP0133, BP1832, BP3543 และ BP3922

คำสำคัญ : ดินป่าชายเลน แอคติโนมัยซีท สภาวะการเพาะเลี้ยง ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นเกลือ ฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ ฟอสโฟลิปิด

Title	Phospholipids and Antimicrobial Activity of Actinomycetes from Bangpu Recreation Center Mangrove Forest Soil, Samutprakan
Student	Miss. Sornsawan Inpum Student ID 57050896
	Miss. Sawarot Leartsattananon Student ID 57050904
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut' Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	Dr.Khanungkan Klunbut

Abstract

39 isolates of actinomycetes were isolated from Bang Pu, Samutprakan mangrove

forest soil. The morphological and biochemical characteristics of the organism were examined. The effects of NaCl on growth were examined using SCA media supplemented with NaCl concentrations along with gradient of 0.46%, 1%, 3%, 5% (w/v) and found that all isolates had optimum growth when supplement with NaCl 1% (w/v). then this 39 isolates were tested their antimicrobial activity against 6 microorganisms including *Micrococcus luteus* ATCC 2374, *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 746, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 and *Escherichia coli* ATCC 074 and found that 9 isolates could inhibit test micriorganisms. Their antimicrobial activity could be measured by inhibition zone on agar disc diffusion and agar well diffusion at concentration of 50 mg/ml. BP3472 could inhibit *Staphylococcus aureus* ATCC 746 for 30.0 2 mm. from cellular's methanolextraction. Phospholipids profile were performed on thin layer chromatography (TLC) , Cardiolipin (CL), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamine (PE) could be found and another PLs; Phosphatidylserine (PS) and Phosphatidylinositol (PI) also revealed on their profile as well.

Key word : Mangrove forest soil, Actinomycetes, Antimicrobial activity, Phospholipids

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ทั้งด้านความรู้ คำแนะนำ การเดินทาง การยืมอุปกรณ์ในการทดลองต่างๆ โครงงานพิเศษจะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้หากขาดความกรุณาและการช่วยเหลือจาก ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อคิดเห็นต่างๆตลอดจนปรับปรุงแก้ไข ข้อบกพร่องด้วยความใส่ใจ และสละเวลาตรวจทานพิจารณาโครงงานพิเศษนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ตลอดจนอบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการตึกจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์ ตึกวิทย์เก่า และอาคารพระจอมเกล้า ตลอดจนเจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งสถานที่ และเครื่องมือที่ใช้ในการทำการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สำนักหอสมุดกลาง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการค้นคว้าหาข้อมูล รวมทั้งยืม-คืนหนังสือภายในหอสมุดกลาง

ขอขอบคุณบิดา มารดา และสมาชิกภายในครอบครัว รวมถึงผู้มีอุปการะคุณทุกท่าน ที่คอยอบรมสั่งสอน และคอยสนับสนุนให้กำลังใจ กำลังกายแก่คณะผู้ทำวิจัย รวมทั้งขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

หวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่บุคคลากรทางการศึกษาและผู้ที่สนใจทั่วไป ตลอดจนเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่จะศึกษาและนำไปพัฒนาต่อไป

ศรสวรรค์ อินพุ่ม
สวรส เลิศสัฒนนนท์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาแล้วความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตของการศึกษาโครงงานพิเศษ	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ระบบนิเวศป่าชายเลน	4
2.1.1 สิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตในระบบนิเวศป่าชายเลน	5
2.1.2 ลักษณะดินป่าชายเลน จังหวัดสมุทรปราการ	5
2.1.3 ผลพลอยได้จากดินป่าชายเลน	5
2.2 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยซีท	6
2.3 การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีท	6
2.3.1 *Micrococcus, Microbacterium* และสกุลที่เกี่ยวข้อง	6
2.3.2 *Mycobacterium, Norcadia* และสกุลที่เกี่ยวข้อง	6
2.3.3 Family *Pseudonocardiaceae* และสกุลที่เกี่ยวข้อง	7
2.3.4 Family *Micromonosporaceae*	7
2.3.5 Family *Thermomonosporaceae*	7
2.3.6 Family *Streptosporangiaceae*	7
2.3.7 Family *Streptomycetaceae*	7
2.3.8 สกุลอื่นๆ	8
2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท	8
2.4.1 การสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยซีท	8
2.4.2 ลักษณะของโคโลนี	9
2.4.3 โครงสร้างภายในของโคโลนี	10
2.5 การสร้างสปอร์	10
2.5.1 การสร้างสปอร์เดี่ยว	10
2.5.2 การสร้างสปอร์ที่เป็นสาย	11
2.5.3 การสร้างสปอร์ในอับสปอร์	12

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 รูปร่างลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยซีท.... 14
2.7 ก้านชูสปอร์และก้านชูอับสปอร์.... 15
2.8 โครงสร้างที่สำคัญในการจัดจำแนกระดับสกุล.... 16
2.8.1 เส้นใย.... 16
2.8.2 โคนิเดีย.... 16
2.9 วัฏจักรของแอคติโนมัยซีท.... 17
2.10 สารอาหารและพลังงานของแอคติโนมัยซีท.... 17
2.10.1 แหล่งพลังงาน.... 18
2.10.2 แหล่งคาร์บอน.... 18
2.10.3 แหล่งอิเล็กตรอน.... 18
2.10.4 แหล่งไนโตรเจน.... 18
2.10.5 แหล่งธาตุอื่นๆ.... 18
2.10.6 ไอออนของโลหะหนัก.... 18
2.10.7 วิตามินหรืออนุพันธ์ของวิตามิน.... 18
2.11 การพิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยซีท.... 19
2.11.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ.... 19
2.11.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและการทดสอบชีวเคมี.... 19
2.12 การผลิตฤทธิ์ต้านทานทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท.... 19
2.13 การใช้ยาปฏิชีวนะ.... 19
2.14 ประโยชน์ของแอคติโนมัยซีท และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.... 21
2.15 ฟอสโฟลิปิด.... 22
2.16 โครมาโทกราฟี แบบชั้นบาง (thin layer chromatography).... 23
2.16.1 หลักการของโครมาโทกราฟี.... 23
2.16.2 วิธีการทำโครมาโทกราฟี.... 23
2.16.3 ค่า Rf.... 23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.... 24
3.1 เครื่องมือ.... 24
3.2 อุปกรณ์.... 25
3.3 สารเคมี.... 26
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ.... 27
3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ.... 28
3.6 ฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน.... 28
3.7 วิธีการดำเนินงานวิจัย.... 28
3.7.1 การเก็บตัวอย่างดิน.... 28

สารบัญ (ต่อ)

หน้า
3.7.2 การเพาะเลี้ยง การแยก และการเก็บรักษาเชื้อแอคติโนมัยซีท.................... 28
3.7.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน.............................. 29
3.7.3.1 การหาน้ำหนักดิน... 29
3.7.3.2 การหาปริมาณความชื้น... 29
3.7.3.3 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง.. 29
3.7.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา.. 29
3.7.5 การเตรียม spore suspension.. 30
3.7.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ..................... 30
3.7.7 การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ... 30
3.7.7.1 การย่อยสลายโปรตีนในนม Peptonization............................... 30
3.7.7.2 การย่อยสลายเจลาติน.. 30
3.7.7.3 การย่อยสลายไนเตรท.. 31
3.7.7.4 การย่อยสลายแป้ง.. 31
3.7.7.5 การตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล.......................... 31
3.7.8 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์.. 31
3.7.9 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น................ 32
3.7.10 การทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion.. 33
3.7.10.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท............ 32
3.7.10.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีท.................. 32
3.7.10.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ... 32
3.7.10.4 การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ.. 33
3.7.10.5 การทดสอบฤทธิ์โดยเทคนิค Agar disc diffusion.................... 33
3.7.11 การทดสอบโดยเทคนิค Agar well diffusion... 33
3.7.12 การศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography......... 34
3.7.12.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท.............. 34
3.7.12.2 การศึกษาฟอสโฟสิปิด้วยเทคนิค Thin layer chromatography... 34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย.. 35
4.1 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท.. 35
4.2 สมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน.. 36
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท............................ 36
4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท................. 36
4.3.2 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้.. 81
4.3.3 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท......................... 82

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น........................ 89
4.5 การทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion.. 93
4.5.1 แอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต..... 93
4.5.2 แอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จากสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล.......... 93
4.6 การทดสอบโดยเทคนิค Agar well diffusion.. 97
4.6.1 แอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต..... 97
4.6.2 แอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จากสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล.......... 98
4.7การศึกษาฟอสโฟลิปิดโดยเทคนิค Thin layer chromatography.................... 106
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.. 116
5.1 สรุปผลการวิจัย.. 116
5.2 ข้อเสนอแนะ... 118
เอกสารอ้างอิง... 119
ภาคผนวก.. 123
ภาคผนวก ก.. 125
ภาคผนวก ข.. 129
ภาคผนวก ค.. 132
ภาคผนวก ง.. 133
ภาคผนวก จ.. 134
ภาคผนวก ฉ.. 135
ภาคผนวก ช.. 138
ภาคผนวก ซ.. 142
ภาคผนวก ฌ.. 145
ประวัติผู้วิจัย.. 159

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 สารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างโดยแอคติโนมัยซีท	20
4.1 หมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีท	35
4.2 สมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน	36
4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท	76
4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท	83
4.5 แสดงผลทดสอบการย่อยสลายโปรตีน	84
4.6 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อแอคติโนมัยซีท	85
4.7 ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์	87
4.8 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	90
4.9 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจากน้ำหมักโดยเทคนิค Agar disc diffusion	94
4.10 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจากตัวเซลล์โดยเทคนิค Agar disc diffusion	95
4.11 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจากน้ำหมักโดยเทคนิค Agar well diffusion	98
4.12 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจากตัวเซลล์โดยเทคนิค Agar well diffusion	99
4.13 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอคติโนมัยซีท	114
1 (ฉ) ปริมาตรของน้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจาง 10^{-1}	135
2 (ฉ) ปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินที่หายไป	136
3 (ฉ) ความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างดิน	137
1 (ณ) กระดาษสีมาตรฐาน	145

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง	8
2.2	ตัวอย่างโคโลนีของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดิน	9
2.3	โครงสร้างของเส้นใยอากาศของแอคติโนมัยซีท	10
2.4	การสร้างสปอร์เดี่ยว	11
2.5	ลักษณะสปอร์ที่เป็นสาย	11
2.6	การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาว	12
2.7	รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร	13
2.8	รูปทรงของอับสปอร์บนสายใยอากาศ	14
2.9	ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์	15
2.10	วัฏจักรของแอคติโนมัยซีท	17
2.11	โซนยับยั้งเชื้อที่มีสารสกัดยาปฏิชีวนะ	20
2.12	แสดงโครงสร้างโมเลกุลของฟอสโฟลิพิด	22
4.1	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP15102	37
4.2	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1671	38
4.3	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1722	39
4.4	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2321	40
4.5	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2461	41
4.6	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1141	42
4.7	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3792	43
4.8	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0981	44
4.9	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3192	45
4.10	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0262	46
4.11	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0532	47
4.12	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1431	48
4.13	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1832	49
4.14	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2213	50
4.15	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2931	51
4.16	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3851	52
4.17	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1392	53
4.18	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0133	54
4.19	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1033	55
4.20	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP30101	56
4.21	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3661	57
4.22	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2112	58

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ หน้า

4.23 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3472.................................... 59
4.24 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3543.................................... 60
4.25 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0663.................................... 61
4.26 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1213.................................... 62
4.27 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1981.................................... 63
4.28 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2013.................................... 64
4.29 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0313.................................... 65
4.30 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0451.................................... 66
4.31 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0713.................................... 67
4.32 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0812.................................... 68
4.33 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2531.................................... 69
4.34 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2693.................................... 70
4.35 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2712.................................... 71
4.36 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2813.................................... 72
4.37 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3231.................................... 73
4.38 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3323.................................... 74
4.39 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3922.................................... 75
4.40 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีท.. 81
4.41 แอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ............................. 91
4.42 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งด้วยวิธี Agar disc diffusion......................... 96
4.43 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Micrococcus luteus*... 100
4.44 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Bacillus subtilis*.. 101
4.45 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Escherichia coli*... 102
4.46 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*... 103
4.47 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Staphylococcus aureus*... 104
4.48 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Candida albicans*... 105
4.49 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องและวิถีการสังเคราะห์คาร์ดิโอลิปินในแบคทีเรีย............................. 109
4.50 standard การทำ Thin layer chromatography.. 110
4.51 ผลจากการทำ thin layer chromatography.. 111
4.52 ผลจากการทำ thin layer chromatography.. 112
1 (ข) แสดงถึงสภาพแวดล้อมของจุดเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลน.. 129
2 (ข) แสดงถึงจุดเก็บตัวอย่างดิน จุดที่ 1-5 อยู่ในบริเวณป่าโกงกาง...................................... 130
3 (ข) แสดงถึงจุดเก็บตัวอย่างดิน จุดที่ 6-10 อยู่ในบริเวณป่าแสม.. 131
1 (ซ) ผลการทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในนม... 138

รูปภาพที่ **หน้า**

2 (ช) ผลการทดสอบการย่อยสลายเจลาติน........ 138
3 (ช) ผลการทดสอบการย่อยสลายไนเตรท........ 139
4 (ช) ผลการทดสอบการย่อยสลายแป้ง........ 139
5 (ช) ผลทดสอบการย่อยสลายน้ำตาล........ 140
6 (ช) ผลการทดสอบการใช้เกลือ........ 141
1 (ซ) แสดงลักษณะรูปร่างของ *Staphylococcus aureu*........ 142
2 (ซ) แสดงลักษณะรูปร่างของ *Bacillus subtilis*........ 142
3 (ซ) แสดงลักษณะรูปร่างของ *Micrococcus luteus*........ 143
4 (ซ) แสดงลักษณะโคโลนีของ *Escherichia coli*........ 143
5 (ซ) แสดงลักษณะโคโลนีของ *Pseudomonas aeruginosa*........ 144
6 (ซ) แสดงลักษณะโคโลนีของ *Candida albicans*........ 144

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

ยาต้านจุลชีพ มีทั้งยาต้านแบคทีเรีย ยาต้านไวรัส ยาต้านรา และยาต้านปรสิต ยาต้านจุลชีพมีสมบัติที่แตกต่างจากยากลุ่มอื่นอย่างน้อย 2 ประการ ได้แก่ ยาต้านจุลชีพยับยั้งและทำลายเชื้อโรคโดยมีผลต่อเนื้อเยื่อและเซลล์ของมนุษย์น้อยมาก ขณะที่ยากลุ่มอื่นมักมีผลต่อเนื้อเยื่อและเซลล์ของมนุษย์เป็นสำคัญ และการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่เหมาะสมยังชักนำให้เชื้อเกิดการดื้อยา (วิษณุ, 2554) ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา การดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimocrobial resistance) ของเชื้อแบคทีเรียได้ทวีความรุนแรงมากขึ้นและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ยาต้านจุลชีพที่ในอดีตเคยใช้ได้ผลกลับกลายเป็นใช้ไม่ได้ผลแล้วในปัจจุบัน ดังนั้นจำเป็นต้องหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ ยกตัวอย่าง เช่นแบคทีเรียในดินป่าชายเลน

ป่าชายเลน เป็นระบบนิเวศที่ประกอบด้วย พืชและสัตว์นานาชนิด ดำรงชีวิตร่วมกันในสภาพแวดล้อมที่เป็นดินเลน น้ำกร่อย หรือมีน้ำทะเลท่วมถึงสม่ำเสมอ เป็นระบบนิเวศที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเนื่องจาก ดินในป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์สูงของแหล่งคาร์บอนและสารอาหาร (Rodríguez *et al.*, 2017) เป็นที่อยู่อาศัยของสิ่งมีชีวิตและจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันทางชีววิทยา

แอคติโนแบคทีเรียเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์โปรคาริโอต ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีคุณค่าทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างมากโดยมีเบสกวานีนและไซโตซีนสูงกว่าแบคทีเรียกแกรมบวกทั่วไปประมาณ 78% ซึ่งจะพบได้มากในดินที่มีความเป็นด่างและแห้ง จุลินทรีย์โปรคาริโอตถูกนำมาใช้ประโยชน์เพื่อมาประยุกต์ใช้ทางชีวการแพทย์ และอุตสาหกรรมต่าง ๆ (Meena *et al.*, 2013) จึงเป็นสถานที่ ที่น่าสนใจเกี่ยวกับการศึกษาจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน ได้แก่ แอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ guanine + cytosine สูงกว่า 55% มีลักษณะเป็นเส้นใยรูปแบบการแตกกิ่งก้านและการสร้าง Conidia ซึ่งคล้ายคลึงกับเชื้อรา ด้วยเหตุนี้พวกเขาจึงเรียกว่า ray fungi (Chaudhary *et al.*, 2013) แอคติโนมัยซีทมีการกระจายอย่างกว้างขวางในธรรมชาติและมีความสามารถในการผลิตสารที่ใช้งานทางชีวภาพได้หลากหลาย เช่น antibacterial antiviral antifungal (Elbendary *et al.*, 2017)

ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) เป็นองค์ประกอบสำคัญในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำหน้าที่ให้สารบางชนิดผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ โมเลกุลฟอสโฟลิปิดแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (Nakamura, 2017)

ในการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้จะมุ่งเน้นไปที่การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน บริเวณสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี ความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ ด้วยวิธี Agar disc diffusion และ agar well diffusion ศึกษาฟอสโฟลิปิดที่พบบริเวณผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีทจากสารสกัดหยาบ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน บริเวณสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ

1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้

1.2.3 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากดินป่าชายเลน

1.2.3 เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารทุติยภูมิจากเชื้อแอคติโนมัยซีท และทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ โดยใช้ วิธี agar disc diffusion และ agar well diffusion

1.2.4 เพื่อศึกษาการสกัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆของแอคติโนมัยซีท โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

1.3 ขอบเขตของการศึกษาโครงงานพิเศษ

งานวิจัยนี้ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งธรรมชาติในบริเวณสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ นำมาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีทเพื่อศึกษาการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ และศึกษาฟอสโฟลปิด โดยทำการคัดแยกเชื้อในอาหาร Starch Casein Agar (SCA) 2 แบบ โดยในแบบแรกเป็นอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำทะเลเทียม (ความเข้มข้นร้อยละ 3.7) และแบบที่สองเป็นอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำทะเลจริง (อัตราส่วนน้ำทะเลจริงต่อน้ำกลั่น 1:2) และได้เติมยาปฏิชีวนะ Nystatin และ Nalidixic (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร)ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อที่บริสุทธิ์ในหลอดอาหารเอียงที่มีชื่อว่า International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ นำเชื้อที่ได้ไปทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพด้วยวิธี Ager disc diffusion และ Ager well diffusion จากนั้นทำการสกัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆที่บริเวณผนังเซลล์เพื่อทำการศึกษาและวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดโดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากแหล่งดินป่าชายเลน บริเวณสถานตากอากาศบางปูจังหวัดสมุทรปราการ

1.4.2 สามารถจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทได้

1.4.3 สามารถทราบถึงอาหารที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของแอคติโนมัยซีทได้ในอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำทะเลเทียมและน้ำทะเลจริง

1.4.4 สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1,3 และ 5 ได้

1.4.5 สามารถทำการสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยซีท เพื่อการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้

1.4.6 สามารถทำการสกัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ ของแอคติโนมัยซีทได้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบนิเวศป่าชายเลน

ป่าชายเลน (mangrove forest หรือ intertidal forest) เป็นระบบนิเวศที่อยู่ในแนวเชื่อมต่อระหว่างผืนแผ่นดินกับ พื้นน้ำ ทะเลในเขตร้อน (Tropical) และกึ่งร้อน (Subtropical) ของโลก ประกอบด้วยพืชและสัตว์หลากหลายชนิด ดำรงชีวิตร่วมกันภายใต้สภาพแวดล้อมที่เป็นดินเลนน้ำกร่อย และมีน้ำทะเลท่วมถึงอย่างสม่ำเสมอ (ทายาท, 2558) ดังนั้นป่าชายเลนจะพบได้ในบริเวณที่เป็นชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ อ่าว ทะเลสาบ และรอบเกาะแก่งต่างๆ ในพื้นที่ชายฝั่งทะเลเราสามารถเรียก ป่าชายเลนว่า “ป่าโกงกาง” ได้อีกชื่อหนึ่งตามพันธุ์ไม้สำคัญ และพบเป็นจำนวนมาก นั่นคือไม้โกงกาง โดยป่าโกงกางนับว่าเป็นแหล่งสำคัญของแหล่งคาร์บอนและ (Castro, 2017) ระบบนิเวศป่าชายเลนประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิตซึ่งมีความสัมพันธ์ระหว่างกันอย่างซับซ้อน ทั้งในแง่ของการหมุนเวียนของธาตุอาหารและการถ่ายทอดพลังงาน กล่าวคือ เมื่อผู้ผลิต คือ พันธุ์พืชป่าชายเลนเจริญเติบโตจากการสังเคราะห์ด้วยแสง ส่วนของต้นไม้ โดยเฉพาะใบไม้ กิ่งไม้และเศษไม้ จะร่วงหล่นทับถมลงในน้ำและดิน จากนั้นจะถูกย่อยสลายโดยผู้ย่อยสลายกลายเป็นอินทรียวัตถุ ในที่สุดก็จะกลายเป็นแร่ธาตุอาหารของผู้บริโภคขั้นต้น คือ พวกกินสารอินทรีย์ ได้แก่ กลุ่มแพลงก์ตอนสัตว์ พวกกินสารอินทรีย์เหล่านี้จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและกลายเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญให้แก่ผู้บริโภคลำดับถัดไปซึ่งได้แก่ สัตว์น้ำขนาดเล็กชนิดต่าง ๆ เช่น ลูกกุ้ง ลูกปู ลูกปลา เป็นต้น สัตว์น้ำเหล่านี้จะเจริญเติบโตขึ้นและกลายเป็นอาหารของ กุ้ง ปู และปลาที่มีขนาดใหญ่กว่าและในขั้นสุดท้ายพวกสัตว์น้ำขนาดใหญ่เหล่านี้ จะกลายมาเป็นอาหารของมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคอันดับสุดท้าย (ชยานันต์ และคณะ, 2559)

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของพืชและสัตว์ในป่าชายเลน คือ

1. ภูมิประเทศชายฝั่ง
2. ภูมิอากาศ
3. น้ำขึ้นน้ำลง
4. คลื่นและกระแสน้ำ
5. ความเค็มของน้ำ
6. ออกซิเจนละลาย
7. ดิน
8. ธาตุอาหาร

สิ่งแวดล้อมป่าชายเลนมีความแตกต่างจากสิ่งแวดล้อมอื่นๆอย่างมาก ลักษณะการกระจายตัวและลักษณะทางชีววิทยาของของแอคติโนมัยซีทคาดว่าจะมีความแตกต่างจากแอคติโนมัยซีทที่ได้จากดินทั่วไป การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของป่าชายเลนมีความสำคัญไม่เพียงแต่ในแง่ของการวิจัยพื้นฐาน แต่ยังมีความสำคัญสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพการใช้ประโยชน์จากสิ่งมีชีวิต (Thawai *et al.*, 2008)

2.1.1 สิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตในระบบนิเวศป่าชายเลน

สิ่งไม่มีชีวิต ประกอบไปด้วยพวกธาตุอาหาร เกลือแร่ น้ำ พวกซากพืช ซากสัตว์ ยังรวมไปถึงสภาพภูมิอากาศ เช่น อุณหภูมิ แสง ฝน ความชื้น เป็นต้น

สิ่งมีชีวิต ประกอบด้วย ผู้ผลิต ผู้บริโภค และผู้ย่อยสลาย ผู้ผลิต ในที่นี้หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงเองได้ ได้แก่ พืชพันธุ์ไม้ต่างๆ ในป่าชายเลน รวมไปถึง ไดอะตอม แพลงค์ตอนพืช และสาหร่าย

ผู้บริโภค คือ สิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ ต้องพึ่งพาอาศัยพวกอื่น ได้แก่ พวกสัตว์หน้าดินขนาดเล็ก เช่น แพลงตอนสัตว์ ปู ไส้เดือนทะเล และสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่นปลา กุ้ง ปู รวมไปถึง นก สัตว์เลื้อยคลานและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งบางชนิดเป็นพวกกินอินทรีย์สาร บางชนิดเป็นพวกกินพืช บางชนิดเป็นพวกกินสัตว์ และบางชนิดเป็นพวกกินทั้งพืช และสัตว์

ผู้ย่อยสลาย ซึ่งหมายถึงพวกจุลินทรีย์ทั้งหลายที่ช่วยในการทำลายหรือย่อยสลายซากพืชและซากสัตว์ให้เน่าเปื่อยผุพัง จนในที่สุดสลายตัวเป็นธาตุอาหารและปุ๋ยซึ่งสะสมเป็นแหล่งอาหารในดินเพื่อประโยชน์ต่อผู้ผลิตต่อไป ซึ่งได้แก่ รา แบคทีเรีย ในป่าชายเลนผู้ย่อยสลายยังรวมถึง ปูและหอยบางชนิดด้วย (พูลศรี, 2556)

2.1.2 ลักษณะดินป่าชายเลน จังหวัดสมุทรปราการ

ดินป่าชายเลนในจังหวัดสมุทรปราการสามารถขุดหน้าตัดดินได้ ลึกประมาณ 40 เซนติเมตร เกือบทั้งหมดเป็นดินเหนียวที่มีเนื้อละเอียดมาก(มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ส่วนมากมีกลิ่นของซากพืชซากสัตว์ ดินส่วนใหญ่มีสีในกลุ่มสีน้ำตาล(7.5YR) และ กลุ่มสีเทาอมฟ้า (G2) ที่ความลึก 0-5 เซนติเมตร อุณหภูมิดินอยู่ในช่วง 27.0-31.0 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย 29.0 องศาเซลเซียส) มีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.0-6.4 จัดอยู่ในกลุ่มดินที่มีความเป็นกรดปานกลาง ส่วนที่ความลึก 5-40 เซนติเมตร อุณหภูมิอยู่ในช่วงระหว่าง 25.0-28.0 องศาเซลเซียส (เฉลี่ย 26.5 องศาเซลเซียส) มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.2-6.4 จัดอยู่ในกลุ่มดินที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย ที่ความลึกจากผิวดินลึกลงไปถึงระดับ 40 เซนติเมตร บนพื้นที่หน้าตัดส่วนมากพบรากไม้ปะปนและปริมาณจุดประ (Jarosite) ในชั้นหน้าตัดดินระหว่างร้อยละ 2-20 แต่ไม่พบหินปะปนในชั้นหน้าตัดดินนี้ปริมาณคาร์บอนรวมอยู่ในช่วงร้อยละ 1.78-3.67 โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 2.73 ปริมาณไนโตรเจนรวมอยู่ในช่วงร้อยละ 0.23-0.41 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.32 ค่า C:Nratio ของดินโดยรวมของจังหวัดสมุทรปราการเท่ากับ 8.5:1 บ่งชี้ ว่าดินเลนบริเวณนี้มีไนโตรเจนในปริมาณที่ค่อนข้างมากเกินไป เทียบกับปริมาณคาร์บอนในดิน ปริมาณฟอสฟอรัสรวมอยู่ในช่วงร้อยละ 0.100-0.141 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.120 (ศูนย์วิจัยป่าไม้, 2553)

2.1.3 ผลพลอยได้จากดินป่าชายเลน

ในปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดมีการดื้อยามากขึ้น ทำให้การรักษาเริ่มหมดประสิทธิภาพลง เช่น *Staphylococcus aureus* บางสายพันธุ์ที่มีแหล่งที่มาจากโรงพยาบาลสามารถดื้อยาที่ใช้รักษาได้หมดทุกชนิด จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อแก้ปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคดังกล่าว แต่ในช่วง 20 กว่าปีที่ผ่านมามีรายงานการพบสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีทที่จะนำมาพัฒนาต่อน้อยลง โดยมักพบว่าสารที่พบเป็นชนิดที่เคยรายงานมาแล้ว ในทำนองเดียวกันการใช้สารเคมีฆ่าแมลงจำนวนมากทางการเกษตรก็ได้ก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของศัตรูพืช เนื่องจากป่าชายเลนเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญยิ่งของระบบนิเวศบริเวณชายฝั่งทะเล และมี

ความหลากหลายทางชีวภาพสูง ส่วนทะเลและมหาสมุทรก็เป็นบริเวณที่ครอบคลุมพื้นที่โลกมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และเป็นแหล่งที่มีการศึกษาทางด้านแอคติโนมัยซีทไม่มากนัก รวมทั้งการที่พบว่าในช่วงที่ผ่านมามีรายงานการค้นพบแอคติโนมัยซีทสกุลใหม่จากทะเลและมหาสมุทรจำนวนมาก ดังนั้นการค้นหาแอคติโนมัยซีทจากแหล่งของสิ่งแวดล้อมใหม่ ๆ เช่น จากดินตะกอนทะเล หรือจากตะกอนป่าชายเลนในเขตร้อนของประเทศไทยซึ่งยังไม่ค่อยมีการศึกษาค้นคว้ามากนัก จึงเป็นความคาดหวังของคณะผู้วิจัยที่จะค้นพบแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่ที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่เพื่อช่วยแก้ปัญหาการดื้อยาดังกล่าว (วสุ, 2554)

2.2 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยซีท

เชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย ตั้งแต่ลักษณะเป็นท่อน ทรงกลม มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา เชื้อในกลุ่มนี้มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเกิดจากการแตกหักของเส้นใย (fragmentation) หรือการสร้างสปอร์บนเส้นใย ชูขึ้นมาในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในแอคติโนมัยซีท สปอร์ที่สร้างขึ้นมีทั้งลักษณะสปอร์แบบไม่มีถุงหุ้มซึ่งเกิดบริเวณปลายเส้นใย (conidia) อาจพบเป็นเม็ดเดี่ยวๆหรือเรียงตัวต่อกันเป็นสายยาว และแบบที่สร้างสปอร์อยู่ในอับสปอร์ (sporangium) (ศิริรัตน์, 2552) เชื้อในกลุ่มนี้เป็นผู้ย่อยสลายที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ เช่น แป้ง (starch) เซลลูโลส (cellulose) เคอราติน (keratin) และ ไคติน (chitin) (Sharma, 2014) แอคติโนมัยซีทเมื่อเจริญบนอาหารแข็งสามารถสร้างเส้นใยเจริญลงไปใต้ผิวหน้าอาหาร (substrate mycelium) โดยเกิดขึ้นในการเจริญระยะแรก ซึ่งโคโลนีมีผิวเรียบ และต่อมาสร้างเส้นใยชูขึ้นมาในอากาศทำให้โคโลนีที่เกิดขึ้นนั้นมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนคล้ายกำมะหยี่ หรือเป็นผงฝุ่นคล้ายแป้ง ลักษณะโคโลนีมีอยู่หลายแบบ เช่น ลักษณะคล้ายไลเคน (lichenoid) คล้ายเนยเหลว (butterous) แบบแผ่กระจาย (discrete) หรือแข็งคล้ายแผ่นหนัง (leathery) ผิวโคโลนีมีลักษณะเรียบหรือขรุขระ สีของโคโลนีนั้นขึ้นอยู่กับสีของสปอร์ที่เกิดขึ้น เช่น ขาว เทา เหลือง ส้ม เขียว แดง ม่วง และน้ำเงิน ส่วนเส้นใยด้านล่างอาหารมักทีสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ แต่อาจพบว่ามีสีเหมือนกับสปอร์ได้ (ลักษมี, 2556)

2.3 การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีท

การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทโดย bergey's manual of systematic bacteriology ซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะองค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ดังนี้ (วัฒนา, 2554)

2.3.1 *Micrococcus, Microbacterium* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

มีรูปร่างเป็นแท่ง มีขนาดเล็กมาก เชื้อนี้มีความทนต่อสภาพอากาศต่างๆได้ดี แต่ไม่ทนต่อแสงแดด เป็นพวก aerobic สามารถใช้ลักษณะของ DAP บนผนังเซลล์ในการจัดจำแนกได้ เชื้อในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 8 สกุล ได้แก่ *Arthobactor, Promicromonospora, Oerskovia, Dermatophilus, Aureobacterium, Curtobacterium, Argomyces* และ *Nocardoides*

2.3.2 *Mycobacterium, Norcadia* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อกลุ่มนี้มี 8 สกุลคือ *Mycobacterium, Norcadia, Gordona, Dielzia, Rhodococcus, Tsukamurella* และ *Turicella* เชื้อกลุ่มนี้มีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อนและลักษณะผนังเซลล์ของ

เชื้อกลุ่มนี้พบ *meso*-A_2pm บน peptidoglycan พบ mycolic acid และ arabigalactan ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มนี้ได้

2.3.3 Family *Pseudonocardiaceae* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

เชื้อกลุ่มนี้มี 6 สกุลคือ *Saccharopolyspora, Actinopolyspora, Amycolatopsis, Kibdelosporangium, Pseudonocardia* และ *Saccharomonospora* เชื้อกลุ่มนี้มี DAP บนผนังเซลล์เป็นแบบ *meso*-A_2pm มีน้ำตาลเซลล์เป็นอะราบิโนสและกาแลคโทส

2.3.4 Family *Micromonosporaceae*

เชื้อกลุ่มนี้มี 3 สกุล คือ *Actinoplanes, Dactylosporangium* และ *Pilimelia* ลักษณะสำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ สามารถสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ โดยสปอร์จะอยู่ภายใน sporangium หรือ spore vesicle ที่พบในเส้นใยอาหาร

2.3.5 Family *Thermomonosporaceae*

เชื้อกลุ่มนี้มี 4 สกุล คือ *Thermomonospora, Actinomadura, Spirillospora* และ *Actinocorallia* ผนังเซลล์ของสกุล *Thermomonospora* พบกรดอะมิโนแบบ *meso*-A_2pm ไม่พบน้ำตาลไซโลส อะราบิโนส และกาแลคโตส เป็นพวกชอบร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 45-55 องศาเซลเซียส

2.3.6 Family *Streptosporangiaceae*

เชื้อกลุ่มนี้มีทั้งหม 6 สกุล คือ *Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora, Herbidispora* และมี *Streptosporangium* เป็นสกุลหลัก ลักษณะที่สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกคือลักษณะการสร้างหรือไม่สร้าง sporangia รวมถึงจำนวนสปอร์ที่พบบน sporophore และ sporangia พบน้ำตาลมาดูโรส เป็นน้ำตาลที่พบได้ในเชื้อสกุล *Actinomadura* โดยเชื้อสกุลนี้ไม่จัดอยู่ใน Family *Streptosporangiaceae* การศึกษาลำดับเบส บริเวณ16S rDNA ร่วมกับการศึกษาองค์ประกอบของไขมัน จะทำให้แยกเชื้อกลุ่มนี้ออกจาก *Actinomadura* ได้

2.3.7 Family *Streptomycetaceae*

เชื้อสกุล *Streptomyces* นั้นถูกจัดอยู่ใน Family *Streptomycetaceae* โดยเชื้อสกุลนี้เป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวในสิ่งแวดล้อม และพบมากที่สุดในดิน เชื้อบางสายพันธ์เป็นเชื้อก่อโรคในคน สัตว์ และพืช สกุลนี้จะพบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางงชีวเคมี ที่หลากหลาย ต่อมาพบเชื้ออีก 6 สกุล ได้แก่ *Kitasaoat, Chainia, Microellobosporia, Elyrosporangium Actinosporangium* และ *Actinopycnidium* ได้ถูกจัดอยู่ในสกุลของ *Streptomyces*

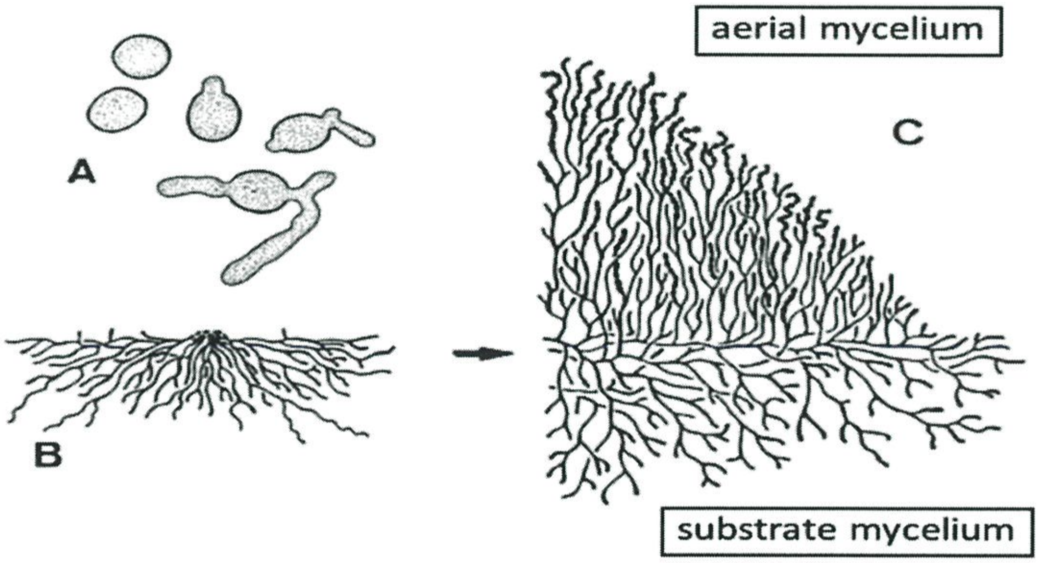
2.3.8 สกุลอื่นๆ

แอคติโนมัยซีทกลุ่มนี้ เป็นกลุ่มที่ยังหาความสัมพันธ์กับแอคติโนมัยซีทกลุ่มอื่นๆไม่ได้ ทำให้ไม่สามารถจัดเข้ากลับกลุ่มอื่นได้ มี 4 สกุล ได้แก่ *Glycomyces, Kibdelosporangium, Kitasatosporia* และ*Saccharothtx* พบว่าทุกสกุลมีการสร้างสปอร์บนสายใยอากาศ ซึ่งสามารถสรุปลักษณะที่สำคัญของแอคติโนมัยซีท (ศิริรัตน์, 2552)

2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท

2.4.1 การสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยซีท (กิ่งจันทร์, 2555)

โคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียเกิดจากการรวมกันของเส้นใยเป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารแข็ง ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยวอับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่หัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

A: อับสปอร์มีการพัฒนาเป็นเส้นใย
B: สายใยอาหารเจริญแทงผ่านลงไปในอาหาร (substrate mycelium)
C: เส้นใยเจริญเหนืออาหารและมีการสร้างสปอร์ (aerial mycelium)
ที่มา: กิ่งจันทร์ (2555)

2.4.2 ลักษณะของโคโลนี

ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ สำหรับการสร้างโคโลนีจะเริ่มจากการลงแอคติโนมัยซีทในอาหารแข็ง โดยอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่หัก หรือบางส่วนของโคโลนีเดิม เกิดการพัฒนาเป็นสายใยอากาศ aerial mycelium และสายใยอาหาร substrate mycelium ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี (นวลรัตน์, 2554) การสร้างเส้นใยถูกจำกัดให้มี aerial mycelium ทำให้โคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียฟูหรือเรียบแบนบางครั้งลักษณะคล้ายหนังสัตว์ มีความหลากหลายตั้งแต่นูน, เหนียว จนถึงแข็ง ผิวหน้าโคโลนีอาจเรียบ, นูน, ขรุขระหรือ เป็นเกล็ด ขนาดโคโลนีขึ้นกับสปีชีส์อายุและสภาวะการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี มีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (ศิริรัตน์, 2552)

ลักษณะโดยทั่วไปของโคโลนีแอคติโนแบคทีเรีย (รัตนาภรณ์, 2548)

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

2. ขนาด (size) โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์มีขนาดตั้งแต่เล็กเท่าปลายเข็ดหมุดจนถึงเส้นผ่านศูนย์กลางความยาวมิลลิเมตร

3. การยกตัวของโคโลนี (elevation) จานพื้นอาหารโคโลนีที่เจริญบนอาหารอาจแบนราบหรือนูน จึงทำให้โคโลนีที่ยกตัวมีหลายแบบ

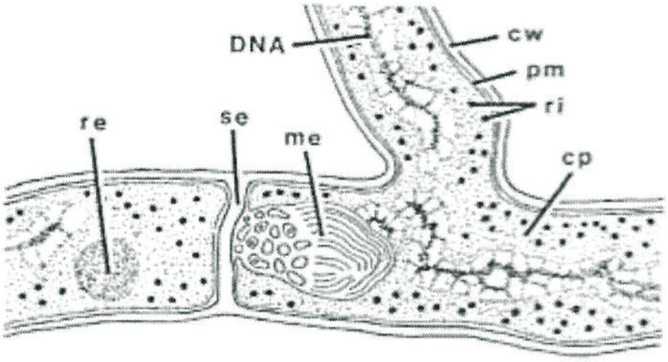
4. ขอบของโคโลนีจุลินทรีย์ (margin) มีตั้งแต่ขอบเรียบหรือไม่เรียบ

รูปที่ 2.2 ตัวอย่างโคโลนีของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดิน

ที่มา: (ชัยสิทธิ์, 2554)

2.4.3 โครงสร้างภายในของโคโลนี

เส้นใยมีความหนาประมาณ 0.4 - 1.2 ไมโครเมตร เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้นและเจริญออกทางด้านปลายสามารถแตกแขนงได้ โครงสร้างหลักในเส้นใยที่แสดงว่าเป็นโปรคาริโอต คือ ในไซโตพลาสซึม ประกอบไปด้วยสายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน (ศิริรัตน์, 2552) เช่น Polyphosphate, Lipid หรือ Polysaccharides เยื่อหุ้มเซลล์ติดกับไซโตพลาสซึมอาจเกิดมีโซโซมซึ่งมักต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์ (รัตนาภรณ์, 2548)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเส้นใยอากาศของแอคติโนมัยซีท

cp : ไซโตพลาสซึม	pm : ชั้นผนังพลาสมา
cw : ผนังเซลล์	me : มีโซโซม
se : ผนังกั้นเซลล์	ri : ไรโบโซม
DNA : บริเวณที่มีสารพันธุกรรม	re : บริเวณแหล่งพลังงาน

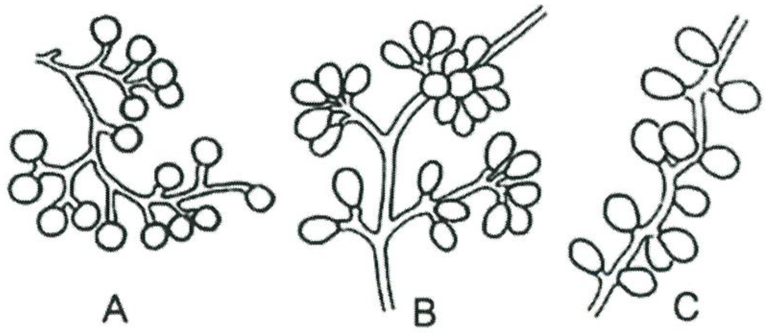
ที่มา : ศิริรัตน์ (2552)

2.5 การสร้างสปอร์ (ศิริรัตน์, 2552)

แอคติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอกดังนี้

2.5.1 การสร้างสปอร์เดี่ยว

การสร้างสปอร์เดี่ยวเรียกว่า Monosporous พบในหลายสกุล ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (Sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหารสปอร์ติดอยู่ที่ฐานหรือพองตัวจากนั้นมีการสร้างผนังกั้นและสร้างเป็นผนังสปอร์ในส่วนของสกุล *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนสายใยอากาศที่ปลายก้านชูสปอร์ ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทาให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์สกุลอื่นๆที่สร้างสปอร์เดี่ยวคือ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนงถ้าใช้ศัพท์ทางราอาจเรียกว่าการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* ว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยที่แตกแขนงมีการโป่งออก ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora*



รูปที่ 2.4 การสร้างสปอร์เดี่ยว

A: *Micromonospora*

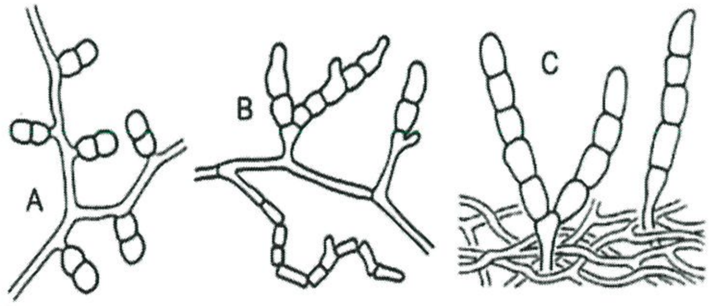
B: *Thermomonospora*

C: *Saccharomonospora*

ที่มา : กิ่งจันทร์ (2555)

2.5.2 การสร้างสปอร์ที่เป็นสาย

ในแอคติโนแบคทีเรียมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก สามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์โดยพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนของสปอร์นั่นคือ di หรือ bisporous, oligosporous หรือ polysporous สาย bisporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรงหรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ นอกจากนี้สกุล *Actinobispora* มีสปอร์แบบ disporous เช่น การสร้างสปอร์เริ่มจากนั้นมีการพองออกและสร้างผนังกั้นตรงกลาง



รูปที่ 2.5 ลักษณะสปอร์ที่เป็นสาย

A: การสร้างแบบ disporous ของ *Microbispora*

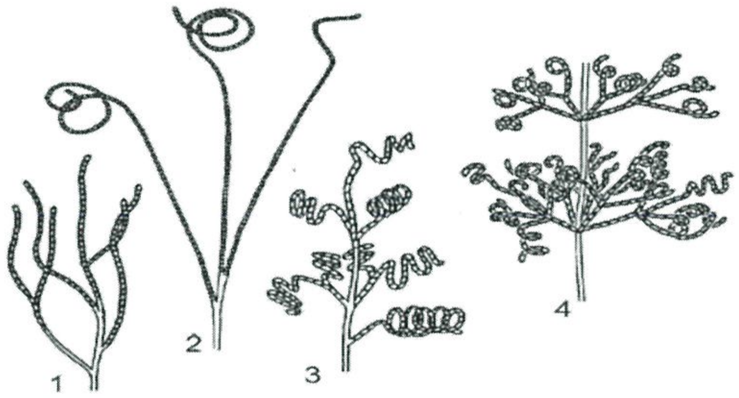
B และ C: การสร้างสปอร์ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ

ที่มา : กิ่งจันทร์ (2555)

แอคติโนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์แบบ polysporous ที่สำคัญ สปีชีส์ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการสร้างสปอร์เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ สปอร์ของ *Streptomyces* และแอคติโนแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มี สปอร์มากกว่ามักเรียกว่า Arthospores ซึ่งสอดคล้องกับ Arthospores ของกลุ่มรา ในกลุ่ม Deuteromycota ที่มีการสร้างสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

1. Rectiflexbiles ลักษณะของสายสปอร์ตรง หรือโค้งงอ
2. Retinaculiaperti สายสปอร์คล้ายขอ เป็นวงเปิดหรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1–3 ชั้น
3. Spira สายสปอร์เป็นเกลียวแยกได้เป็น 2 แบบคือเป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่นและเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาว ยืดไม่ติดกันแน่น
4. Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายก้นหอย และแตกแขนงกันแน่น

ในบางกรณีสายสปอร์เป็นเกลียวขดกันแน่นและแยกออกมาทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์หรือ Pycnidia นอกจากนี้ในวงศ์ *Pseudoncardiaceae* เกิดสายสปอร์บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ อีกสกุลที่มีสปอร์เป็นสายยาว คือ *Nocardiopsis* ซึ่งเกิดขึ้นบนสายใยอากาศ อาจเป็นสายใยตรง,งอ หรือซิกแซก



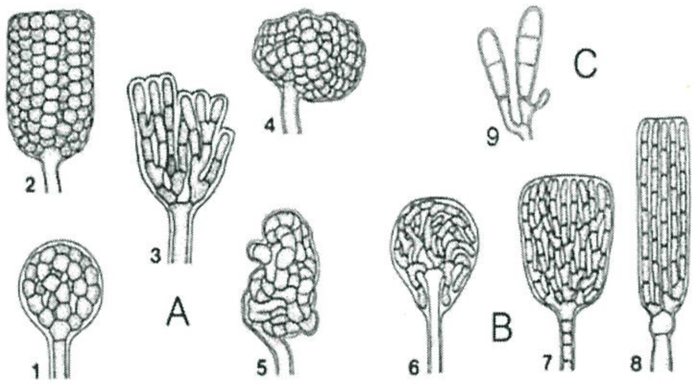
รูปที่ 2.6 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาว

1 : Rectiflexbiles
2 : Retinaculiaperti
3 : Spira
4 : Verticillati
ที่มา : นวลรัตน์ (2554)

2.5.3 การสร้างสปอร์ในอับสปอร์

การสร้างสปอร์ในอับสปอร์มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมายสามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม

2.5.3.1 กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะทรงกลม หรือเกือบกลมจนไปถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 – 15 ไมโคเมตร และอยู่บนสายใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดกันเป็นก้อนอยู่ภายในผนังห่อหุ้ม สปีชีส์ *Ampullariella* ในสกุล *Atinoplans* สร้างอับสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันไป คือ รูปทรงกระบอก ทรงขวด เป็นต้น ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 5 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย อีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์คือ *Pilimelia* อับสปอร์สร้างขึ้นบนผิวของอาหาร มีรูปทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10 – 15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกันหรือวกวนไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้ยังมีอีกสกุล คือ *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจานวนสปอร์แบบ Oliosporous คือมีสปอร์ประมาณ 2 – 5 สปอร์ อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ



รูปที่ 2.7 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร

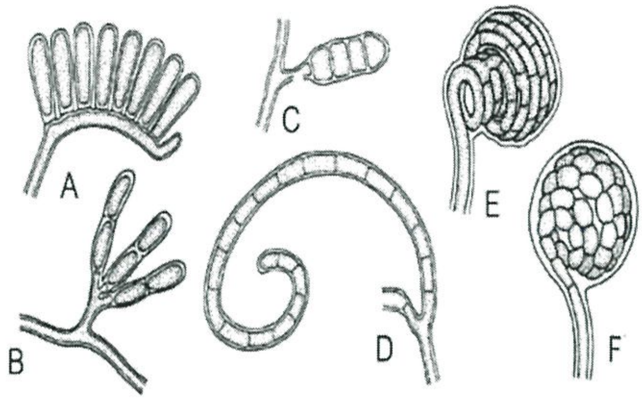
A: สกุล *Actinoplanes* (รวมถึง *Ampullariella*) 1. ทรงกลม, 2. ทรงกระบอก, 3. เป็นพู, 4. กึ่งทรงกลม, 5. ไม่เป็นรูปทรง

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

C: สกุล *Dactylosporangium* 9. รูปทรงกระบอก

ที่มา : กิ่งจันทร์ (2555)

2.5.3.2 กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในทรงกระบอกมีเพียง 1 สปอร์ สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ในอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ ต่อกันเป็นหนึ่งแถว สกุล *Planoplyspora* มีสปอร์จานวนมากภายในสปอร์อับสปอร์ เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบบยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จานวนมหาศาลต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ภายในสกุล*Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกั้นเป็นสปอร์เดี่ยวๆ ต่อกันเป็นเส้นใยยาวขดเป็นวงอยู่ในภายในอับสปอร์ ในปัจจุบัน สกุล *Kutzneria* ได้ถูกแยกออกจากสกุล *Streptosporangium* มีอับสปอร์ลูกกลมขนดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 48 ไมโครเมตร และมีผนังอับสปอร์บาง อยู่บนก้านชูสปอร์ สกุล *Spirllospora* มีอับสปอร์เรียงตัวเป็นสายแตกแขนง หรือเป็นวงสปอร์เป็นรูปแท่งและโค้งง

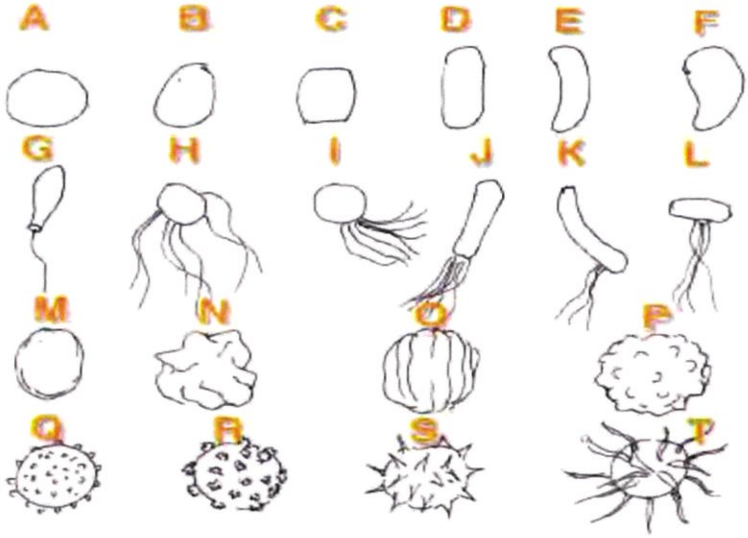


รูปที่ 2.8 รูปทรงของอับสปอร์บนสายใยอากาศ

A : *Planomospora* : monosporous, รูปกระบอง
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
ที่มา : กิ่งจันทร์ (2555)

2.6 รูปร่างลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยซีท

นอกจากการเจริญของเส้นใยแล้วการสร้างสปอร์ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญทางสัณฐานวิทยาที่ทำให้สามารถจำลักษณะของแอคติโนมัยซีทได้ มีการแตกหักของเส้นใยไปเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ รูปร่างกลมบ้างเป็นแท่งบ้าง และในที่สุดก็มีการเจริญไปเป็นเส้นใยอันใหม่ นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่แน่ชัดทำให้ทราบว่า หน้าที่ของสปอร์ที่แท้จริงกับสปอร์ที่เกิดจากการแตกหักของเส้นใยนี้เหมือนกัน และในบางสกุลก็ยากที่จะแยกความแตกต่างของสปอร์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ดังนั้นด้วยเหตุผลนี้ขบวนการสร้างสปอร์จึงมีความหมาย รวมไปถึงการแตกหักของเส้นใยเป็นท่อนๆด้วย ซึ่งสามารถเห็นได้จากแอคติโนมัยซีทในสกุล *Nocardia, Nocardiopsis, Oerskovia, Promicromonospora* และ *Intraspongium* สปอร์อาจเกิดขึ้นเดี่ยวๆหรือเกิดเป็นเส้นสายสั้นๆ และโดยทั่วไปแล้วก็มีความหนามากกว่าเส้นใย แต่ในบางชนิดที่มีการสร้างสปอร์เป็นเส้นสายยาวๆมักจะมีขนาดเท่าๆกับขนาดของเส้นใย ความหนาของสปอร์จึงมีประมาณ 1-2 μm และมีรูปร่างหรือผิวสปอร์ที่แตกต่างกันออกไป (ชัฏฎากาญน์, 2557)



รูปที่ 2.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์

รูปร่างทั่วไป A : globose, B : ovoid, C : doliform, D : rod-shape, E : allantoid, F : reniform

แฟลกเจลลา G : monopolar monotrichous, H : peritrichous, I : polytrichous, J : monopolar polytrichous, lophotrichous, K : subpolarpolytrichous, L : lateral polytrichous,

พื้นผิว M : smooth, N : irregular rugose, O : parallel rugose, P : warty, Q : tuberculate, R : verrucose, S : spiny, T : hairy

ที่มา: (วิพัฒน์ และเอกภพ, 2549)

2.7 ก้านชูสปอร์และก้านชูอับสปอร์ (Sporophores และ Sporangiophores)

สปอร์เดี่ยวๆและสปอร์ที่อยู่เป็นเส้นสายจะเจริญอยู่บนก้านชู ซึ่งเป็นเส้นใย (fertilehyphae) ที่ไม่แตกแขนงหรือมีแขนงและมีการสร้างสปอร์ หรือรองรับสปอร์ไว้ และอาจเกิดขึ้นได้ทั้งที่เส้นใยเหนือผิวอาหารหรือเส้นใยใต้ผิวอาหาร ก้านชูสปอร์อาจสร้างรวมตัวกันคล้ายเส้นใยซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นก้านหลักๆหนึ่งหรือสองก้านพร้อมกับทำหน้าที่รองรับไปด้วย ต่อจากนั้นจะเจริญไปเป็นส่วนที่จะสร้างเป็นสปอร์ สปอร์อาจถูกสร้างขึ้นที่ด้านข้างหรือส่วนปลายของก้านชูที่เป็นแบบเดี่ยวๆ หรือแบบแตกแขนงที่มีลักษณะซับซ้อนเช่นพบใน *Streptoverticillium* ซึ่งก้านชูสปอร์จะประกอบด้วยก้านหลักที่มีแขนงด้านข้างโดยเรียงตัวโดยรอบแกน (verticils) เป็นช่วงๆ และมีระยะความยาวที่แน่นอน แต่ละแขนงจะมีเส้นสายสปอร์จัดเรียงตัวแบบ umbel ลักษณะการเรียงตัวชนิดนี้เรียกว่า umbellate monoverticillate แต่ถ้ามีการเรียงตัวแบบ vertical 2 ชั้นจะเรียกก้านชูสปอร์แบบนี้ว่า biverticillate (ชัฏฎากาญน์, 2557)

ก้านชูสปอร์ (sporophore) มักจะมีความหมายเฉพาะโครงสร้างที่มีการสร้างสปอร์คล้ายกับเป็นโครงสร้างที่ช่วยรองรับสปอร์ และในบางกรณีอาจเป็นเส้นใยที่จะเจริญไปเป็นสปอร์

(sporogenous hyphae) ซึ่งจะเป็นเสนใยที่จะเจริญไปเป็นสปอร์ได้โดยตรงเท่านั้นส่วนก้านชูอับสปอร์(sporangiophore) อาจให้นิยามว่าเป็นเส้นใยที่สร้างหรือรองรับอับสปอร์ มักจะพบที่ส่วนปลายเส้นใย อาจไม่มีการแตกแขนงหรือแตกกิ่งก้าน และบางครั้งอาจมีลักษณะที่สอดคล้องกับอับสปอร์ซึ่งแตกแขนงคล้ายใบปาล์ม เช่น *Planomospora venezuelensis* ก้านชูสปอร์มักเกิดอยู่บนเส้นใยเหนือผิวอาหาร และมีขนาดไม่แตกต่างจากเส้นใยที่ไม่สร้างอับสปอร์ (nonfertile aerialhypha) มากนัก ขณะที่ก้านชูอับสปอร์ที่เกิดจากเส้นใยใต้ผิวอาหารโดยตรง อาจจะมีขนาดหนากว่า vegetative hypha ถึง 2-3 เท่า ถ้ามีการเรียงตัวขนานกันไปในแนวตั้ง จะเรียกว่า palisade hyphae ซึ่งพบได้ใน *Actinoplanes* (วิพัฒน์ และเอกภพ, 2549)

2.8 โครงสร้างที่สำคัญในการจัดจำแนกระดับสกุล (ศรีสกุล, 2553)

2.8.1 เส้นใย (mycelium) มีหลายลักษณะถ้ามีการแตกหักได้ควรสังเกตรูปร่างของชิ้นส่วนที่แตกหักหรือดูว่าสามารถเคลื่อนที่ได้หรือไม่ได้ สังเกตการณ์แตกแขนงของเส้นใยว่ามีลักษณะแบบใด มีทั้งเส้นใยเหนือผิวอาหารและเส้นใยใต้ผิวอาหารหรือไม่ หรือมีเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหารซึ่งพบบ่อย หรือมีเฉพาะเส้นใยเหนือผิวอาหาร เช่น *Sporichthya* ที่เส้นใยของแอคติโนมัยซีทอาจมีการสร้างถุงเล็กๆระหว่างปล้องของเส้นใย (intercalary vesicles) ที่ไม่สร้างสปอร์ภายใน เช่น *Intrasporangium* หรือมีสปอร์อยู่ภายใน เช่น *Frankia* นอกจากนี้สังเกตลักษณะของสปอร์และการติดของสปอร์ที่เส้นใยอยู่เหนือผิวอาหาร รวมทั้งอยู่ใต้ผิวอาหาร

2.8.2 โคนิเดีย (conidia) เป็นสปอร์ที่สร้างแบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) ที่ไม่ใช่คลาไมโดสปอร์ที่อยู่ระหว่างปล้องของเส้นใย (intercalary chlamydospores) หรือสปอร์ที่อยู่ภายในอับสปอร์ (sporanggiospores) แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างโคนิเดียได้หลายแบบคือ

2.8.2.1 โคนิเดียเดี่ยวๆพบในหลายๆสกุล เช่น *Thermoactinomyces* สามารถทนต่อความร้อนได้สูง ส่วนโคนิเดียที่ไม่ทนความร้อน พบใน *Saccharomonospora, Promicromonospora, Micromonospora* และ *Thermomonospora* นอกจากนี้พวก *Fankai, Dactylosporangium* และ *Intrasporangium* อาจมีการสร้างเวสิเคิลที่ปลายเส้นใย ซึ่งอาจทำให้สับสนกับสปอร์ได้

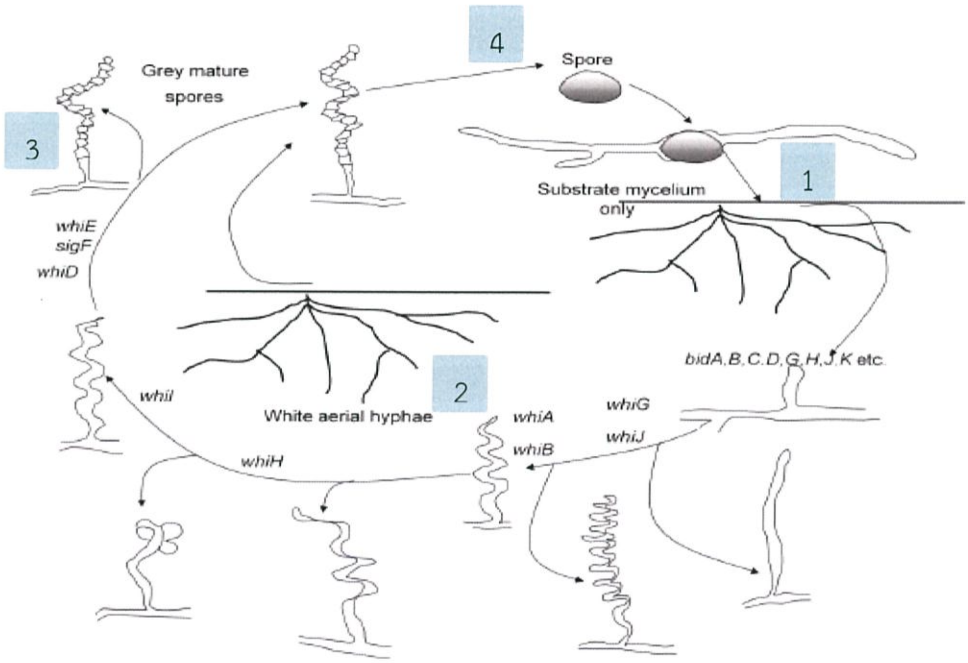
2.8.2.2 โคนิเดียคู่ เป็นโคนิเดียที่ติดกันเป็นคู่ตามความยาวเส้นใยเหนือผิวอาหาร เช่น *Microbispora* แต่ *Faenia* spp. บางชนิดสามารถสร้างโคนิเดียเป็นคู่ทั้งเส้นใยที่อยู่เหนือ และที่อยู่ใต้อาหาร

2.8.2.3 โคนิเดียต่อกันเป็นสายโซ่สั้นๆ (short chain) พบในหลายสกุล เช่น *Nocardai, Pseudonocardia, Sporichthya, Actinomadura* และ *Glycomyces*

2.8.3.4 โคนิเดียต่อกันเป็นสายโซ่ยาว พบในหลายสกุล เช่น Nocardioides, Pseudonocardia, Actinopolyspora, Acinosynnema, *Glycomyces, Streptoalloteichus, Kitasatosporia*

2.9 วัฏจักรของแอคติโนมัยซีท

เริ่มจากสปอร์อิสระปลิวตกลงบริเวณที่เหมาะสมกับการเจริญ ขั้นที่ 1 สปอร์ที่ตกมีการงอกและการสร้างเส้นใย substrate mycelium เจริญลงด้านล่างจนมีความหนาแน่นของเส้นใย ขั้นที่ 2 เมื่อเส้นใยมีความหนาแน่นมากจะมีการเจริญของเส้นใยขึ้นมาด้านบนเหนือบริเวณที่เจริญเรียกว่า aerial mycelium ขั้นที่ 3 เมื่อมีการเจริญหนาแน่นมีการเปลี่ยนแปลงเป็น aerial spore เกิดการขดงอเป็นรูปร่างต่างๆ เส้นใยบนผิวอาหารเปลี่ยนเป็นสายสปอร์จำนวนมาก โคโลนีถูกปกคลุมไปด้วยเส้นใยซึ่งมีสีที่แตกต่างกันไป ขั้นที่ 4 เมื่อสปอร์ตกไปในสภาวะที่เหมาะสมจะงอกเป็นเส้นใยแล้วเริ่มวงชีวิตใหม่ (ชัฏฎากาญน์, 2557)



รูปที่ 2.10 วัฏจักรของแอคติโนมัยซีท
ที่มา : Klanbut (2013)

2.10 สารอาหารและพลังงานของแอคติโนมัยซีท (สุขสันติ, 2557)

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ในธรรมชาติจะมีการปล่อยเอนไซม์หลายชนิดออกมาย่อยภายนอกเซลล์แล้วลำเลียงเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีการแพร่ (Diffusion) หรืออาจลำเลียงด้วยวิธีแอคทีฟทรานสปอร์ต (Active transport) ซึ่งต้องใช้พลังงาน กลไกการลำเลียงของแบคทีเรียจะมีเอนไซม์เพอร์มีเอส (Permease) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ช่วยในการลำเลียงเข้าสู่เซลล์ ทั้งนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะไม่สามารถย่อยสลายสารอาหารทุกชนิดหรือนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมด ดังนั้นในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาจะต้องมีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถใช้งานได้ ความต้องการทางโภชนาการของจุลินทรีย์ในการดำรงชีวิตมีความจำเป็นในด้านต่างๆ เพื่อการเจริญ เมแทบอลิซึม และการเพิ่มจำนวน เช่น แหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อิเล็กตรอนที่จำเป็น เป็นต้น (นงลักษณ์ และปรีชา, 2541)

2.10.1 แหล่งพลังงาน กิจกรรมหรือปฏิกิริยาทางเคมีภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีความจำเป็นต้องใช้พลังงาน เช่น การเคลื่อนที่ การแบ่งเซลล์ กระบวนการเมแทบอลีซึม เป็นต้น โดยแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์อาจเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า Chemotrophs หรือ บางกลุ่มได้พลังงานจากแสงสว่าง เรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่า Phototrophs เช่น แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้และมีซัลเฟอร์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายทำให้เกิดเป็นกรดกำมะถัน เป็นต้น

2.10.2 แหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ต้องการคาร์บอนเป็นธาตุอาหารหลักเนื่องจากคาร์บอนเป็นส่วนประกอบของสารชีวโมเลกุลหลายชนิดในเซลล์โดยทั่วไปจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเรียกกลุ่มนี้ว่า Autotrophs ส่วนจุลินทรีย์กลุ่มที่ได้รับคาร์บอนจากสารอาหาร เช่น กรดอะมิโน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือ สารอินทรียอื่นๆจะเรียกกลุ่มนี้ว่า Heterotrophs

2.10.3 แหล่งอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนมีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเนื่องจากต้องถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาต่างๆในกระบวนการเมแทบอลิซึม จุลินทรีย์มีทั้งชนิดที่ได้อิเล็กตรอนจากสารอินทรีย์ (Lithotrophs) และได้อิเล็กตรอนจากสารอนินทรีย์ (Organotrophs) นอกจากนี้อาจเกิดการแตกตัวของอิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี (Chemolithotrophs และ Chemoorganotrophs ตามลำดับ) หรือการแตกตัวของอิเล็กตรอนจากพลังงานแสงก็ได้ (Photolithotrophs และ Photoorganotrophs ตามลำดับ)

2.10.4 แหล่งไนโตรเจน ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ เช่น ดีเอ็นเอ กรดอะมิโน จุลินทรีย์สามารถนำไนโตรเจนมาใช้ประโยชน์ได้ในหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์เช่น การได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ ไนเตรท ไนไตรท์ หรือการได้รับโดยไนโตรเจนจากอากาศ เป็นต้น

2.10.5 แหล่งธาตุอื่นๆ ซึ่งได้แก่ ออกซิเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส เป็นต้น ธาตุต่างๆเหล่านี้มีความจำเป็นต่อกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ซึ่งขาดไม่ได้ ออกซิเจนเกี่ยวข้องกับการหายใจระดับเซลล์เพื่อสร้างพลังงานใน จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโนบางชนิดเช่น ซีสเทอีน ซีสตีน แบคทีเรียบางชนิดสร้างพลังงานจากการที่ซัลเฟอร์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในปฏิกิริยาการหายใจระดับเซลล์ในขณะที่ฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบของหมู่ฟอสเฟตในดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการแบ่งเซลล์

2.10.6 ไอออนของโลหะหนัก การทำงานของเอนไซม์ในเซลล์นอกจากจะเข้าจับกับซับสเตรตได้โดยตรงแล้ว ยังมีเอนไซม์บางชนิดที่ต้องอาศัยไอออนของโลหะในการช่วยเร่งปฏิกิริยา หรือที่เรียกว่า โคแฟคเตอร์(Cofactor) ไอออนของโลหะเหล่านี้ได้แก่ Mg^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, K^{+} , CU^{2+} และ MO^{6+} เป็นต้น

2.10.7 วิตามินหรืออนุพันธ์ของวิตามิน การทำงานของเอนไซม์นอกจากจะมีไอออนของโลหะแล้ว วิตามินหลายชนิดยังมีบทบาทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีในเซลล์ซึ่งเรียกว่า โคเอนไซม์ (Coenzymes) วิตามินมีส่วนสำคัญต่อจุลินทรีย์หลายชนิดหากขาดวิตามินในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจทำให้จุลินทรีย์ไม่เจริญ หรือเพิ่มจำนวนช้ากว่าปกติ

2.11 การพิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยซีท (นวลรัตน์, 2554)

2.11.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ

เป็นการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยพิจารณาจากการสังเกตสีและลักษณะสายใยอาหาร สายใยอากาศ รูปทรงสปอร์ และพื้นผิวสปอร์

2.11.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและการทดสอบชีวเคมี

เป็นการศึกษาความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ความสามารถในการเจริญที่ความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิต่างๆ ความสามารถในการสร้างรงควัตถุเมลานิน ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆ ความสามารถในการย่อยสลายสารต่างๆ ได้แก่ แป้ง, เคซีน และ เจลาติน เป็นต้น ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรท, ความสามารถในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น ไคติน, ไลเปส และ โปรติเอส เป็นต้น

2.12 การผลิตฤทธิ์ต้านทานทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท

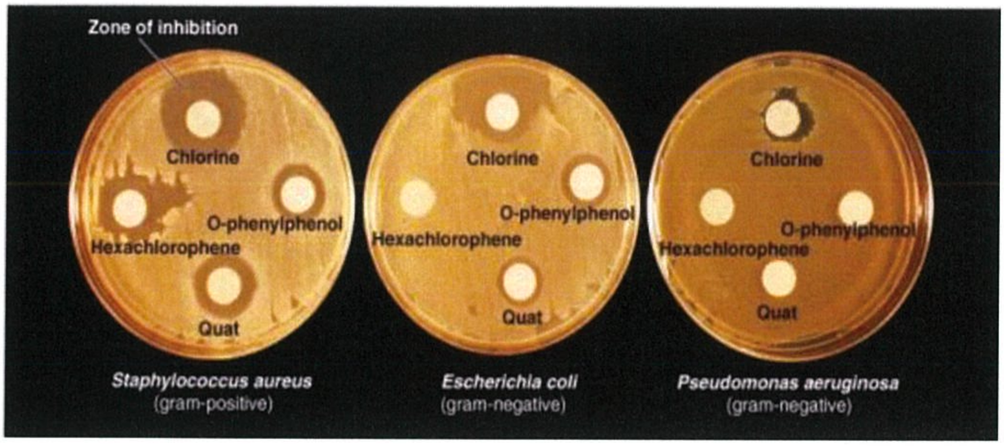
เชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่น่าสนใจ เพราะเชื้อในกลุ่มนี้สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะโดยคาดกันว่า จากสารออกฤทธิ์ชีวภาพ 22,500 ชนิด ที่สร้างโดยเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 10,100 ชนิด สร้างโดยเชื้อใน order Actinomycetales โดยมีการคาดการณ์ว่า 7,630 ชนิด สร้างโดยเชื้อใน Genus Streptomyces ซึ่งสารส่วนใหญ่จะเป็นยาปฏิชีวนะซึ่งในความเป็นจริงอาจมีสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สร้างโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ที่ยังไม่ถูกค้นพบอีกมาก มียาปฏิชีวนะมากกว่า 60 ชนิด ที่ผลิตโดยเชื้อในกลุ่ม Streptomyces ที่สามารถนำมาผลิตและประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่มีขายในท้องตลาด ทั้งยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียและรา หลายชนิดที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย และเป็นยาที่ผลิตจากเชื้อใน genus Streptomyces ได้แก่ streptomycin, spectinomycin, neomycin, tetracycline, chlorotetracycline, erythromycin, clindamycin, nystatin, amphotericin B และ chloramphenicol เป็นต้น (วัฒนาลัย, 2553)

การคัดแยกแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการควบคุมจุลินทรีย์ (นุกูล และ ชัยสิทธิ์, 2554)

2.13 การใช้ยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะเป็นสารที่แยกได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์จะสร้าง ขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่อาหารใกล้หมด เพื่อใช้ป้องกันตนเองและทำลายเซลล์ข้างเคียง นักวิทยาศาสตร์ได้สกัดแยกยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดและเป็นประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมาก ยาปฏิชีวนะที่ดีควรมีคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น สามารถยับยั้งเชื้อได้ในวงกว้างโดยทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ ไม่ทำลายเชื้อประจำถิ่น (Normal flora) ที่อยู่ตามร่างกาย ไม่ทำให้เชื้อดื้อยา สามารถละลายได้ดีในเลือดและของเหลวในร่างกาย และไม่ถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร เป็นต้น การทดสอบประสิทธิภาพของยาหรือสารที่สกัดได้ จะใช้วิธีการกระจายเชื้อ (Spread plate) แล้วใช้ดิสก์ยา หรือกระดาษกรองปราศจากเชื้อจุ่มในสารสกัด วางบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มแล้วสังเกตโซนยับยั้ง

เชื้อ (สุขสันติ, 2557) ดังรูปที่ 2.11 ตัวอย่างยาปฏิชีวนะและกลไกการทำลายเชื้อดังแสดงในตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.11 โซนยับยั้งเชื้อที่มีสารสกัดยาปฏิชีวนะ
ที่มา : สุขสันติ (2557)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างโดยแอคติโนมัยซีท (วสุ, 2557)

Antibiotic class	Example drug	Producing actinomycete
Glycopeptides	Vancomycin	Amycolatopsis orientalis
Aminoglycosides	Streptomycin	Streptomyces griseus
Macrolides	Erythromycin	Saccharomyces erythraea
Tetracyclin	Chlortetracyclin	Streptomyces aureofaciens
Chloramphenicol	Chloramphenicol	Streptomyces venezuelae
Lipopeptide	Daptomycin	Streptomyces roseosporus
Rifamycins	Rifampin	Amycolatopsis mediterranei
Polyenes	Nystatin	Streptomyces noursei

จำนวนสารปฏิชีวนะที่มีอยู่ในปัจจุบันประมาณกว่า 8000 ชนิดนั้น พบว่า 57% เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นจากแอคติโนมัยซีท, 30% เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นจากเชื้อรา และอีก 13% สร้างมาจากแบคทีเรียและสารปฏิชีวนะที่สร้างนั้นส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทใน Family *Streptomyceteaceae* รองลงมาได้แก่ *Micromonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Nocardiaceae* และ *Streptosporangiaceae* ตามลำดับ (วสุ, 2557)

2.14 ประโยชน์ของแอคติโนมัยซีท และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) มีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อราและแบคทีเรีย เจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศพอเพียง เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 65-75 องศาเซลเซียส (กิ่งจันทร์,2555)

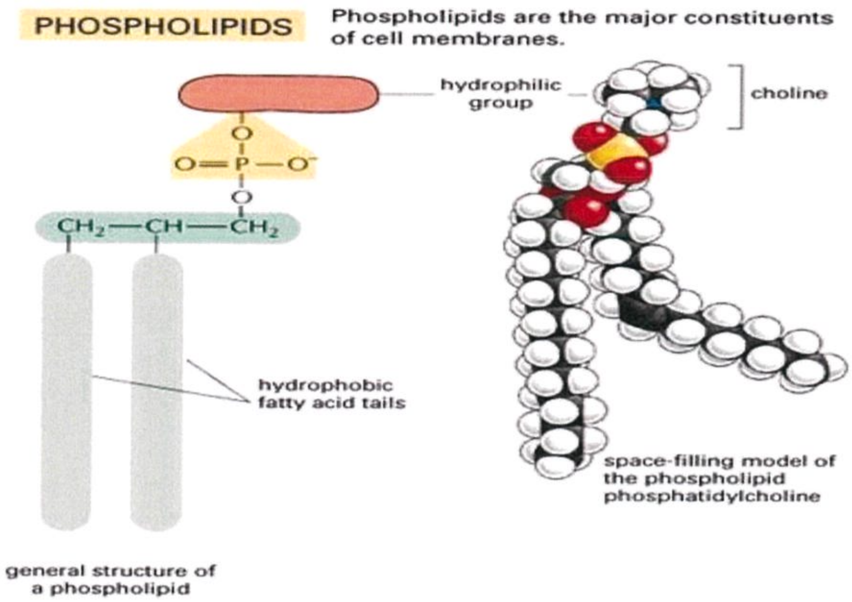
แอคติโนมัยซีทบางชนิด เช่น *Streptomycetes rubiginosus, streptomycetes bambergensis* และ *Streptomycetes violaceoniger* สามารถผลิต เอนไซม์ที่สามารถช่วยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นน้ำตาลฟรุกโทสได้ ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์แอคติโนมัยซีท ช่วยผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เช่น การใช้แอคติโนมัยซีท ชนิด *Thermomonospora* ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และ เอนไซม์ไซแลนที่ทำงานที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเอนไซม์นี้มีประโยชน์ในการผลิตน้ำตาลไซโลสจากซังข้าวโพด (เสานิตย์ และคณะ,2559)

ประโยชน์ของแอคติโนมัยซีทที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ สารสี หรือสารอื่นๆ ได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีท (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล Streptomyces ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด (Sharma, 2014) และสามารถผลิตวิตามินได้หลายชนิด เช่น *Streptomyces olivaceus* ผลิตวิตามิน B12 รายงานว่าแอคติโนแบคทีเรียที่คัด แยกได้จากดินบริเวณรอบราก ราก และดินอิสระสามารถผลิตกลุ่มของวิตามินบีได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไทอะมีน ไรโบฟลาวิน ฟลาโวโปรตีน วิตามินบี 12 และโคเอนไซม์เอ (บุษบา, 2010)

ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์แอคติโนมัยซีทช่วยผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์ย่อยสลายสารพิษอะลิฟาติก-อะโรมาติก โคโพลีเอสเตอร์ส (Aliphatic-Aromotic Copolyesters และ 1,4 -ไดออกเซน (1,4-Dioxane) ทางการเกษตรมีการใช้แอคติโนมัยซีทในการผลิตสารฆ่าแมลง สารฆ่าวัชพืช และสารกดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ในด้านทางการแพทย์ และเภสัชกรรมก็ใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยซีท เช่น ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส (Meena *et al*., 2013)

2.15 ฟอสโฟลิปิด

ฟอสโฟลิปิดทำหน้าที่หลักเป็นโครงสร้างของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต มีส่วนของกรดไขมันที่มีลักษณะคล้าย หางสองหางมีคุณสมบัติแบบไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) คือ ไม่รวมตัวกับน้ำ และส่วนที่มีหมู่ฟอสเฟตมี ลักษณะเป็นกลุ่มก้อน มีคุณสมบัติแบบไฮโดรฟิลลิก (hydrophilic) ชอบอยู่กับน้ำเราเรียกคุณสมบัติของโมเลกุลที่มีลักษณะแบบนี้ว่า แอมฟิพาธิก (amphipathic) จากคุณสมบัติดังกล่าว หากเรานำฟอสโฟลิปิด ใส่ลงในน้ำ โมเลกุลของฟอสโฟลิปิดจะเรียงตัวกันเป็นสองชั้น โดยหันส่วนหางที่ไม่รวมตัวกับน้ำเข้าหากัน และหันส่วนหัวที่ชอบน้ำ เข้าหาส่วนที่เป็นน้ำทั้งสองด้านเราเรียกโครงสร้างลักษณะนี้ว่า ลิปิด ไบเลเยอร์ (lipid bilayer) ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของเยื่อหุ้มเซลล์อันเกิดจากการเรียงตัวของโมเลกุลฟอสโฟลิปิด (พงชัย, 2555)



รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดประกอบด้วยส่วนของกรดไขมันที่ไม่มีขั้ว และส่วนของหมู่ฟอสเฟตซึ่งต่ออยู่กับหมู่เคมีที่มีขั้ว

ที่มา : ปิยวรรณ (มปป)

2.16 โครมาโทกราฟี แบบชั้นบาง (thin layer chromatography) (ชัฎฎากาญน์, 2557)

เป็นโครมาโทกราฟีแบบระนาบ (plane chromatography) โดยทำเฟสอยู่กับที่ให้มีลักษณะเป็นครีมข้น แล้วเคลือบบนแผ่นกระจกให้ความหนาของการเคลือบเท่ากันตลอดแล้วนำไปอบให้แห้ง หยดสารละลายของสารผสมที่ต้องการแยกบนแผ่นที่เคลือบเฟสอยู่กับที่นี่ไว้แล้วนำไปจุ่มในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ไว้ โดยให้ระดับของตัวทำละลายต้องอยู่ต่ำกว่าระดับของจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะซึมไปตามเฟสอยู่กับที่ด้วยการซึมตามรูเล็กเหมือนกับน้ำที่ซึมไปในกระดาษหรือผ้า เมื่อซึมถึงจุดที่หยดสารผสมไว้ ตัวทำละลายจะชะเอาองค์ประกอบในสารผสมนั้นไปด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพมีขั้ว ของสารที่เป็นองค์ประกอบกับสารที่เป็นตัวทำละลาย ถ้าตัวทำละลายเป็นโมเลกุลมีขั้วจะชะเอาสารในสารผสมที่เป็นสารมีขั้วไปด้วยได้เร็ว ส่วนสารที่ไม่มีขั้วในสารผสมจะถูกชะพาไปได้ช้า สารผสมก็จะแยกออกจากกัน

2.16.1 หลักการของโครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟีอาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ โดยสารที่ต้องการนำมาแยกโดยวิธีนี้จะมีสมบัติการละลายในตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน และตัวถูกดูดซับจะดูดซับได้ไม่เท่ากัน ทำให้สารเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน

2.16.2 วิธีการทำโครมาโทกราฟี

นำสารที่ต้องการแยกมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วให้เคลื่อนที่ไปบนตัวดูดซับ การเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารแต่ละชนิดในตัวทำละลาย และความสามารถในการดูดซับที่มีต่อสารนั้น กล่าวคือสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดี และถูกดูดซับน้อยจะถูกเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง ถ้าใช้ตัวดูดซับมากๆจะสามารถแยกสารออกจากกันได้

2.16.3 ค่า Rf

โครมาโทกราฟีแบบกระดาษสามารถนำมาคำนวณหาค่า Rf ได้ ค่า Rf (Rate of flow) เป็นค่าเฉพาะตัวของสาร ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายและตัวดูดซับ ดังนั้นการบอกค่า Rf ของสารแต่ละชนิดจึงต้องบอกชนิดของตัวทำละลาย และตัวดูดซับเสมอค่า Rf สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคมีคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

สารต่างชนิดกันจะมีค่า Rf แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นเราจึงสามารถใช้ค่า Rf มาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของสารได้ กล่าวคือ ถ้าสารใดมีความสามารถในการละลายสูงจะมีค่า Rf มาก เนื่องจากตัวทำละลายจะเคลื่อนที่เร็วกว่าสารที่จะแยก ค่า $Rf < 1$ เสมอ ถ้าใช้ตัวทำละลายและตัวดูดซับชนิดเดียวกันปรากฏว่ามีค่า Rf เท่ากัน อาจสันนิษฐานได้ว่า สารดังกล่าวเป็นสารชนิดเดียวกัน หรือนำสารตัวอย่างมาทำโครมาโทกราฟีคู่กับสารจริงก็ได้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

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

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
3.2.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์
3.2.3 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย
3.2.4 ปากคีบ
3.2.5 ห่วงเขี่ยเชื้อ
3.2.6 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม
3.2.7 ไม้พันสำลี
3.2.8 ทิป
3.2.9 กระดาษกรองวอทแมน เบอร์1
3.2.10 แผ่นทดสอบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
3.2.11 แผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง
3.2.12 ช้อนตักสาร
3.2.13 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
3.2.14 cork borer
3.2.15 สำลี
3.2.16 Centrifuge tube
3.2.17 Microcentrifuge tube
3.2.18 ช้อนสแตนเลส
3.2.19 Auto pipette ขนาด 50 ไมโครลิตร , 200 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร
3.2.20 Forcep
3.2.21 ขวดปรับปริมาตร
3.2.22 ปิเปต
3.2.23 มีดผ่าตัด
3.2.24 ขวดรูปชมพู่
3.2.25 กระดาษกรอง Whatman No.1
3.2.26 ลูกยาง
3.2.27 Appendroph
3.2.28 บีกเกอร์
3.2.29 หลอดทดลองและฝาปิด
3.2.30 ขวดดูแรน
3.2.31 กระดาษทิชชู
3.2.32 แท่งแก้วรูปตัวแอล
3.2.33 หลอดหยดสาร
3.2.34 กรวยแยก
3.2.35 ขวดปรับปริมาตร
3.2.36 Spray gun

3.2.37 TLC tank
3.2.38 ขวด vial
3.2.39 เวอร์เนียคาลิปเปอร์
3.2.40 TLC Silica gel

3.3 สารเคมี

3.3.1	สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	บริษัท Scharlau
3.3.2	สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	บริษัท Himedia
3.3.3	น้ำตาลกลูโคส (Glucose) MW 180.1559 g/mol	บริษัท Fluka
3.3.4	น้ำตาลไซโลส (Xylose) MW 150.13 g/mol	บริษัท Fluka
3.3.5	น้ำตาลแลกโตส (Lactose) MW 342.30 g/mol	บริษัท Fluka
3.3.6	น้ำตาลซูโครส (Sucrose) MW 342.30 g/mol	บริษัท Fluka
3.3.5	คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) = 119.38 g/mol	บริษัท BHD
3.3.6	วุ้น (Agar)	บริษัท Bio Agar
3.3.7	เปปโตน (Peptone)	บริษัท Srichem
3.3.8	แป้งที่ละลายน้ำได้ (Soluble starch)	บริษัท Srichem
3.3.9	โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) MW =101.11 g/mol	บริษัท Fluka
3.3.10	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) MW 58.44 g/mol	บริษัท Univar
3.3.11	เคซีน (Casein)	บริษัท Fluka
3.3.12	แมกนีเซียมซัลเฟต	บริษัท Fluka
3.3.13	แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) MW 100.0869 g/mol	บริษัท Carlo erba
3.3.14	เจลาติน (Gelatin)	บริษัท Ajex Finechem
3.3.15	เคซีนเอนไซมาติกไฮโดรไลเซท	บริษัท Himedia
3.3.16	skim milk	บริษัท Himedia
3.3.17	เกลือทะเล (Reef salt)	บริษัท Aquaraise
3.3.18	Ammonium molybdate tetrahydrate MW = 1235.9975 g/mol	บริษัท Sigma-Aldich
3.3.19	Ethyl acetate ($C_4H_8O_2$) MW = 88.1051 g/mol	บริษัท SK Chemical
3.3.20	Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) MW = 174.1759 g/mol	บริษัท Carlo erba
3.3.21	Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) MW = 132.1395 g/mol	บริษัท Carlo erba
3.3.22	Kanamycin ความเข้มข้น 1.5 μg/ml	

3.3.22 Manganese (II) Choride Tetrahydrate บริษัท ajax finechem

($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) MW = 521.3915 g/mol

3.3.23 Zinc Sulfate Heptahydrate บริษัท Fluka

($ZnSo_4 \cdot 7H_2O$) MW= 287.5496 g/mol

3.3.24 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1M

3.3.25 Phenol (C2H5OH) MW = 94.1112 g/mol

3.3.26 เมทานอล MW = 32.0419 g/mol

3.3.27 กรดอะซิติก MW = 60.0520 g/mol

3.3.28 สารละลายเมทิลีนบลู

3.3.29 กรดซัลฟาลินิก

3.3.30 สารละลาย N,N-Dimethyl-l-naphthylamine

3.3.31 แมนนิทอล

3.3.32 น้ำกลั่น

3.3.33 Molybdenum Blue spray reagent

3.3.34 Nystatin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3.35 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็น และ 70 เปอร์เซ็น

3.3.36 สารละลายมาตรฐาน แมกฟาแลนนัมเบอร์ 5

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 Starch - Casein agar (SCA)

3.4.2 Yeast extract – Malt extract agar (YEME agar)

3.4.3 Yeast extract – Malt extract broth (YEME broth)

3.4.4 International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

3.4.5 Inorganic salts starch agar no.4 (ISP4)

3.4.6 Bouillon gelatin broth

3.4.7 Peptone KNO_3 broth

3.4.8 Nutrient agar

3.4.9 Skim milk agar

3.4.10 Muller Hinton agar (MHA)

3.4.11 Glucose Yeast Extract agar (GYE)

3.4.12 Sabourand agar (SDA)

3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3.5.1 แบคทีเรียในการทดสอบ

3.5.1.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.5.1.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.5.1.3 *Micrococcus luteus* ATCC 9341

3.5.1.4 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.5.1.5 *Staphylococcus aureus* ATCC 1466

3.5.2 ยีสต์ในการทดสอบ

3.5.2.1 *Candida albicans* ATCC 9779

3.6 ฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน

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

3.6.2 3-sn-phosphatidylethanolamine from bovine brain (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St.louis, MO 63103, USA)

3.6.3 Cardiolipin sodium salt from bovine heart (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St.louis, MO 63103, U

3.7 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.7.1 การเก็บตัวอย่างดิน (Yang *et al*., 2014)

เลือกจุดเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนธรรมชาติ โดยใช้วิธีการเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม (ภาคผนวก ข) ก่อนทำการเก็บตัวอย่างให้กวาดเศษกิ่งไม้บริเวณผิวหน้าดินออก จากนั้นทำการขุดดินลึกลงไป 2-3 เซนติเมตร ใช้ช้อนแกงหรือช้อนปลูกตักดินใส่ในถุงพลาสติกใส โดยไม่รัดปากถุง ทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างของดินด้วย pH meter ทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 10 จุด แต่ละจุดเก็บตัวอย่างประมาณ 500 กรัม โดยบันทึกตำแหน่งจุดที่เก็บ และค่าความเป็นกรดด่างที่วัดได้

3.7.2 การเพาะเลี้ยง การแยก และการเก็บรักษาเชื้อแอคติโนมัยซีท (กิ่งจันทร์, 2555)

นำตัวอย่างดินข้อ 3.7.1 มาแยกเชื้อจากตัวอย่างดินที่เก็บมาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เต็มเพลท ทำการตากดินให้แห้งสนิทเป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. แล้วชั่งดินมา 1 กรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มี 0.1% tween 80 ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) กำหนดเป็นระดับการเจือจางที่ 10^{-1} ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีให้ดินตกตะกอน จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในโซเดียมคลอไรด์ 0.9% ปลอดเชื้อให้มีระดับความเจือจางจนถึง 10^{-4} จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหาร Starch - Casein agar (SCA) มี 2 แบบ โดยในแบบแรกเป็นอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำทะเลเทียม โดยใช้เกลือทะเล 37 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และแบบที่สองเป็น

อาหารที่มีส่วนผสมของน้ำทะเลจริง โดยใช้อัตราส่วนน้ำทะเลจริงต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:2 (ภาคผนวก ก) ซึ่งทั้งสองอาหารเติมยาปฏิชีวนะ nystatin และ Nalidixic ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 1000 มิลลิลิตร จำนวน 2 ซ้ำ แล้วบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7-14 วัน (เช็คดูการเจริญของเชื้อที่แยกได้ทุกสัปดาห์

3.7.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน (ภาคผนวก ฉ) (Yang *et al.*, 2014)

3.7.3.1 การหาน้ำหนักดิน

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

3.7.3.2 การหาปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างดินมา 1-2 กรัมใส่ในถ้วยเซรามิคหรือบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป

3.7.3.3 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วยในขณะเดียวกันด้วยช้อนตักสารหรือแท่งแก้ว จนสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆบนผิว (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที - 1 ชั่วโมง) จึงทำการวัดค่าความเป็นกรดด่าง ทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในรูปค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 3 ครั้ง

3.7.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา (กิ่งจันทร์, 2555)

นำตัวอย่างเชื้อในอาหารที่ได้จากข้อ 3.7.2 ทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร Starch - Casein agar (SCA) ที่มีส่วนผสมของน้ำทะเลเทียม โดยใช้เกลือทะเล 37 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และแบบที่สองเป็นอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำทะเลจริง โดยใช้อัตราส่วนน้ำทะเลจริงต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:2 (ภาคผนวก ก) ที่เติมยาปฏิชีวนะ Nalidixic หรือ nystatin 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 1000 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อแยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ลงบนหลอดอาหารเอียง International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่เก็บไว้สำหรับทำการทดลองในขั้นต่อไป และทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลท

3.7.5 การเตรียม spore suspension (วสุ, 2554)

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญเติบโตเต็มที่ทุกไอโซเลทบนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อขูดเอาสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารจนทั่ว แล้วจึงทำการเทลง centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำให้เส้นใยสปอร์เกิดการแตกหักออกจากกัน จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีฆ่าเชื้อเพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับสปอร์ออก นำส่วนที่กรองถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อย เพื่อทำการกระจายตัวสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ในหยดน้ำภายในหลอด แล้วจึงทำการ resuspension ด้วยกลีเซอรอล 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสปอร์ที่ได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็น stock culture

3.7.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อ
(Arumugam *et al.*, 2017)

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) โดยวิธี Cross steak ตรวจผลโดยการดูการเจริญเนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) (ภาคผนวก ฌ) ตรวจดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture (ภาคผนวก ง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.7.7 การตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ

3.7.7.1 การย่อยสลายโปรตีนในนม Peptonization (ลักษมี, 2556)

เขี่ยเชื้อแคติโนมัยซีทจำนวน 1 ลูปลงในอาหาร Yeast extract-Malt extract (YEME) จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นดูดสารละลายใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทดสอบการย่อยโปรตีนในนม

ทดสอบการย่อยโปรตีนในนม จะนำส่วนใส (Supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงหยดลงในอาหาร Skim milk agar ร้อยละ 10 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จำนวน 2 จุด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้น จะเกิดวงใสใสรอบโคโลนี บันทึกผลเป็น

+ เมื่อมีการย่อยโปรตีนในนม เกิดบริเวณใส รอบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท
- เมื่อไม่มีการย่อยโปรตีนในนม ไม่เกิดบริเวณใส รอบโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

3.7.7.2 การย่อยสลายเจลาติน (กุสุมา และคณะ, 2557)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหาร Bouilon Gelatin broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน จากนั้นนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้ไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้ามีการย่อยสลายเจลาตินก็จะไม่เกิดการแข็งตัวของอาหาร

+ เมื่อมีการย่อยเจลาติน จะไม่เกิดการแข็งตัว
- ไม่มีการย่อยเจลาติน

3.7.7.3 การย่อยสลายไนเตรท (กุสุมา และคณะ, 2557)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหาร Peptone nitrite broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ตรวจผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก 2 หยดและสารละลาย N,N-Dimethyl-l-naphthylamine 3 หยด ถ้าเชื้อมีการเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรต์ สารละลายจะเปลี่ยนไปเป็นสีชมพูถึงแดง

+ เมื่อมีการย่อยไนเตรท สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีส้มจนถึงแดง

- เมื่อไม่มีการย่อยไนเตรท ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

3.7.7.4 การย่อยสลายแป้ง (กุสุมา และคณะ, 2557)

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

+ เมื่อเกิดการย่อยสลายแป้ง จะเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อ

- เมื่อไม่เกิดการย่อยสลายแป้ง จะไม่เกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อ

3.7.7.5 การตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโตส ไซโลส และแมนนิทอล

ศึกษาการเฟอร์เมนต์น้ำตาล โดยเขี่ยเชื้อแอคติโนมัยซีทเลี้ยงในอาหาร Phenol Red glucose (or other sugar) broth (pH 7.4) ที่ใส่หลอดดักแก๊ส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 10-14 วัน ตรวจผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร บันทึกผลเป็น

A (Acid) เมื่อมีการหมักน้ำตาล สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

K (Alkaline) เมื่อไม่เกิดการหมักน้ำตาล

W (Weakly) เมื่อเกิดการหมักน้ำตาลเพียงเล็กน้อย สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงสีส้ม

+ เมื่อมีการเฟอร์เมนต์น้ำตาล สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

- เมื่อไม่มีการเฟอร์เมนต์น้ำตาล สารละลายไม่มีการเปลี่ยนแปลง

3.7.8 การศึกษาการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหาร Starch - Casein agar (SCA) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.46, 1, 3 และ 5 (ลักษมี, 2556)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหาร Starch - Casein agar (SCA) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Nacl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.46, 1, 3 และ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท บันทึกผลเป็น

+++++ เมื่อมีการเจริญได้ดีมาก

++++ เมื่อมีการเจริญได้ดี

+++ เมื่อมีการเจริญปานกลาง

++ เมื่อมีการเจริญได้น้อย

+ เมื่อมีการเจริญได้น้อยมาก

- เมื่อไม่มีการเจริญ

3.7.9 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น (Dual test) (Meena *et al*, 2013)

ทำการคัดเลือกเชื้อบนอาหาร Glucose Yeast extract agar (GYE) โดยขีดเส้นเป็นเส้นตรงตามแนวยาวจากด้านหนึ่งไปสู่อีกด้านหนึ่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นทำการทดสอบกับเชื้อก่อโรค 6 ชนิด ได้แก่ *Micrococcus luteus* ATCC 2374, *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 746, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 และ *Escherichia coli* ATCC 074 โดยลากเชื้อทดสอบตั้งฉากกับเชื้อแอคติโนมัยซีท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องชาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ สังเกตระยะห่างระหว่างแนวการเจริญของแอคติโนมัยซีทกับเชื้อทดสอบที่เกิดขึ้น จากการศึกษานี้จะสามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในเบื้องต้น

3.7.10 การทดสอบกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion (Phongsopitanun *et al.*, 2014)

3.7.10.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

ทำการเขี่ยเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 1 ลูปใส่ลงในอาหาร Yeast extract-Malt extract (YEME) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 (จากการทดลองที่ 3.7.8) บ่มไว้ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเติม 0.1% $CaCO_3$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงต่อไว้ในสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.7.10.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากข้อ 3.7.9.1 มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 ขนาด 90 มิลลิเมตร เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอคติโนมัยซีทออกจากอาหารเหลว จากนั้นนำส่วนของน้ำหมักที่ปราศจากเส้นใยมาทำการสกัด โดยใช้เอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทำการเติมลงไปในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ซึ่งในส่วนของเอทิลอะซิเตทมีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์จะแยกตัวออกจากส่วนของน้ำหมัก เลือกส่วนของเอทิลอะซิเตทนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับเซลล์และเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรอง ทำการล้างด้วยเมทานอลประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้มาทำการกรองด้วยกระดาษกรองWhatman no.1 ขนาด 90 มิลลิเมตร เพื่อแยกเอาเส้นใยออกจากสารสกัดเมทานอล จากนั้นนำไประเหยแห้งภายใต้การลดความดัน ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.7.10.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (วสุ, 2554)

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Micrococcus luteus* ATCC 2374, *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 746, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 และ *Escherichia coli* ATCC 074 ผสมกับสารละลาย

โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (Normal saline) ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาแลน หมายเลข 0.5 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.0×10^8 CFU/ml (ภาคผนวก จ)

3.7.10.4 การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ

เตรียมอาหาร Mueller's hinton agar (MHA) สำหรับอาหารที่ใช้ในการทดสอบเลี้ยงแบคทีเรีย และเตรียมอาหาร Sabourand's agar (SDA) เป็นอาหารสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อทดสอบยีสต์ โดยทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ จากนั้นเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร ในจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายทั่วแล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัว

3.7.10.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Sterile swab) ชุบเชื้อที่แขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3.7.10.3 แล้วทา (Swab) ลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.7.10.4 ให้ทั่วด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic technique) เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากข้อ 3.7.10.2 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร และวางลงบนอาหารที่ swab เชื้อไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย การทดสอบนี้อาศัยหลักการแพร่ของสาร ซึ่งสารสกัดจะแพร่ออกกระจายตัวรอบแผ่นทดสอบ การมีสารสกัดฤทธิ์ยับยั้ง จะเกิดวงใสรอบแผ่นทดสอบ ตรวจผลการทดสอบได้ด้วยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสจากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งในหน่วยที่เป็นมิลลิเมตร ด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์

3.7.11 การทดสอบกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar well diffusion (Arumugam *et al.*, 2017)

ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Sterile swab) ชุบเชื้อที่แขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3.7.10.3 แล้วทา (Swab) ลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.7.10.4 ให้ทั่วด้วยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic technique) นำ cork borer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะรูขนาด 6-8 มิลลิเมตร เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากข้อ 3.7.10.2 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงในปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย การทดสอบนี้อาศัยหลักการแพร่ของสาร ซึ่งสารสกัดจะแพร่กระจายจากบริเวณที่มีการหยดเชื้อลงไป การมีสารสกัดฤทธิ์ยับยั้งจะเกิดวงใสรอบบริเวณทดสอบ ตรวจผลการทดสอบได้ด้วยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสจากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งในหน่วยที่เป็นมิลลิเมตร โดยเวอร์เนียคาลิปเปอร์

3.7.12 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (Balouiri *et al.*, 2015)

3.7.12.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Yeast extract-malt extract agar (YEME) สูตรปกติ และ Yeast extract-malt extract agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 1 เขี่ยเชื้อลากให้ทั่วบนจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

3.7.12.2 การศึกษาฟอสโฟลิปิดดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (Klanbut, 2013)

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญบนอาหาร YEME agar ใช้ใบมีดที่ปราศจากเชื้อขูดเชื้อแอคติโนมัยซีทบนผิวหน้าอาหารจำนวน 1 เพลท ที่บ่มไว้เป็นเวลา 10 วัน ลงในหลอด Centrifuge tube จากนั้นทำการสกัดฟอสโฟลิปิด ด้วยการเติมคลอโรฟอร์ม 300 ไมโครลิตร ทำการ vortex เป็นเวลา 3 นาที เติมเมทานอล 600 ไมโครลิตร ทำการ vortex เป็นเวลา 3 นาที และเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 240 ไมโครลิตร ทำการ vortex เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที ด้วย vortex เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 300 ไมโครลิตร และทำการ vortex ต่อเป็นเวลา 1 นาที ปิเปตเอาชั้นอินออแกนิคเฟสที่อยู่ข้างล่างถ่ายใส่ขวด vial ทำการ resuspension ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 6 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตตัวอย่างครั้งละ 2 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่น TLC ขนาด 20×20 เซนติเมตร ยี่ห้อ Merck จากนั้นนำแผ่น TLC ไปวางใน TLC tank ซึ่งมีคลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80/12/15/4 (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ บุด้วยแผ่นกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารละลายเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้สารละลายพาตัวอย่างขึ้นมา (Develop) ประมาณ 3/4 ของความสูงของแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำไปฉีดพ่นด้วยสารละลาย Molybdenum Blue spray reagent จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 2-3 นาที จนปรากฏจุด (spot) ของฟอสโฟลิปิดบนแผ่น TLC จากนั้นจึงให้ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดต่างๆบนแผ่น TLC แล้วจึงวัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการคำนวณ หาค่า Rf

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปราย

4.1 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

จากการเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนแบสุ่ม บริเวณสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ (วิธีการที่ 3.7.1, ภาคผนวก ข) โดยทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 10 ตำแหน่ง นำมาคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท ดังวิธีการทดลองที่ 3.7.2 จนได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 39 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 หมายเลขไอโซเลทของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จำนวน 39 ไอโซเลท

จุดเก็บตัวอย่างดิน	หมายเลขไอโซเลท
จุดที่ 1	BP0313, BP0713, BP0812, BP1213, BP2013, BP2112, BP2213, BP2712, BP2813
จุดที่ 2	BP1722, BP2321, BP3323, BP3922
จุดที่ 3	BP0133, BP0532, BP1033, BP1431, BP1832, BP2531, BP2931, BP3231
จุดที่ 4	BP1141, BP3543
จุดที่ 5	BP0451, BP3851
จุดที่ 6	BP0262, BP0663, BP2461, BP3661
จุดที่ 7	BP1671, BP3472
จุดที่ 8	BP0981, BP1981
จุดที่ 9	BP1392, BP2693, BP3192, BP3792
จุดที่ 10	BP15102, BP30101

***หมายเหตุ: ตัวหนังสือ คือ ชื่อย่อของสถานที่เก็บตัวอย่างดิน
ตัวเลขแรก คือ ลำดับไอโซเลท
ตัวเลขตัวที่สอง คือ จุดที่เก็บตัวอย่างดิน
ตัวเลขสุดท้าย คือ ความเจือจางของสารละลายดินที่ใช้ในการ spread plat

4.2 สมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลนบริเวณสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ โดยทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 10 ตำแหน่ง นำมาหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดินประกอบไปด้วย 3 การทดสอบ ได้แก่ การหาน้ำหนักดิน (ดังวิธีการที่ 3.7.3.1) , การหาปริมาณความชื้น (ดังวิธีการที่ 3.7.3.2), และการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (ดังวิธีการที่ 3.7.3.3) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน

จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (g)	ปริมาณความชื้น (%)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
จุดที่ 1	0.883	52.33	7.1
จุดที่ 2	0.689	41.64	7.5
จุดที่ 3	0.503	38.97	7.6
จุดที่ 4	0.569	33.27	7.3
จุดที่ 5	0.929	36.07	7.4
จุดที่ 6	0.898	33.95	7.4
จุดที่ 7	0.962	41.94	7.2
จุดที่ 8	1.087	40.23	7.1
จุดที่ 9	0.922	60.76	7.4
จุดที่ 10	0.920	33.99	7.3

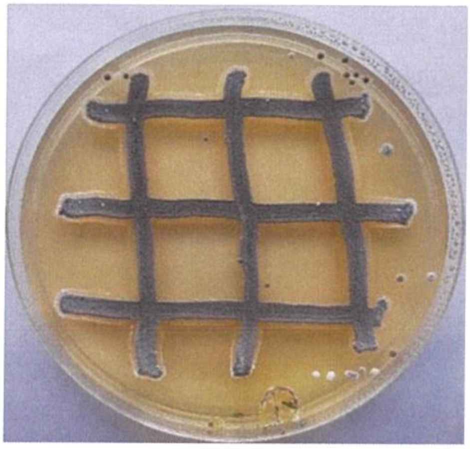
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท

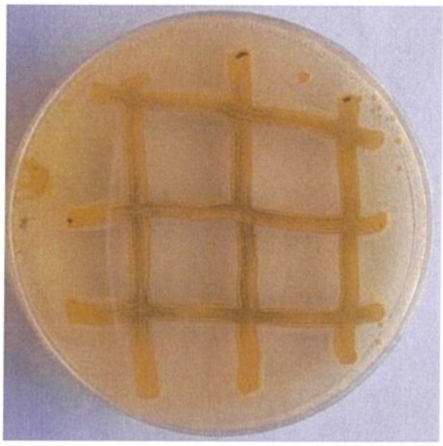
แอคติโนมัยซีทที่ถูกทำการแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิคกำร cross streak บนอาหาร starch casein agar ที่มีส่วนผสมของน้ำทะเลเทียม โดยใช้เกลือทะเล 37 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร เติม nystatin (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ 1000 มิลลิลิตร) (ดังวิธีการที่ 3.7.4) คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้จำนวนทั้งหมด 39 ไอโซเลท (ดังแสดงในตารางที่ 4.1) บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) คัดแยกสีของเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สีของเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ (soluble pigment) โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (วิธีการที่ 3.7.6, ภาคผนวก ฌ) ตรวจดูลักษณะเส้นใยและสปอร์ด้วยวิธี Slide culture (ภาคผนวก ง) โดยทำการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใสแสงที่กำลังขยาย 1000 เท่า (แสดงดังตารางที่ 4.3) เพื่อให้เห็นลักษณะของเส้นใยและการเรียงตัวของสปอร์อย่างชัดเจน พบว่าได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Brown มีจำนวนทั้งหมด 5 ไอโซเลท ประกอบด้วย

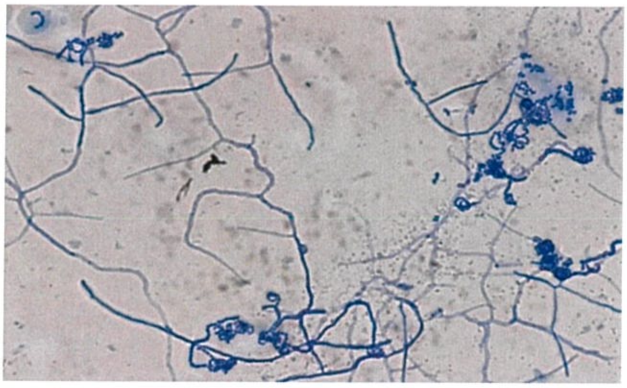
1.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP15102 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Brownish Gray สร้างเส้นใยอาหารสี Grayish Yellowish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati (สายสปอร์ขดคล้ายก้นหอย)



(ก)



(ข)



(ค)

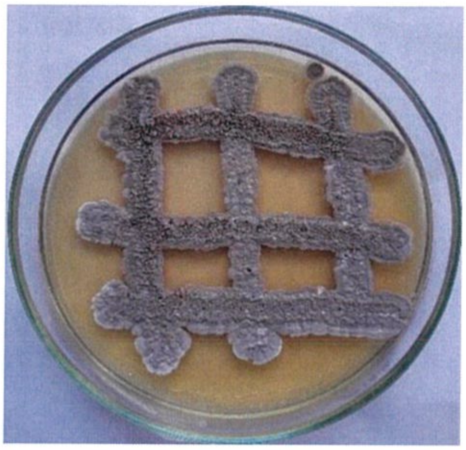
รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP15102 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

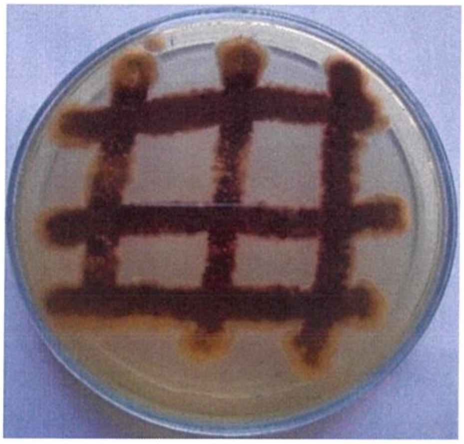
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

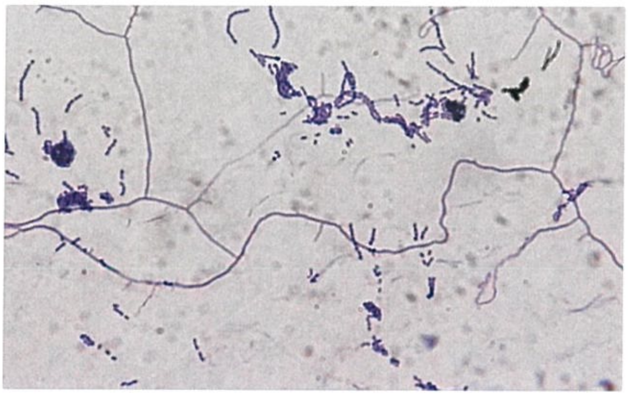
1.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1671บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Light Grayish Brown สร้างเส้นใยอาหารสี Grayish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

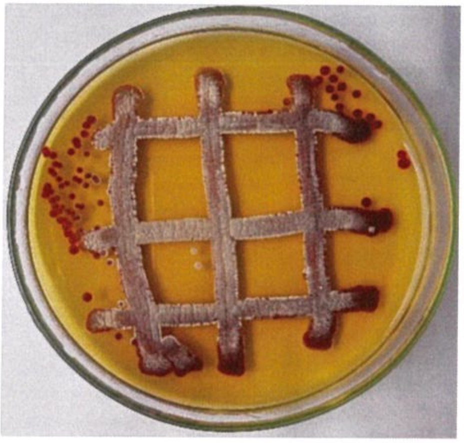
รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1671 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

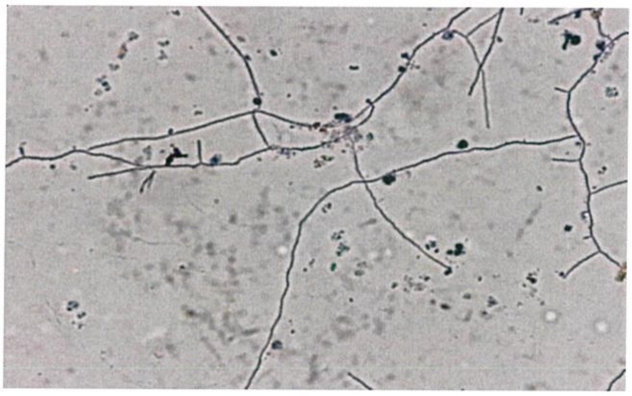
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

1.3 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1722 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Light Grayish Brown สร้างเส้นใยอาหารสี Dark Reddish Brown และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สี Moderate Brown และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)

(ข)



(ค)

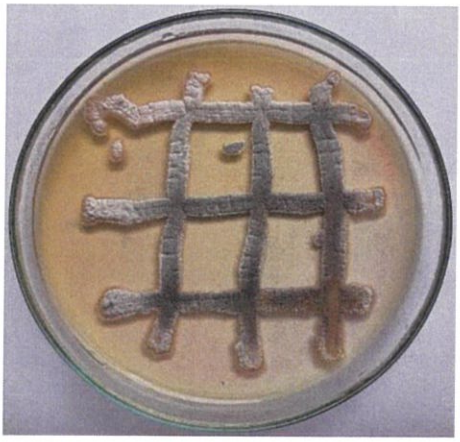
รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1722 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

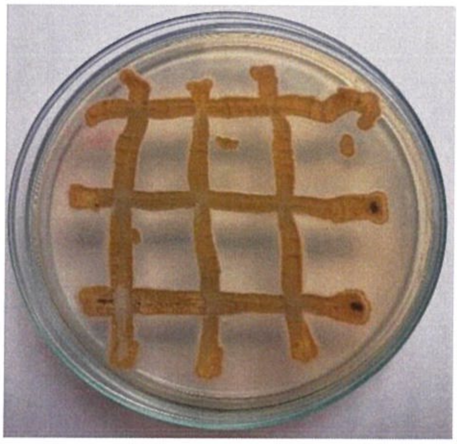
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

1.4 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2321บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Light Brownish Brown สร้างเส้นใยอาหารสี Dark Grayish Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)

(ค)

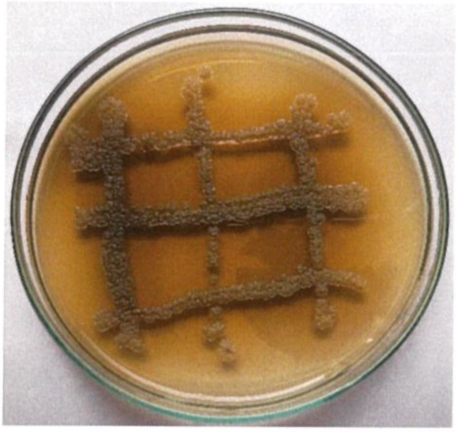
รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2321 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

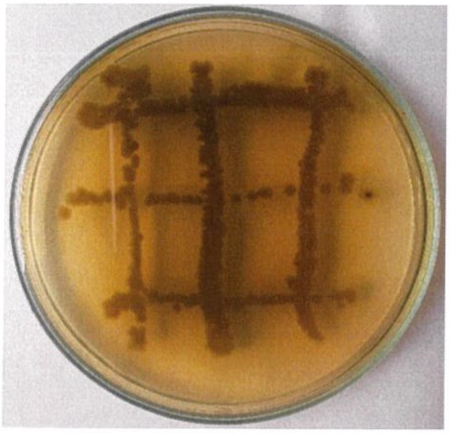
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

1.5 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2461 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอาหารเป็นกลุ่มนูนบนอาหาร (Micromonospora) สี Dark Grayish Brown สร้างเส้นใยอาหารสี Dark Grayish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ สี Moderate Brown และไม่มีการสร้างสปอร์



(ก)



(ข)

(ค)

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2461 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

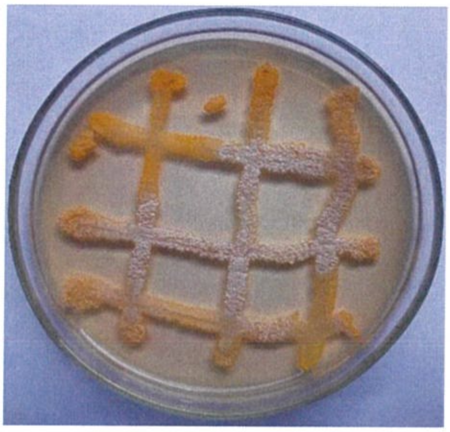
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

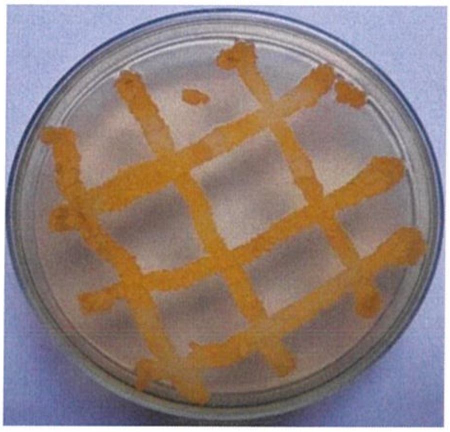
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Orange Yellow มีจำนวนทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย

2.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1141 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Dark Orange Yellow และ สร้างเส้นใยอาหารสี Moderat Orange Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และไม่มีการสร้างสปอร์



(ก)



(ข)

(ค)

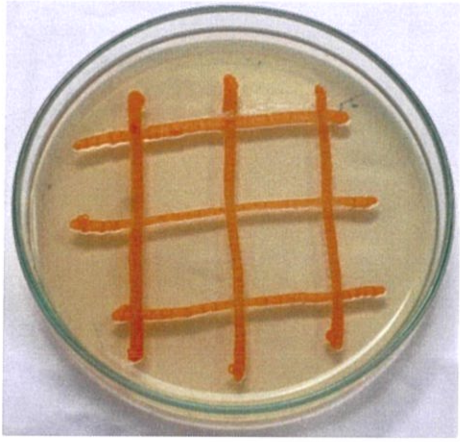
รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1141 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

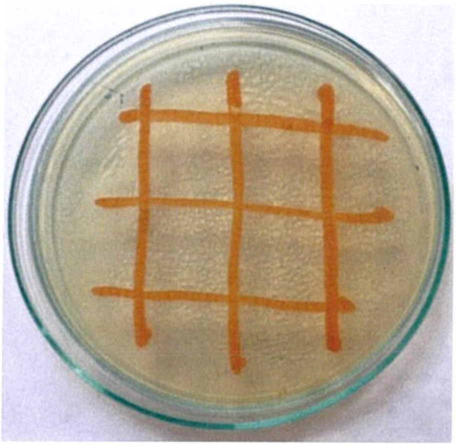
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

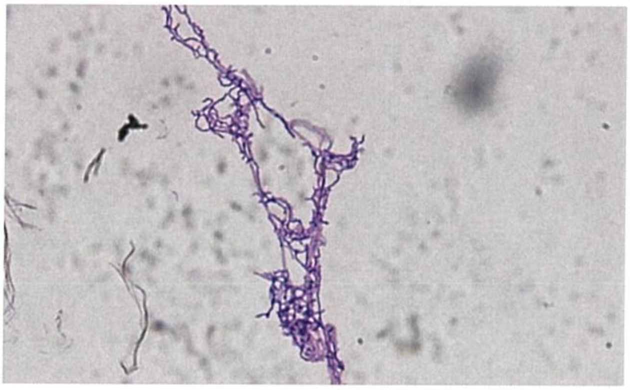
2.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3792 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอาหารเป็นกล่มนูนบนอาหาร (Micromonospora) สี Moderat Orange Yellow และ สร้างเส้นใยอาหารสี Moderat Orange Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3792 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

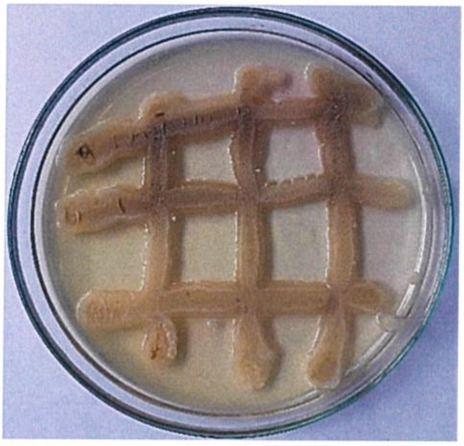
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

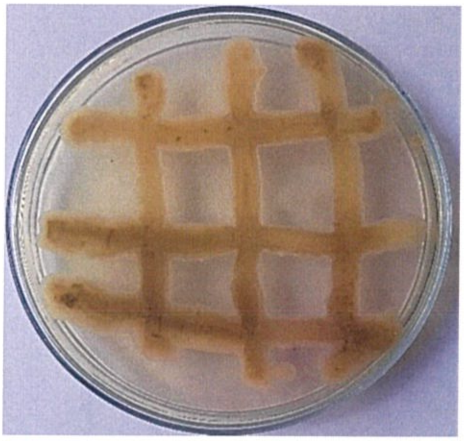
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Brown มีจำนวนทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย

3.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0981 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Yellowish Brown และ สร้างเส้นใยอาหารสี Dark Yellowish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Spira (สายสปอร์เป็นเกลียว)



(ก)



(ข)

(ค)

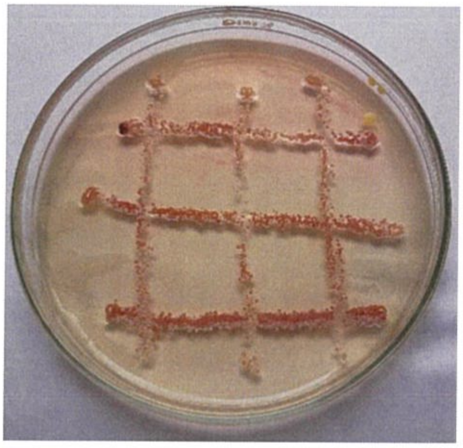
รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0981 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

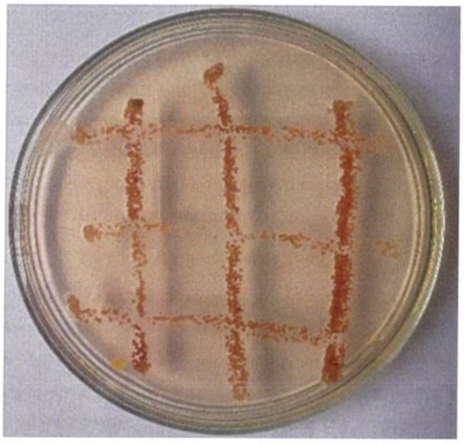
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

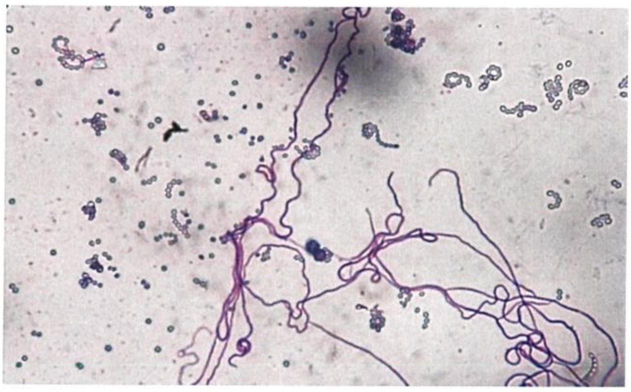
3.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3192 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอาหารเป็นกล่มนูนบนอาหาร (Micromonospora) สี Light Grayish Yellowish Brown สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Yellowish Brown และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Spira (สายสปอร์เป็นเกลียว)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3192 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

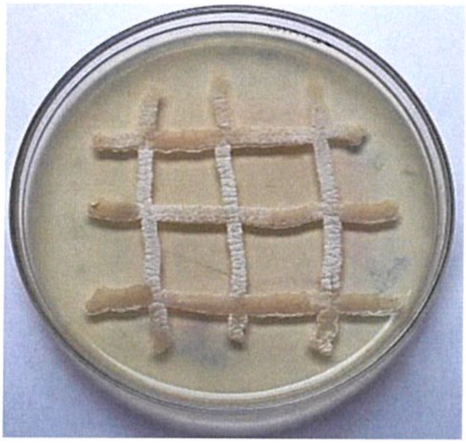
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

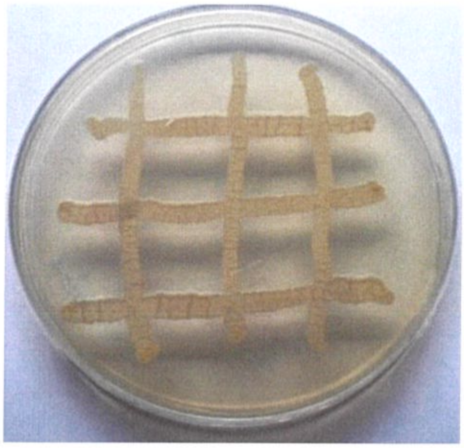
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellow มีจำนวนทั้งหมด 6 ไอโซเลท ประกอบด้วย

4.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0262 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White สร้างเส้นใยอาหารสี Light Greenish Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Spira (สายสปอร์เป็นเกลียว)



(ก)



(ข)

(ค)

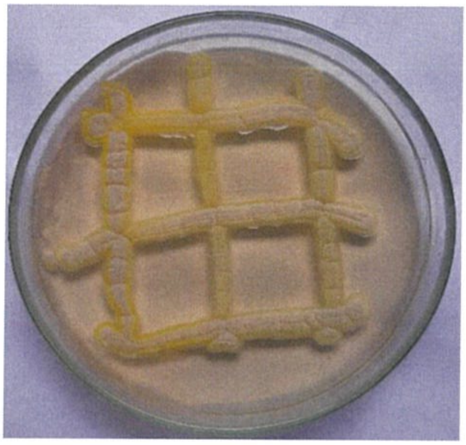
รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0262 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

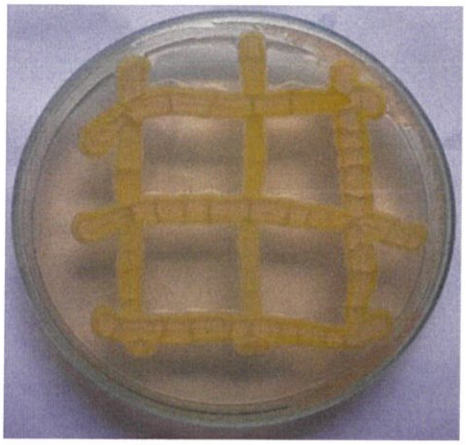
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

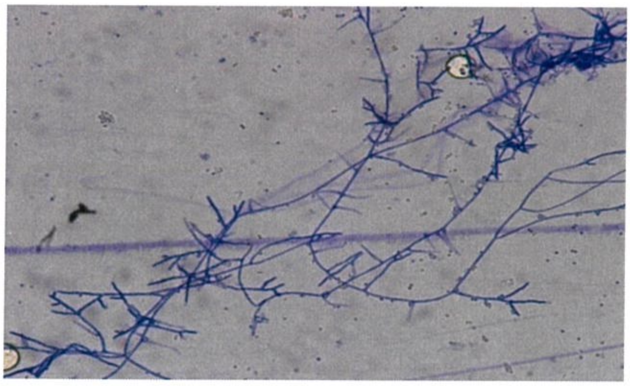
4.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0532 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White สร้างเส้นใยอาหารสี Light Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Micromonospora) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

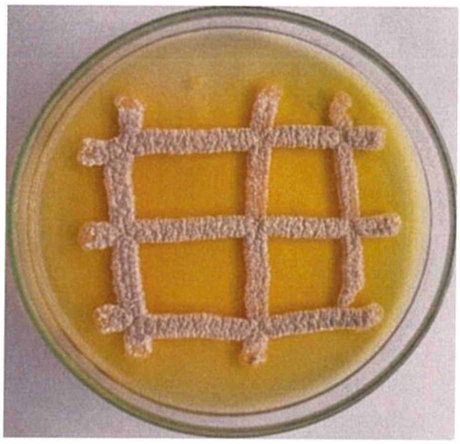
รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0532 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

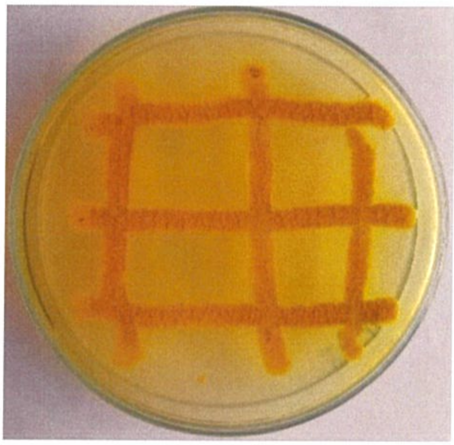
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

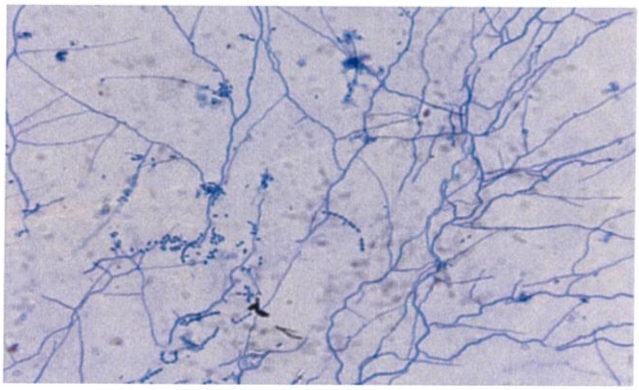
4.3 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1431 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Gray และ สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Yellow และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Deep Yellow และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1431 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

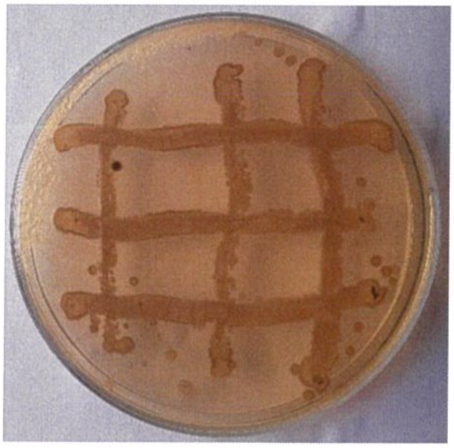
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

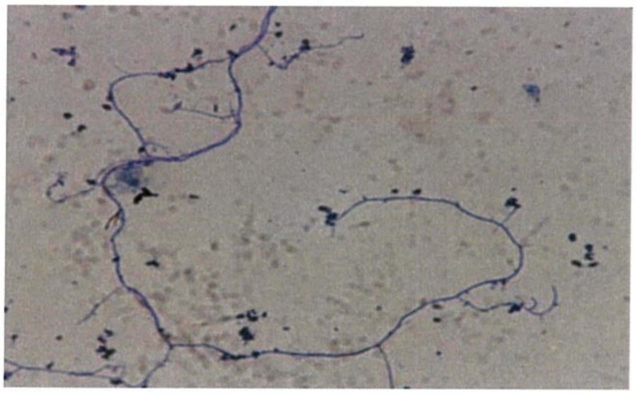
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.4 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1832 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White และ สร้างเส้นใยอาหารสี Dark Orange Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และไม่มีการสร้างสปอร์

(ก)



(ข)



(ค)

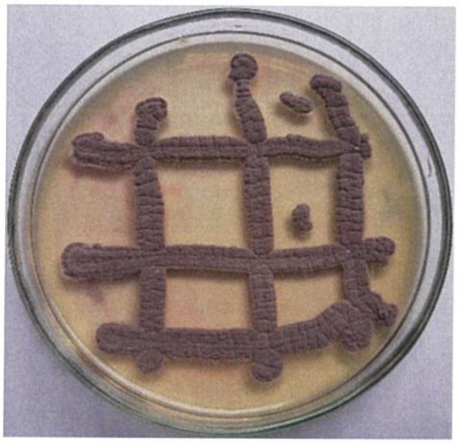
รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1832 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

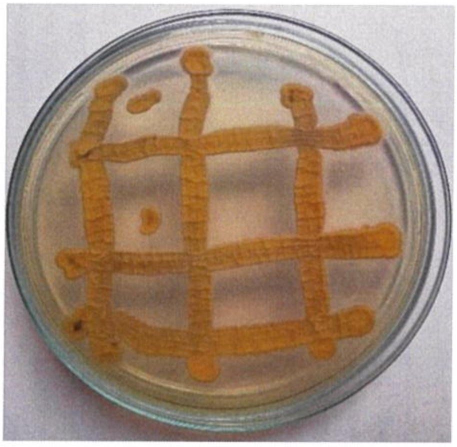
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

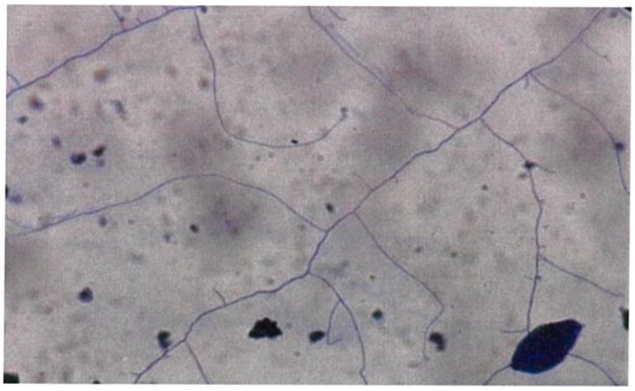
4.5 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2213 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Gray และ สร้างเส้นใยอาหารสี Dark Orange Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และไม่มีการสร้างสปอร์



(ก)



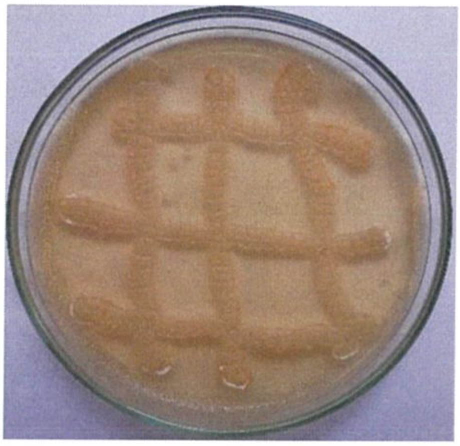
(ข)



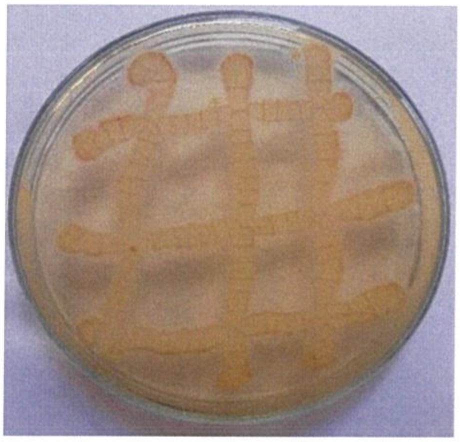
(ค)

รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2213 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

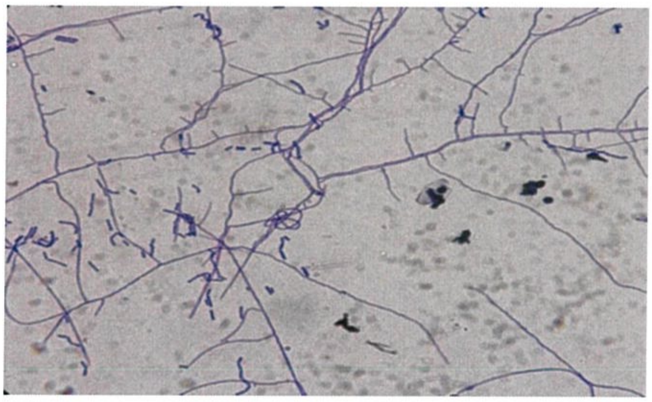
4.6 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2931 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish White และ สร้างเส้นใยอาหารสี Pale Orange Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

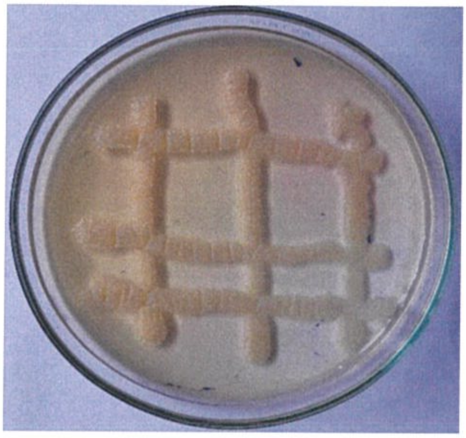
รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2931 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

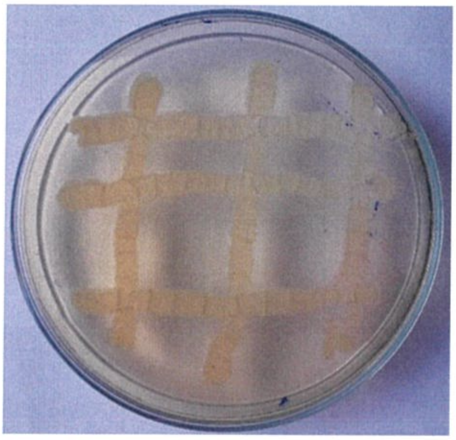
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

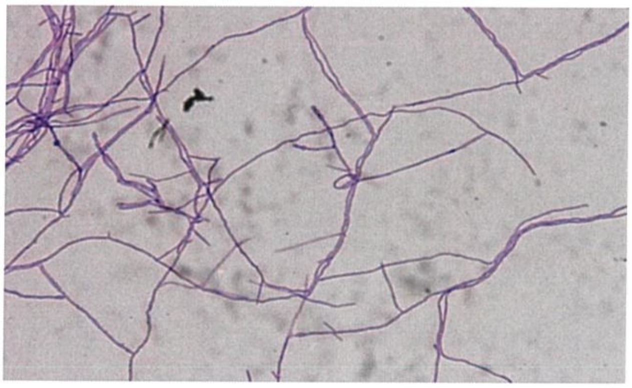
4.7 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3851 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอาหารเป็นกล่มนูนบนอาหาร (Micromonospora) สี Yellowish White และ สร้างเส้นใยอาหารสี Pale Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว(Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3851 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

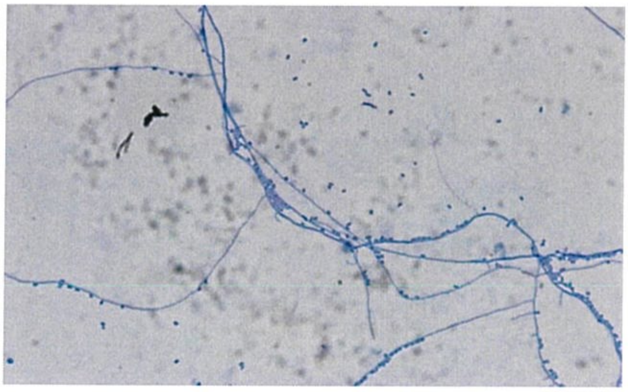
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish Yellow มีจำนวนทั้งหมด 1 ไอโซเลท ประกอบด้วย

5.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1392 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Deep Greenish Yellow และ สร้างเส้นใยอาหารสี Dark Greenish Yellow สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Grayish Greenish Yellow และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Micromonospora) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)

(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1392 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

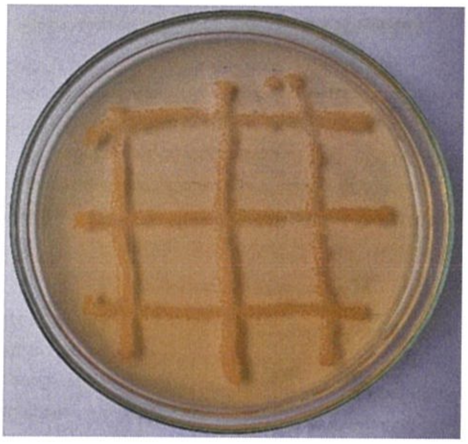
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

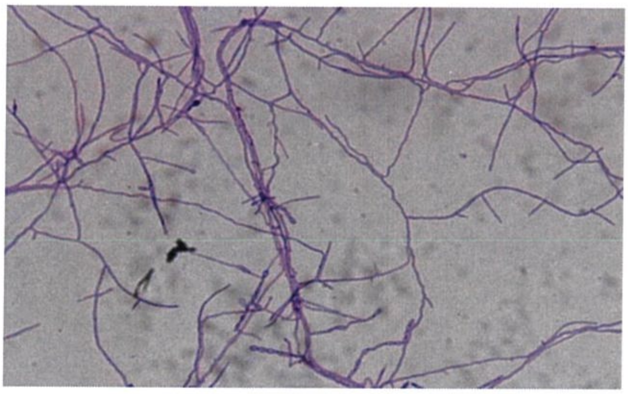
กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Green มีจำนวนทั้งหมด 4 ไอโซเลท ประกอบด้วย

6.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0133 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอาหารเป็นกล่มนูนบนอาหาร (Micromonospora) สี Greenish White และ สร้างเส้นใยอาหารสี Moderat Orange และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Deep Orange และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0133 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

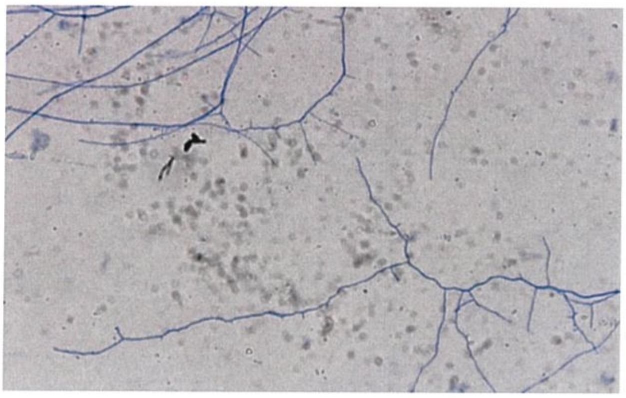
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

6.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1033 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish White และ สร้างเส้นใยอาหารสี Strong Yellowish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และไม่มีการสร้างสปอร์

(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1033 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

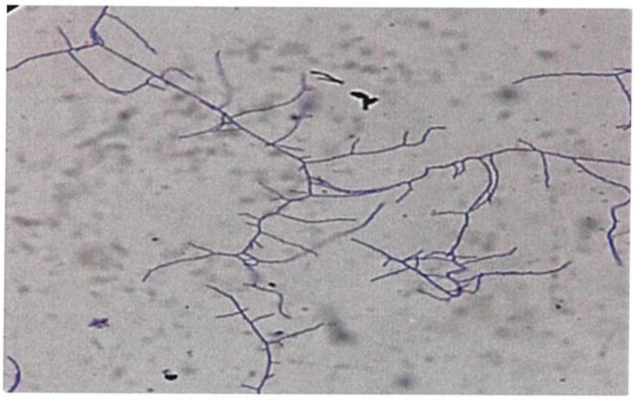
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

6.3 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP30101 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Dark Greenish Gray และ สร้างเส้นใยอาหารสี Dark Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)

(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP30101 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

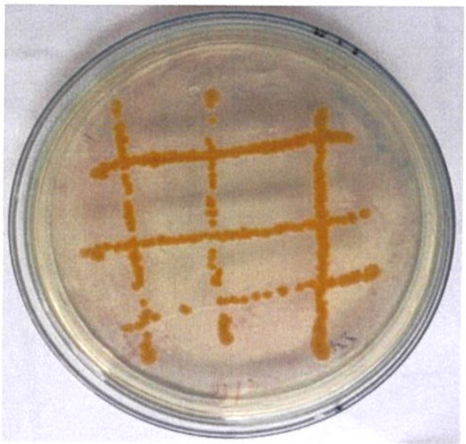
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

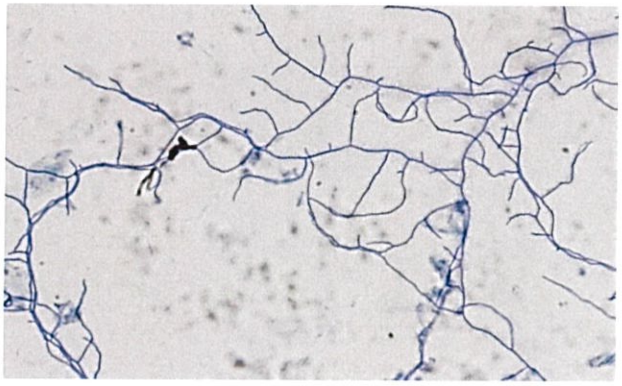
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

6.4 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3661 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish White และสร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Yellowish Pink สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Brilliant Yellow และไม่มีการสร้างสปอร์

(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3661 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

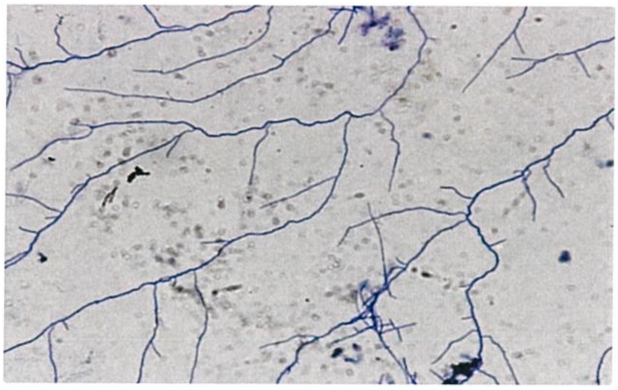
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Blue มีจำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วย

7.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2112 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Cloud Blue และสร้างเส้นใยอาหารสี Light Olive Gray ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และไม่มีการสร้างสปอร์

(ก)

(ข)



(ค)

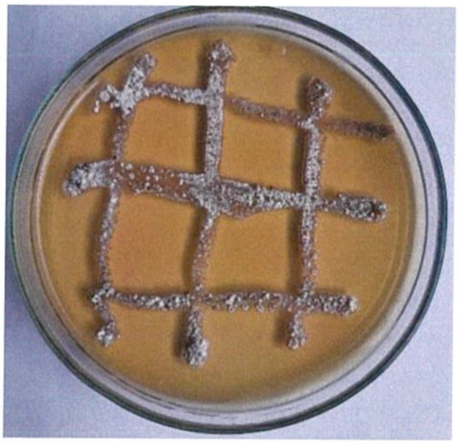
รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2112 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

7.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3472 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Cloud Blue และสร้างเส้นใยอาหารสี Bluish White สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Dark Orange Yellow และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Spira (สายสปอร์เป็นเกลียว)



(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3472 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

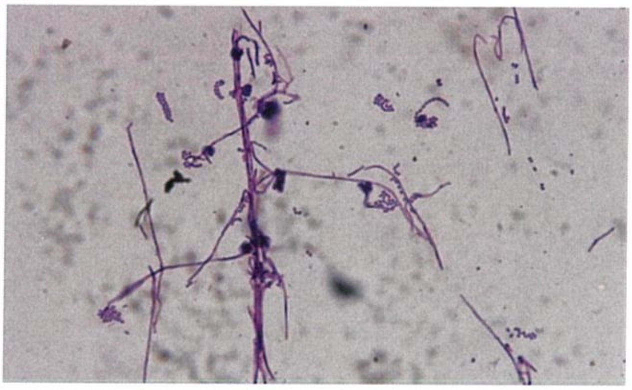
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

7.3 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3543 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Bluish White และสร้างเส้นใยอาหารสี Dark Purple สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Grayish Violet และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Spira (สายสปอร์เป็นเกลียว)

(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3543 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

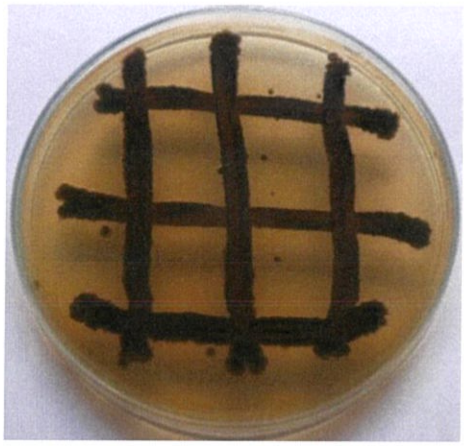
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

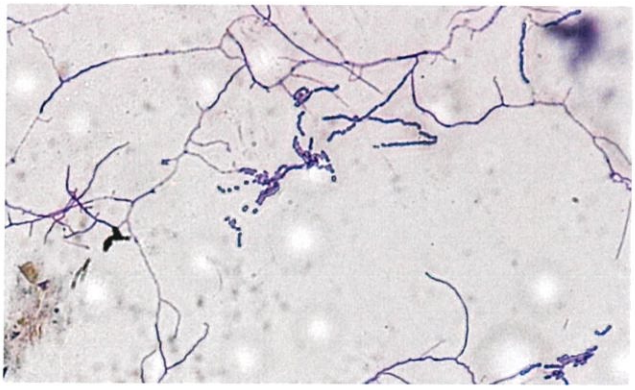
กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Purple มีจำนวนทั้งหมด 4 ไอโซเลท ประกอบด้วย

8.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0663 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Purplish Gray และสร้างเส้นใยอาหารสี Dark Olive สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Moderate Yellow และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)

(ก)



(ข)



(ค)

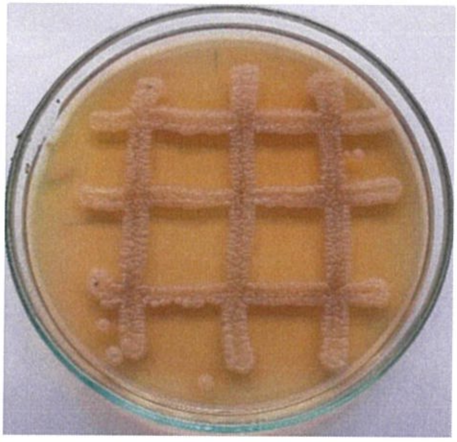
รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0663 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

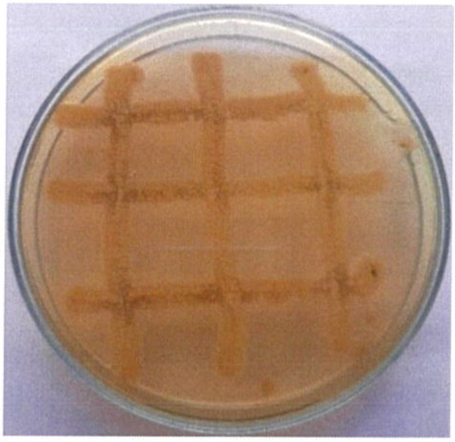
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

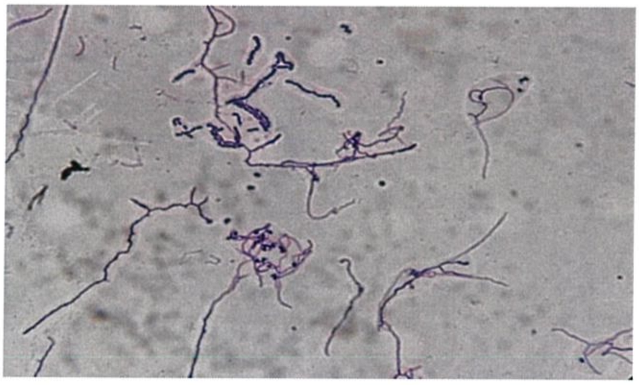
8.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1213 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Light Purplish Gray และสร้างเส้นใยอาหารสี Dark Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

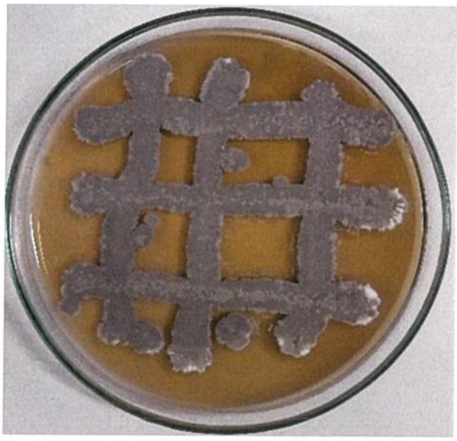
รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1213 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

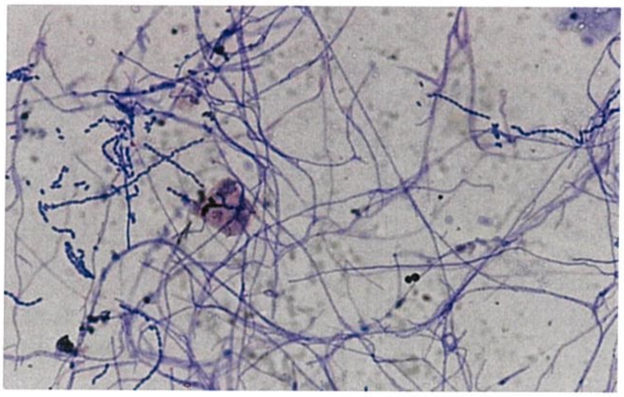
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

8.3 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1981 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Purplish Gray และสร้างเส้นใยอาหารสี Grayish Olive และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Moderate Olive Brown และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1981 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

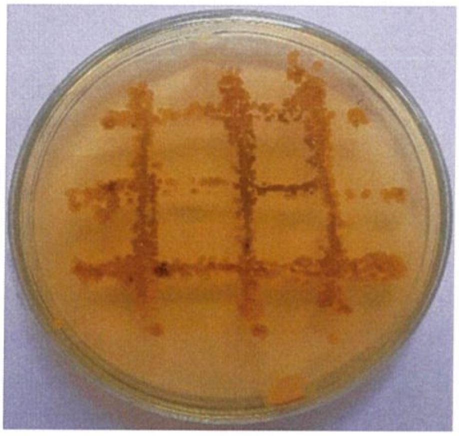
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

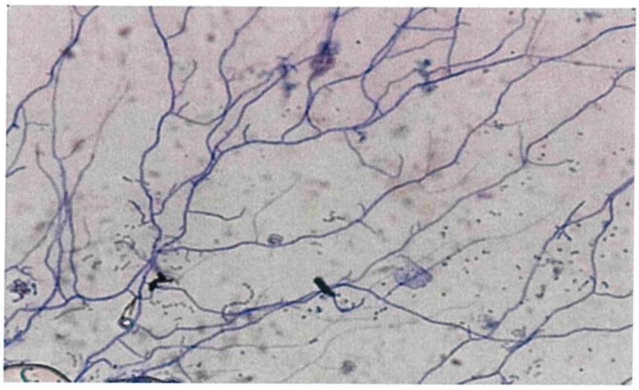
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

8.4 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2013 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Purplish White และสร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Olive Brown และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Moderate Yellowish Brown และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)

(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2013 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

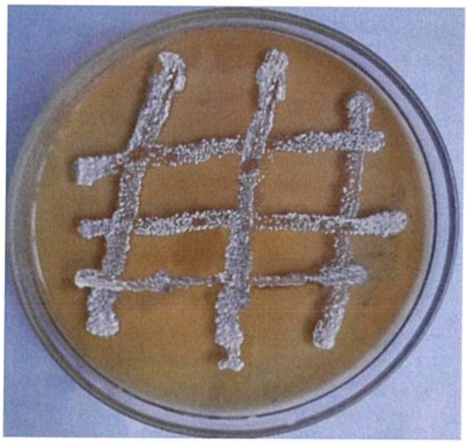
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

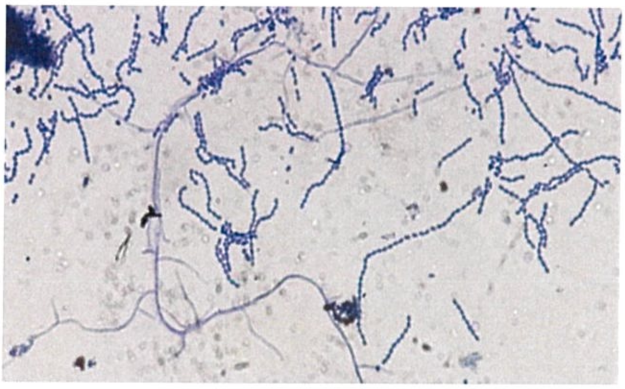
กลุ่มที่ 9 เป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Neutral มีจำนวนทั้งหมด 11 ไอโซเลท ประกอบด้วย

9.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0313 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Deep Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)

(ข)



(ค)

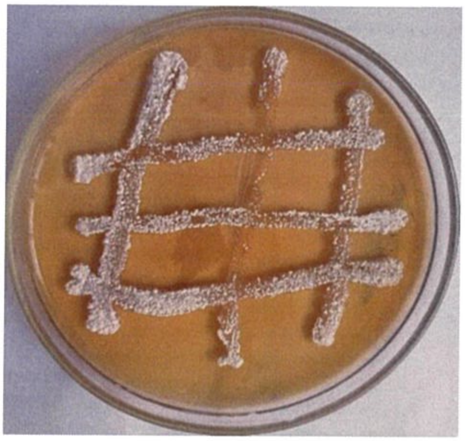
รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0313 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

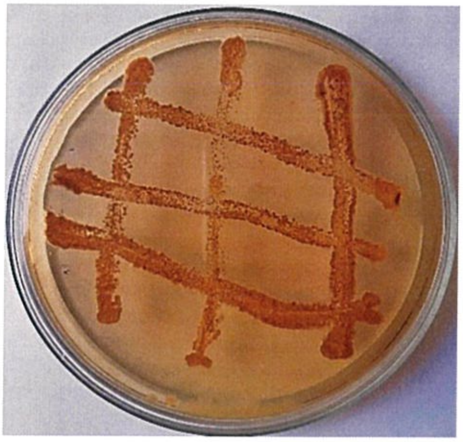
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

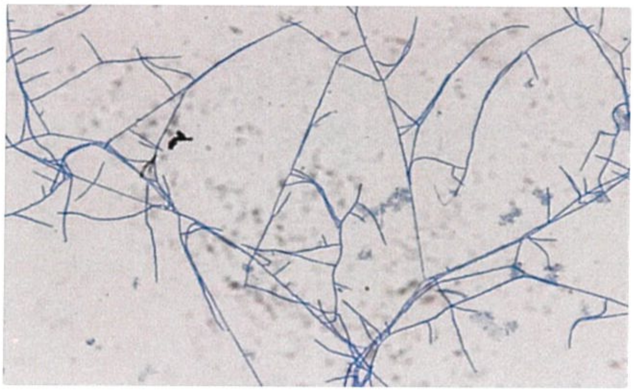
9.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0451 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Olive Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และไม่มีการสร้างสปอร์



(ก)



(ข)



(ค)

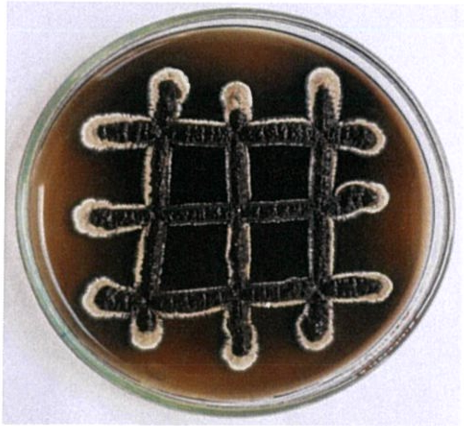
รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0451 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

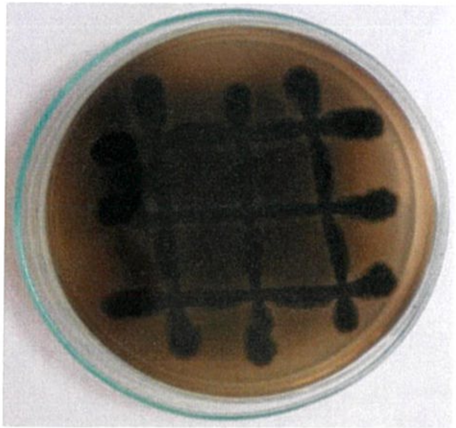
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

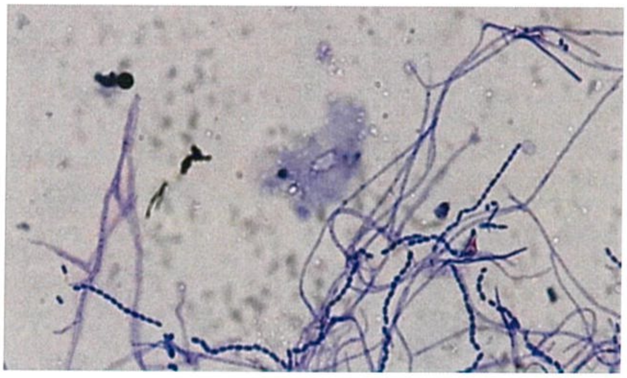
9.3 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0713 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Black และสร้างเส้นใยอาหารสี Black สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Moderate Olive Brown และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0713 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

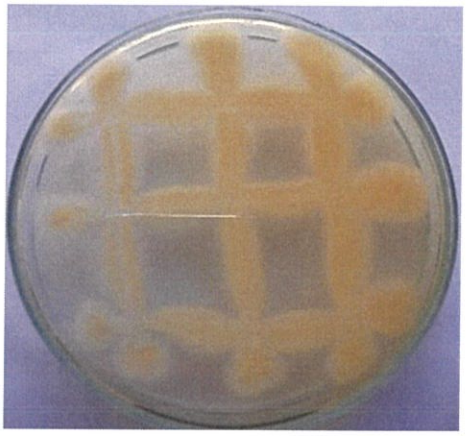
(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

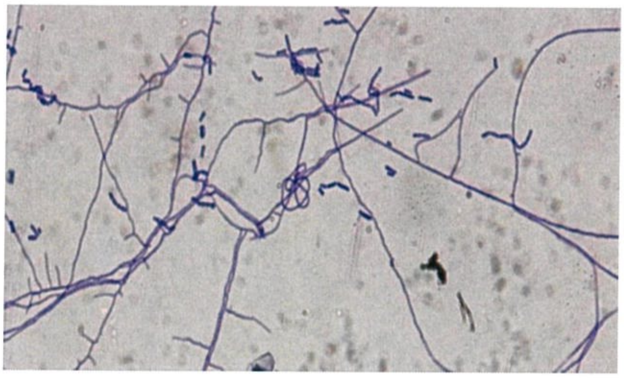
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

9.4 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0812 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Light Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)

(ก)



(ข)



(ค)

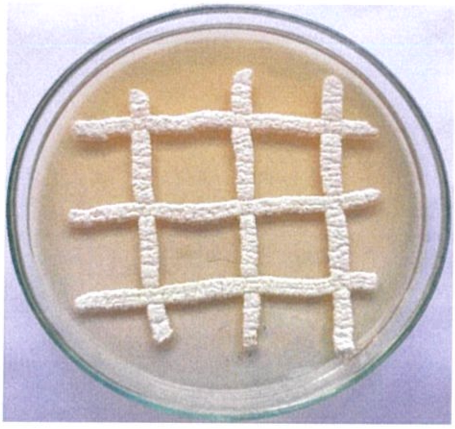
รูปที่ 4.32 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0812 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

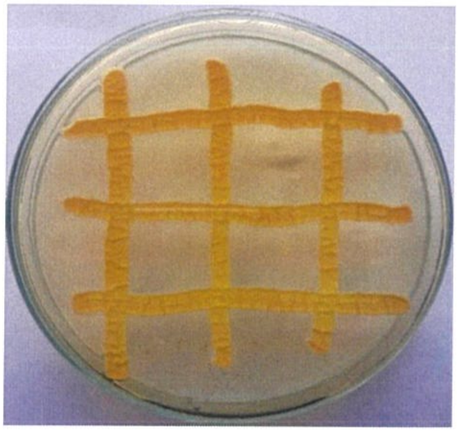
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

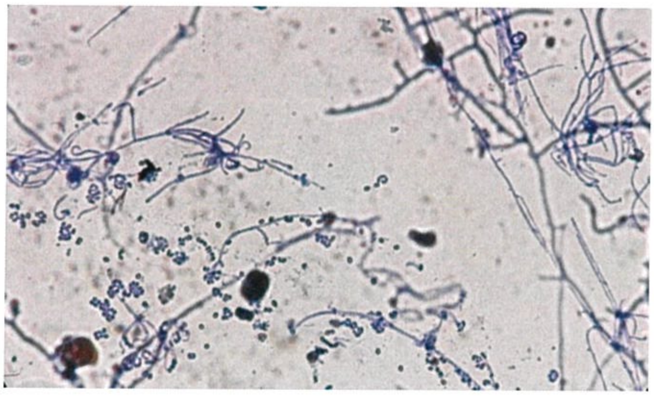
9.5 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2531 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish White และสร้างเส้นใยอาหารสี Light Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Verticillati (สายสปอร์หดคล้ายก้นหอย)



(ก)



(ข)



(ค)

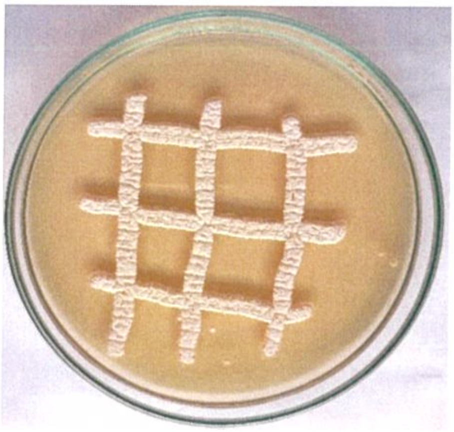
รูปที่ 4.33 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2531 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

9.6 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2693 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish White และสร้างเส้นใยอาหารสี Pale Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)

(ข)

(ค)

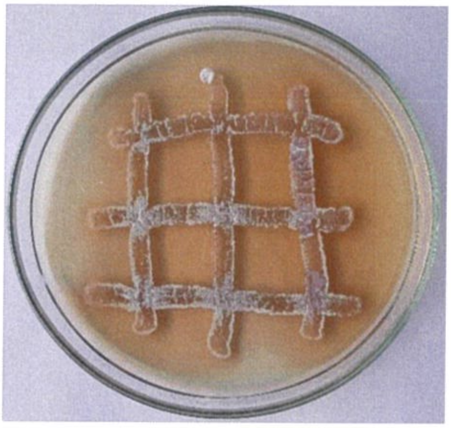
รูปที่ 4.34 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2693 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

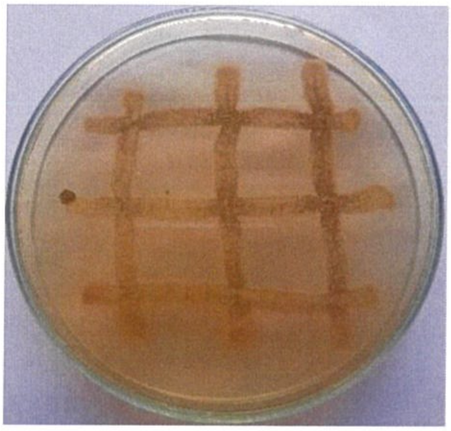
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

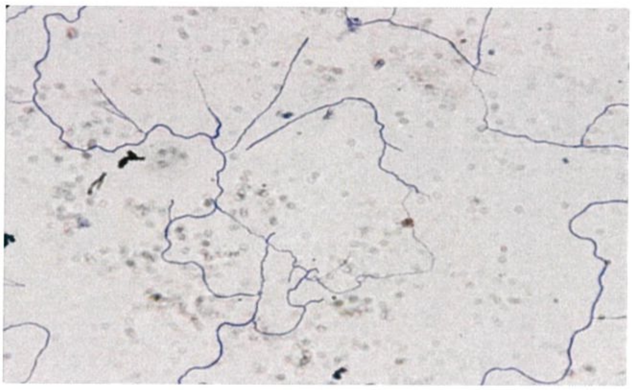
9.7 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2712 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong Yellowish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และไม่มีการสร้างสปอร์



(ก)



(ข)



(ค)

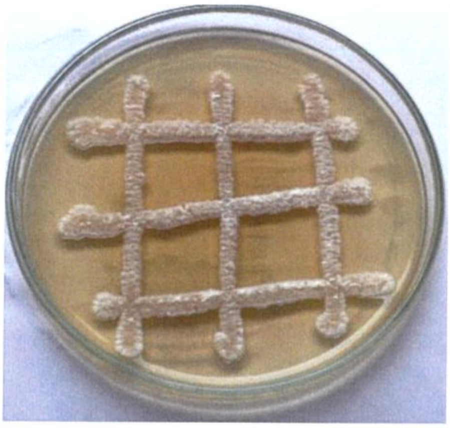
รูปที่ 4.35 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2712 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

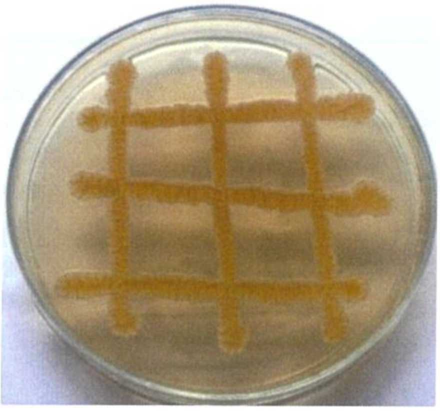
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

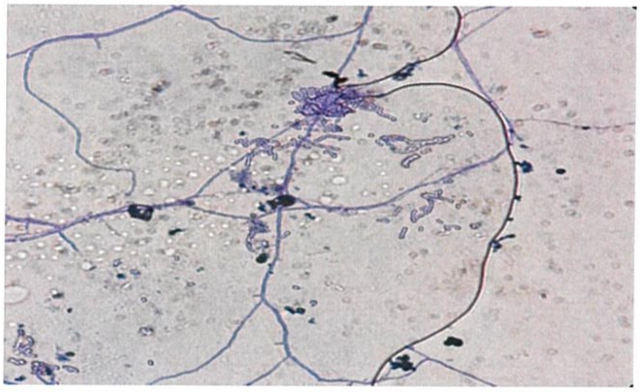
9.8 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2813 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Medium Gray และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong Yellowish Brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Grayish Yellow Green และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

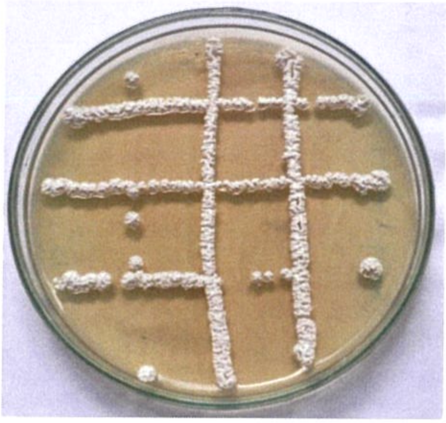
รูปที่ 4.36 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2813 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

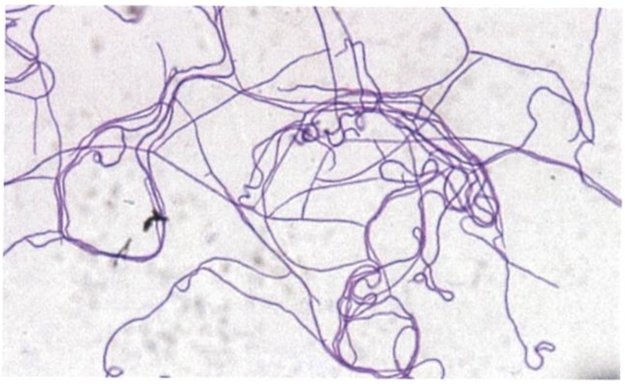
(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

9.9 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3231 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี Olive Gray และสร้างเส้นใยอาหารสี Dark Grayish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และไม่มีการสร้างสปอร์



(ก)

(ข)



(ค)

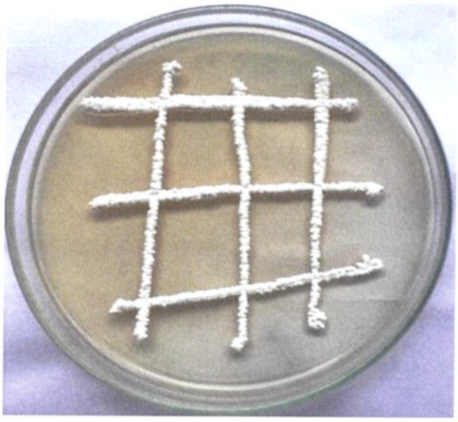
รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3231 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

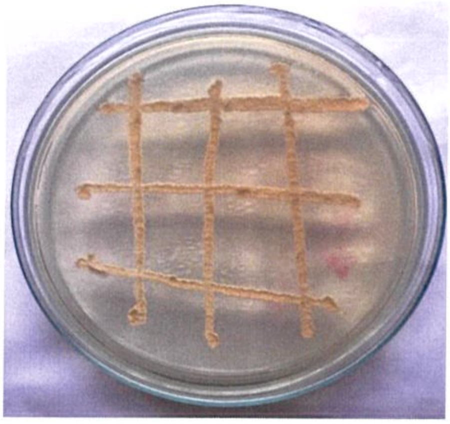
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

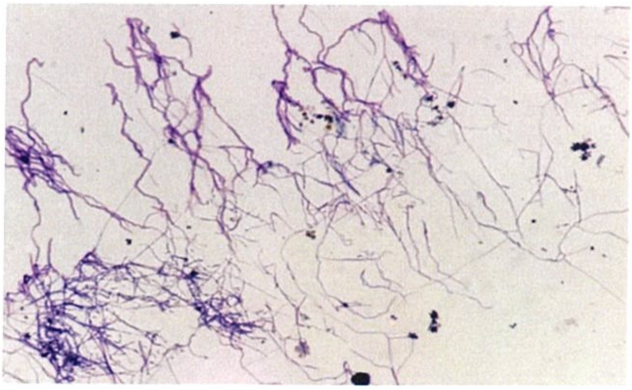
9.10 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3323 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Dark Orange Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectiflexbiles (สายสปอร์ตรง)



(ก)



(ข)



(ค)

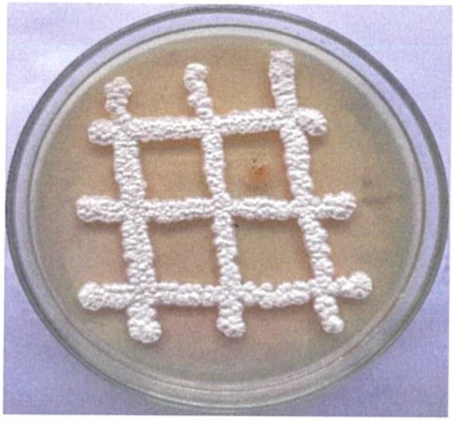
รูปที่ 4.38 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3323 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

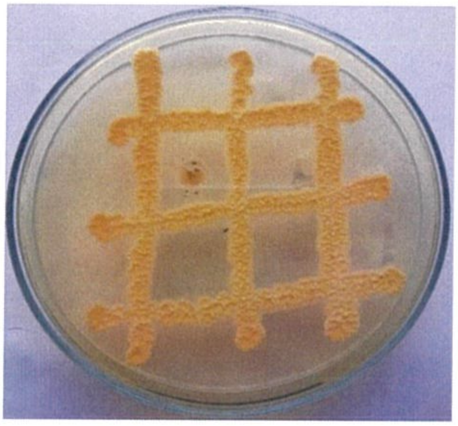
(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

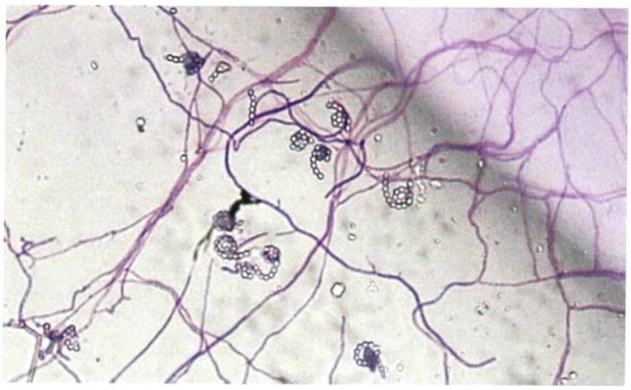
9.11 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3922 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Light Yellow และไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ และมีการสร้างสปอร์แบบสายยาว (Polysporerous) มีลักษณะเป็นแบบ Rectinaculiaperti (สายสปอร์คล้ายขอ)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.39 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP3922 บนอาหาร International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2)

(ก) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

(ข) แสดงลักษณะ การสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium)

(ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 39 ไอโซเลท เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) (ภาคผนวก ญ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลท	Aerial mycelium	Substrate mycelium	รงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ลักษณะของของสปอร์
1 (Brown)	BP15102	#5B504F Brownish Gray	#7D7E5A Grayish Yellowish Brown	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Verticillati
	BP1671	#958070 Light Grayish Brown	#635174 Grayish Brown	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
	BP1722	#958070 Light Grayish Brown	#321011 Dark Reddish Brown	#673923 Moderate Brown	Rectiflexbiles
	BP2321	#8E8279 Light Brownish Brown	#A47C45 Dark Grayish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
	BP2461	#3E322C Dark Grayish Brown	#3E322C Dark Grayish Brown	#6F4E37 Moderate Brown	ไม่สร้างสปอร์
2 (Orange Yellow)	BP1141	#BE8A3D Dark Orange Yellow	#E3A857 Moderat Orange Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ไม่สร้างสปอร์
	BP3792	#F7943C Moderat Orange Yellow	#F7943C Moderat Orange Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
3 (Yellowish Brown)	BP0981	#826644 Moderate Yellowish Brown	#AB3621 Dark Yellowish Brown	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Spira

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 39 ไอโซเลท เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) (ภาคผนวก ญ) (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลท	Aerial mycelium	Substrate mycelium	รงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ลักษณะของสปอร์
3 (Yellowish Brown)	BP3192	#AE9B82 Light Grayish Yellowish Brown	#826644 Moderate Yellowish Brown	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Spira
4 (Yellow)	BP0262	#FFE2B7 Yellowish White	#EAE679 Light Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Spira
	BP0532	#F0EAD6 Yellowish White	#F8DE7E Light Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
	BP1431	#BFB8A5 Yellowish Gray	#D79D41 Moderate Yellow	B57900 Deep Yellow	Rectiflexbiles
	BP1832	#F0EAD6 Yellowish White	#BE8A3D Dark Orange Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ไม่สร้างสปอร์
	BP2213	#BFB8A5 Yellowish Gray	#BE8A3D Dark Orange Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ไม่สร้างสปอร์
	BP2931	#FFE2B7 Yellowish White	#FAD6A5 Pale Orange Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
	BP3851	#F0EAD6 Yellowish White	#F3E5AB Pale Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 39 ไอโซเลท เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) (ภาคผนวก ญ) (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลท	Aerial mycelium	Substrate mycelium	รงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์
5 (Greenish Yellow)	BP1392	#9F8200 Deep Greenish Yellow	#9B8127 Dark Greenish Yellow	#C4A55F Grayish Greenish Yellow	Rectiflexbiles
6 (Green)	BP0133	#F5E6CB Greenish White	#D99058 Moderat Orange	#BE6516 Deep Orange	Rectiflexbiles
	BP1033	#F5E6CB Greenish White	#996515 Strong Yellowish Brown	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ไม่สร้างสปอร์
	BP30101	#45433B Dark Greenish Gray	#B07D2B Dark Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
	BP3661	#F5E6CB Greenish White	#EE9374 Moderate Yellowish Pink	#FADA5E Brilliant Yellow	ไม่สร้างสปอร์
7 (Blue)	BP2112	#C1CACA Cloud Blue	#887359 Light Olive Gray	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ไม่สร้างสปอร์
	BP3472	#E9E9ED Bluish White	#996515 Yellowish Brown	#BE8A3D Dark Orange Yellow	Spira
	BP3543	#E9E9ED Bluish White	#472A3F Dark Purple	#554C69 Grayish Violet	Spira

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 39 ไอโซเลท เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) (ภาคผนวก ญ) (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลท	Aerial mycelium	Substrate mycelium	รงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์
8 (Purple)	BP0663	#8B8589 Purplish Gray	#362C12 Dark Olive	#C9AE5D Moderate Yellow	Rectiflexbiles
	BP1213	#C8A99E Light Purplish Gray	#AB9144 Dark Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
	BP1981	#8B8589 Purplish Gray	#52442C Grayish Olive	#64400F Moderate Olive Brown	Rectiflexbiles
	BP2013	#E8E3E5 Purplish White	#64400F Moderate Olive Brown	#7D512D Moderate Yellowish Brown	Rectiflexbiles
9 (Neutral)	BP0313	#F2F3F4 White	#B57900 Deep Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
	BP0451	#F2F3F4 White	#64400F Moderate Olive Brown	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ไม่สร้างสปอร์
	BP0713	#222222 Black	#222222 Black	#6C541E Moderate Olive Brown	Rectiflexbiles
	BP0812	#F2F3F4 White	#F8DE7E Light Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 39 ไอโซเลท เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) (ภาคผนวก ญ) (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลท	Aerial mycelium	Substrate mycelium	รงควัตถุที่ละลายน้ำได้	ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์
9 (Neutral)	BP2531	#F5E6CB Greenish White	#FFDE5A Light Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Verticillati
	BP2693	#F5E6CB Greenish White	#FFDF84 Pale Greenish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
	BP2712	#F2F3F4 White	#996515 Strong Yellowish Brown	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ไม่สร้างสปอร์
	BP2813	#848482 Medium Gray	#996515 Strong Yellowish Brown	#90845B Grayish Yellow Green	Rectiflexbiles
	BP3231	#57554C Olive Gray	#A47445 Dark Grayish Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ไม่สร้างสปอร์
	BP3323	#848482 Medium Gray	#BE8A3D Dark Orange Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectiflexbiles
	BP3922	#F2F3F4 White	#F8DE7E Light Yellow	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rectinaculiaparti

***หมายเหตุ : #XXXXXX แสดงสัญลักษณ์ระบบสี RGB ซึ่งเป็นระบบสีที่เกิดจากการรวมตัวของแสงสีแดง เขียว และน้ำเงิน เช่น #F8DE7E สี Light Yellow

4.3.2 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ จำนวนทั้งหมด 39 ไอโซเลท จากดินป่าชายเลน บริเวณสถานตากอากาศบางปู จ.สมุทรปราการ

รูปที่ 4.40 แสดงลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีท จำนวนทั้งหมด 39 ไอโซเลท

4.3.3 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ในการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ ทั้งหมด 39 ไอโซเลท (ดังวิธีการที่ 3.7.7) มีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจำแนกและระบุคุณสมบัติของแอคติโนมัยซีท (Sharma, 2014) ทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทร้อยละ 20.51 ที่เกิดวงใส (Clear zone) รอบโคโลนี แสดงถึงสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อย่อยสลายโปรตีนได้ ทดสอบการย่อยสลายแป้งในอาหาร พบว่าเกิดวงใสรอบโคโลนีร้อยละ 58.97 แสดงว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เพื่อย่อยสลายแป้งได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ ทายาท (2558) ผลการทดสอบการย่อยสลายเจลาติน พบว่าแอคติโนมัยซีทร้อยละ 38.46 สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ จากการผลิตเอนไซม์ Gelatinase ของแอคติโนมัยซีท และผลการทดสอบการย่อยสลายไนเตรท พบว่าร้อยละ 61.54 สามารถย่อยสลายไนเตรทได้

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท 39 ไอโซเลท

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	การย่อยสลายโปรตีนในนม (Peptonization)	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การย่อยสลายไนเตรท
1	BP15102	+	-	+	+
	BP1671	+	-	-	+
	BP1722	-	+	-	+
	BP2321	-	-	+	-
	BP2461	-	+	-	+
2	BP1141	-	+	-	-
	BP3792	+	-	-	-
3	BP0981	+	+	+	-
	BP3192	-	-	-	+
4	BP0262	-	+	+	+
	BP0532	-	+	-	+
	BP1431	+	+	-	+
	BP1832	-	-	-	-
	BP2213	-	+	-	+
	BP2931	-	-	-	+
	BP3851	+	-	-	+
5	BP1392	+	+	+	+
6	BP0133	-	-	+	-
6	BP1033	-	-	+	+
	BP30101	-	+	+	-
	BP3661	-	+	-	+
7	BP2112	-	-	+	+
	BP3472	-	+	-	+
	BP3543	-	+	-	+
8	BP0663	+	+	+	+
	BP1213	-	+	-	+
	BP1981	-	+	+	+
	BP2013	-	+	-	-

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท 39 ไอโซเลท (ต่อ)

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	การย่อยสลายโปรตีนในนม (Peptonization)	การย่อยสลายแป้ง	การย่อยสลายเจลาติน	การย่อยสลายไนเตรท
9	BP0313	-	+	-	+
	BP0451	+	-	+	+
	BP0713	-	-	+	-
	BP0812	-	-	-	-
	BP2531	-	+	-	-
	BP2693	-	+	+	+
	BP2712	-	-	-	+
	BP2813	-	+	-	+
	BP3231	-	+	-	-
	BP3323	-	+	-	-
	BP3922	-	-	+	-

ตารางที่ 4.5 แสดงผลทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในนม (Peptonization)

หมายเลขไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		
	ซ้ำที่ 1	**ซ้ำที่ 2**	**เฉลี่ย**
BP0415	14.15	11.85	13.00
BP0663	22.90	22.00	22.45
BP0981	39.95	37.30	38.13
BP1392	40.68	40.15	40.42
BP15102	10.30	11.00	10.65
BP1671	33.00	31.35	32.13
BP3792	13.30	12.55	12.93
BP3851	12.00	12.00	12.00

4.3.3.5 การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาล โดยใช้น้ำตาลทดสอบจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, ไซโลส, แลคโตส และ มานิทอล

การทดสอบความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาลในอาหารเหลว Phenol red glucose ทำการตรวจผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร ถ้ามีการเฟอร์เมนต์น้ำตาลเกิดขึ้น สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ดังวิธีการที่ 3.7.7.5)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ทดสอบความสามารถการหมักน้ำตาล ในน้ำตาลกลูโคส พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทร้อยละ 76.92 ได้ผล A/+ หรือ W/+ แสดงถึงความสามารถในการหมักน้ำตาลได้ และเกิดก๊าซจากการหมัก ในน้ำตาลซูโครสพบร้อยละ 23.08 ในน้ำตาลไซโลสพบร้อยละ 46.15 ในน้ำตาลแลคโตสพบร้อยละ 20.51 และในน้ำตาลมานิทอลพบร้อยละ 23.08 สอดคล้องกับงานวิจัยของ ทายาท (2017) ที่การทดลองมีการใช้น้ำตาล glucose และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการเจริญ และในการหมักน้ำตาลของเชื้อแอคติโนมัยซีทแสดงถึงความสามารถในการใช้คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน (Sivakumar, 2001)

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยใช้น้ำตาลทดสอบจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Glucose, Sucrose, Xylose, Lactose และ Manitol

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	น้ำตาลทดสอบ 5 ชนิด				
		Glucose	Sucrose	Xylose	Lactose	Manitol
1	BP15102	A/+	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP1671	A/+	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP1722	A/+	K/-	K/-	W/+	K/-
	BP2321	A/-	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP2461	A/+	K/-	A/-	K/-	K/-
2	BP1141	A/+	A/-	w/+	K/-	K/-
	BP3792	A/+	K/-	A/+	K/-	K/-
3	BP0981	A/+	K/-	W/+	K/-	K/-
	BP3192	K/-	K/-	A/-	W/-	K/-
4	BP0262	K/-	A/+	K/-	K/-	K/-
	BP0532	A/+	K/-	A/+	K/-	K/-
	BP1431	A/+	W/+	K/-	K/-	K/-
	BP1832	K/-	A/+	W/+	K/-	K/-
	BP2213	A/+	W/+	K/-	K/-	K/-
	BP2931	K/-	K/-	A/-	W/+	K/-

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยใช้น้ำตาลทดสอบจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Glucose, Sucrose, Xylose, Lactose และ Manitol (ต่อ)

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	น้ำตาลทดสอบ 5 ชนิด				
		Glucose	Sucrose	Xylose	Lactose	Manitol
5	BP1392	A/+	K/-	K/-	K/-	K/-
6	BP0133	A/+	K/-	A/+	K/-	K/-
	BP1033	K/-	A/+	K/-	K/-	K/-
	BP30101	A/+	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP3661	A/+	K/-	A/-	W/-	K/-
7	BP2112	K/-	W/-	A/+	W/+	K/-
	BP3472	A/+	A/+	K/-	K/-	K/-
	BP3543	K/-	K/-	A/-	K/-	K/-
8	BP0663	A/+	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP1213	A/+	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP1981	A/+	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP2013	A/+	K/-	K/-	K/-	K/-
9	BP0313	K/-	K/-	W/+	K/-	K/-
	BP0451	A/+	K/-	W/+	K/-	K/-
	BP0713	A/+	K/-	A/+	W/+	K/-
	BP0812	A/+	K/-	A/+	K/-	K/-
	BP2531	A/+	K/-	A/+	W/+	K/-
	BP2693	A/+	K/-	A/+	K/-	K/-
	BP2712	W/+	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP2813	W/-	W/+	K/-	K/-	K/-
	BP3231	A/+	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP3323	A/-	K/-	K/-	K/-	K/-
	BP3922	A/+	A/+	K/-	A/+	K/-

***หมายเหตุ

A คือ Acid = เกิดการหมักน้ำตาลเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง

K คือ Alkaline = ไม่เกิดการหมักน้ำตาล

W คือ Weakly = เกิดการหมักน้ำตาลเพียงเล็กน้อยเปลี่ยนสีอาหารจากสีแดงเป็นสีส้ม

\+ = เกิดการสร้างแก๊ส

\- = ไม่เกิดการสร้างแก๊ส

4.3.4 การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.46, 1, 3 และ 5

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหาร Starch-Casein agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.46, 1, 3 และ 5 ทำการตรวจผลโดยดูความเข้มข้นที่มีการเจริญดีที่สุดที่แอคติโนมัยซีทสามารถเจริญได้ (ดังวิธีการทดลองที่ 3.7.8)

เชื้อแอคติโนมัยซีท 39 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินป่าชายเลน สถานตากอากาศบางปูจังหวัดสมุทรปราการ ทำการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.46, 1, 3 และ 5 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจะเจริญได้ดีถึงดีมาก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.46 และ 1 คิดเป็นร้อยละ 38.46 และ 33.33 ตามลำดับ แต่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มากขึ้น พบว่ายังสามารถเจริญได้แต่ความสามารถในการเจริญจะลดน้อยลง ดังการทดลองของ Arumugam (2017)

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.46, 1, 3 และ 5

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)			
		0.46	1	3	5
1	BP15102	+	+	+	+
	BP1671	++++	++++	+++	+++
	BP1722	+++++	+++++	++++	++++
	BP2321	+++	++	++	++
	BP2461	+	-	-	-
2	BP1141	++++	+++	++++	-
	BP3792	++	+	+	+
3	BP0981	+++	++++	+	-
	BP3192	+++	++	+	-
4	BP0262	+++++	+++++	++++	++++
	BP0532	++	++	+	+
	BP1431	+++++	++++	++++	+++
	BP1832	++++	++++	+++	++
	BP2213	+++	+++	+++	++
	BP2813	+++	++++	+++	++

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการเจริญบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.46, 1, 3 และ 5 (ต่อ)

กลุ่ม	หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)			
		0.46	1	3	5
5	BP1392	+	+	++	+
6	BP0133	+++++	+++++	+++++	++++
	BP1033	+++	++	+	-
	BP30101	++++	++++	+++	+++
	BP3661	+++	++	+	-
7	BP2112	+	-	+	-
	BP3472	++	+++	++	++
	BP3543	++++	+++	++	+
8	BP0663	++++	++++	++++	+++
	BP1213	+++	+++	++++	++++
	BP1981	++++	+++	+	-
	BP2013	+	-	-	-
9	BP0313	+++++	+++++	++++	+++++
	BP0451	+++++	+++++	++++	++++
	BP0713	++	++	+	+
	BP0812	+	+	+	+
	BP2531	+	-	-	-
	BP2693	+	-	-	-
	BP2712	++	+++	+++	+++
	BP2931	++++	+++	++++	+++
	BP3231	+++	+++	++	+
	BP3323	+++	+++	+++	++
	BP3922	++++	++++	-	++

***หมายเหตุ

+++++ = เชื้อแอคติโนมมัยซีทเจริญได้ดีมาก ++++ = เชื้อแอคติโนมมัยซีทเจริญได้ดี,

+++ = เชื้อแอคติโนมมัยซีทเจริญได้ปานกลาง ++ = เชื้อแอคติโนมมัยซีทเจริญได้ดีได้น้อย

\+ = เชื้อแอคติโนมมัยซีทเจริญได้น้อยมาก - = เชื้อแอคติโนมมัยซีทเจริญไม่ได้

4.4 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น (Re-dual test)

เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลต ถูกนำมาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อทดสอบ 6 ชนิด ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 และ *Escherichia coli* ATCC 074 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Micrococcus luteus* ATCC 2374 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 746 ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธีการทดสอบขั้นต้น (ดังวิธีการทดลองที่ 3.7.9) จากการทดสอบพบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลตที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และมีจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ดังนี้

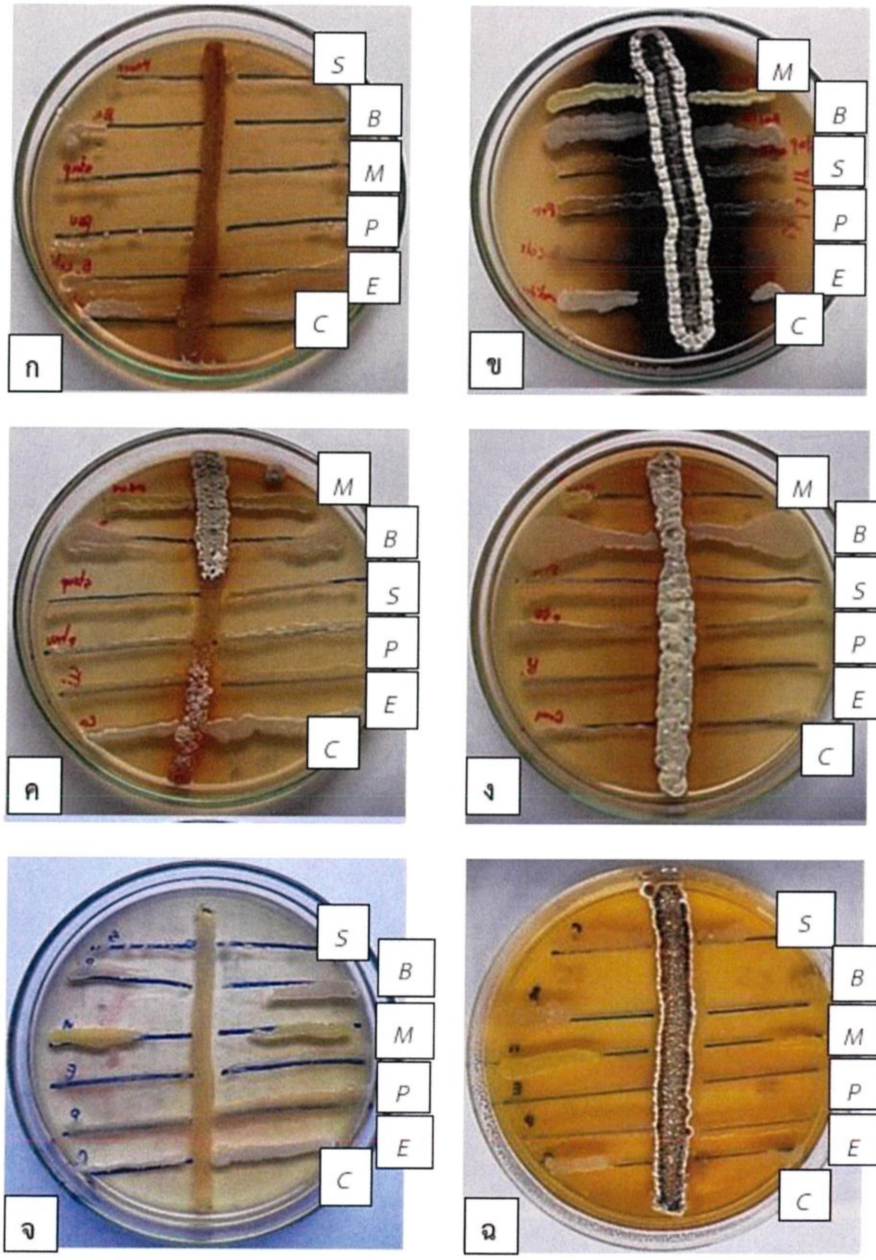
1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133 และ BP3922
2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 074 มีทั้งหมด 1 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133
3. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 1248 มีทั้งหมด 7 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133, BP1722, BP2213, BP30101, BP3472, BP3543 และ BP3922
4. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Micrococcus luteus* ATCC 2374 มีทั้งหมด 6 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133, BP1832, BP2213, BP30101, BP3543 และ BP3922
5. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 746 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133, BP3543 และ BP3922
6. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 10231 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0713 และ BP30101

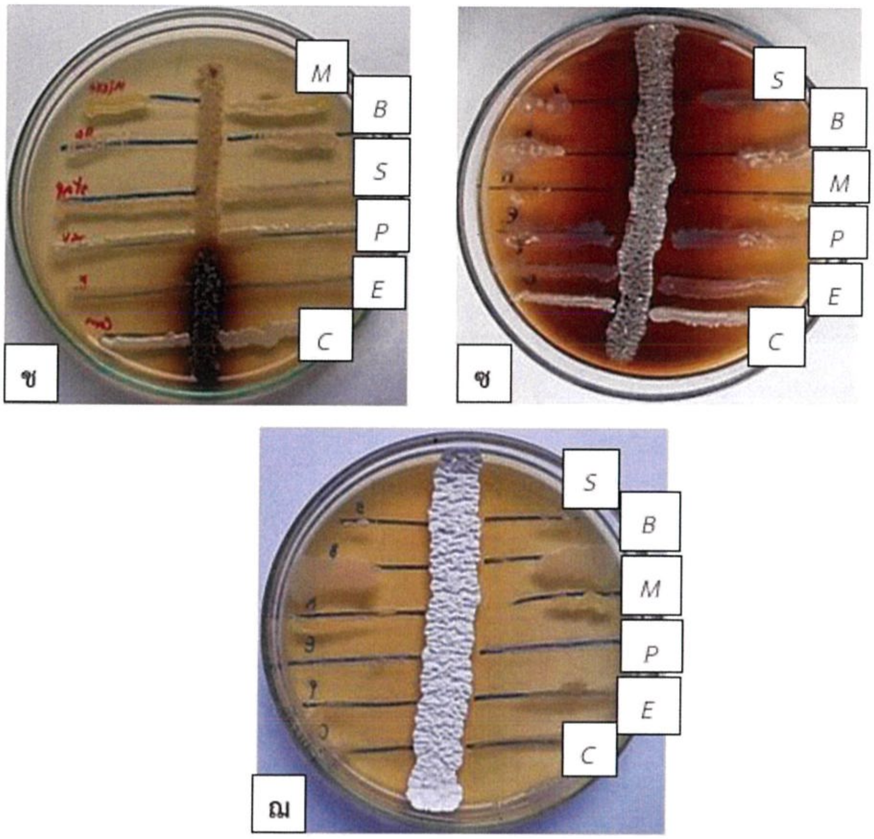
จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ได้แก่ ไอโซเลท BP0133, BP0713, BP1722, BP1832, BP2213, BP30101, BP3472, BP3543 และ BP3922 โดยผลการศึกษาพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Singh
และ คณะ(2016)

ตารางที่ 4.8 แสดงการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น (Re-dual test)

บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) / เชื้อทดสอบ			*M. luteus*	*B. subtilis*	*P. aeruginosa*	*E. coli*	*S. aureus*	*C. albicans*
หมายเลขไอโซเลท	BP0133	ซ้าย	17.12	23.13	20.00	10.00	-	-
		ขวา	19.00	27.24	25.51	10.00	-	-
	BP0713	ซ้าย	-	-	-	-	-	8.10
		ขวา	-	-	-	-	-	6.24
	BP1722	ซ้าย	-	16.20	-	-	-	-
		ขวา	-	10.12	-	-	-	-
	BP1832	ซ้าย	14.11	-	-	-	-	-
		ขวา	16.21	-	-	-	-	-
	BP2213	ซ้าย	9.22	9.20	-	-	-	-
		ขวา	7.00	7.00	-	-	-	-
	BP30101	ซ้าย	17.15	19.23	-	-	-	11.24
		ขวา	15.44	21.00	-	-	-	16.80
	BP3472	ซ้าย	-	15.31	-	-	-	-
		ขวา	-	12.00	-	-	-	-
	BP3543	ซ้าย	21.00	14.20	-	-	10.6	-
		ขวา	19.14	16.42	-	-	7.00	-
	BP3922	ซ้าย	12.52	10.30	11.60	-	16.20	-
		ขวา	15.60	12.00	13.14	-	18.00	-

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 และ *Escherichia coli* ATCC 074 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Micrococcus luteus* ATCC 2374 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 746 ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธี Modified Cross-Streak Method (วิธีการที่ 3.7.8) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทที่เกิดระยะร่น ได้แก่ ไอโซเลท BP0133, BP0713, BP1722, BP1832, BP2213, BP30101, BP3472, BP3543 และ BP3922 ดังแสดงในรูปที่ 4.41





รูปที่ 4.41 แอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ได้

หมายเลขไอโซเลท

ก : BP0133, ข : BP0713, ค : BP1722, ง : BP1832, จ : BP2213, ฉ : BP30101,ช : BP3472, ซ : BP3543, ฌ : BP3922

จุลินทรีย์ทดสอบ

M : *Micrococcus luteus* ATCC 2374, B : *Bacillus subtilis* ATCC 1248,

S : *Staphylococcus aureus* ATCC 746, P : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370,

E : *Escherichia coli* ATCC 074, C : *Candida albicans* ATCC 10231

4.5 การทดสอบกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

จากการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 6 ชนิด แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 และ *Escherichia coli* ATCC 074 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Micrococcus luteus* ATCC 2374 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 746 ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231 ด้วยวิธี Re-dual test พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ จากนั้นนำมาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract- malt extract broth ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 เป็นเวลา 18 วัน ทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion (ดังวิธีการทดลองที่ 3.7.10) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 3 ไอโซเลทจากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ดังนี้

4.5.1 แอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท (ดังตารางที่ 4.8)

1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 มีทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท BP0133
2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 746 มีทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท BP0133
3. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 10231 มีทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท BP2213

4.5.2 แอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จากสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล (ดังตารางที่ 4.9) ไม่พบไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

ตารางที่ 4.9 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักในชั้นของเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion

หมายเลขไอโซเลท	บริเวณยับยั้ง (mm)					
	M. luteus	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*C. albicans*
BP0133	-	-	-	9.24	10.30	-
BP0713	-	-	-	-	-	-
BP1722	-	-	-	-	-	-
BP1833	-	-	-	-	-	-
BP2213	-	-	-	-	-	16.13
BP30101	-	-	-	-	-	-
BP3472	-	-	-	-	-	-
BP3543	-	-	-	-	-	-
BP3922	-	-	-	-	-	-

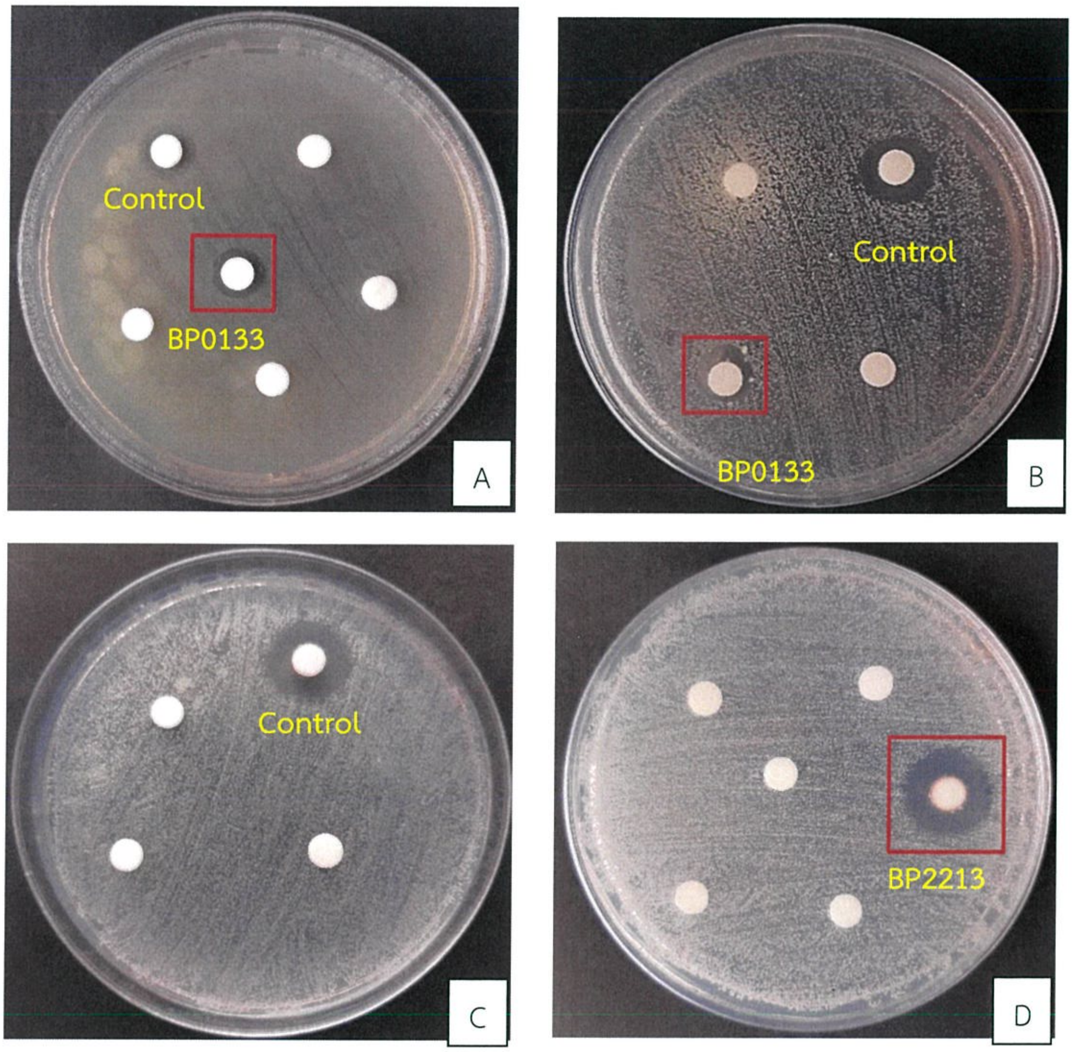
***หมายเหตุ : รวมขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางแผ่นทดสอบ ขนาด 6.0 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.10 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวเซลล์ในชั้นของ เมทานอล ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar disc diffusion

หมายเลขไอโซเลท	บริเวณยับยั้ง (mm)					
	M. luteus	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*C. albicans*
BP0133	-	-	-	-	-	-
BP0713	-	-	-	-	-	-
BP1722	-	-	-	-	-	-
BP1833	-	-	-	-	-	-
BP2213	-	-	-	-	-	-
BP30101	-	-	-	-	-	-
BP3472	-	-	-	-	-	-
BP3543	-	-	-	-	-	-
BP3922	-	-	-	-	-	-

***หมายเหตุ : รวมขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางแผ่นทดสอบ ขนาด 6.0 มิลลิเมตร

จากการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 6 ชนิดด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลท ได้แก่ BP0133 และ BP2213 จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีฤทธิ์ยับเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ดังแสดงในรูปที่



รูปที่ 4.42 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี Agar disc diffusion

เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ A : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370, B : *Staphylococcus aureus* ATCC 746, C ,D : *Candida albicans* ATCC 10231

ทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งด้วยวิธี Dual test เชื้อจะมีการสร้างสาร Primary metabolite ที่เกิดจากการเผาผลาญสารอาหารที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (Jha, 2015) ขณะที่การทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion และ Agar well diffusion เป็นสารสกัดที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตตามปกติ เป็นสารที่เกิดจากการทำงานเพื่อรักษาสภาพเซลล์ สร้างกลไกป้องกัน โดยทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะและผลิตเม็ดสี เรียกว่า Secondary metabolite (Krishna, 1996)

4.6 การทดสอบกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar well diffusion

จากการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 6 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 และ *Escherichia coli* ATCC 074 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 1248, *Micrococcus luteus* ATCC 2374 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 746 ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ จากนั้นนำมาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract- malt extract broth ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 เป็นเวลา 18 วัน ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion (ดังวิธีการทดลองที่ 3.7.10) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทจากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทและชั้นเมทานอลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ดังนี้

4.6.1 แอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท

1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133 และ BP3922
2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 074 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP30101 และ BP3543
3. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 1248 มีทั้งหมด 4 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP1722, BP30101, BP3543 และ BP3922
4. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Micrococcus luteus* ATCC 2374 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133, BP3472 และ BP3922
5. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 746 มีทั้งหมด 6 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133, BP1722, BP1832, BP3472, BP3543 และ BP3922
6. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 10231 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP2213, BP30101 และ BP3922

ตารางที่ 4.11 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักในชั้นของเอทิลอะซิเตท ที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar well diffusion

หมายเลขไอโซเลท	บริเวณยับยั้ง (mm)					
	M. luteus	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*C. albicans*
BP0133	10.13	-	-	11.21	12.14	-
BP0713	-	-	-	-	-	-
BP1722	-	18.30	-	-	7.32	-
BP1833	-	-	-	-	9.70	-
BP2213	-	-	-	-	-	18.00
BP30101	-	17.23	16.12	-	-	15.62
BP3472	13.31	-	-	-	17.0	-
BP3543	-	12.50	9.12	-	9.34	-
BP3922	9.22	12.41	-	11.04	12.00	8.00

หมายเหตุ : รวมขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง cork borer ขนาด 6.0 มิลลิเมตร

4.6.2 แอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จากสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล

1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133, BP3543 และ BP3922

2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 074 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP02213 และ BP3543

3. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในกำรยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 1248 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP1722, BP2213 และ BP3922

4. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Micrococcus luteus* ATCC 2374 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP3472 และ BP3543

5. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 746 มีทั้งหมด 5 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133, BP1832, BP3472, BP3543 และ BP3922

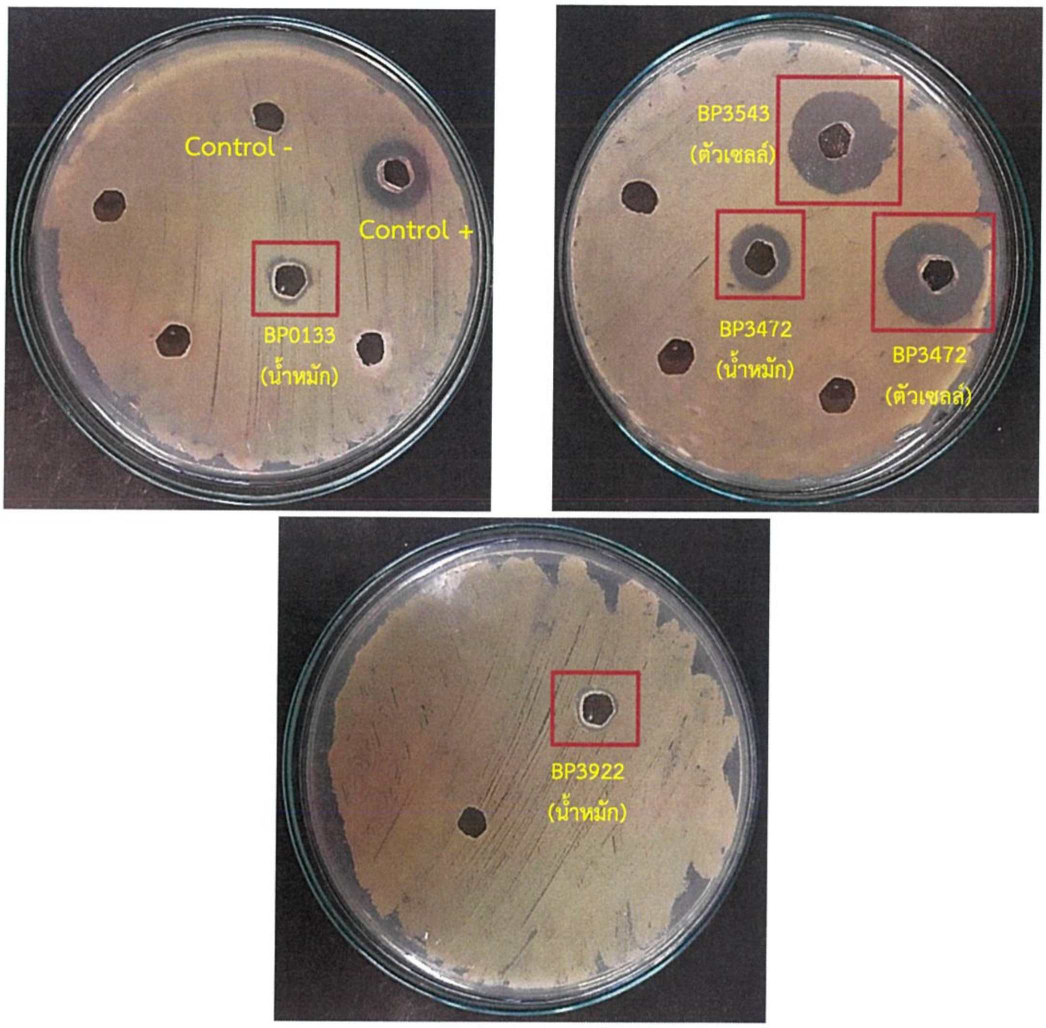
6. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 10231 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วยไอโซเลท BP0713, BP2213 และ BP3922

ตารางที่ 4.12 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวเซลล์ในชั้นของ เมทานอลที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลท ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเทคนิค Agar well diffusion

หมายเลขไอโซเลท	บริเวณยับยั้ง (mm)					
	M. luteus	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*C. albicans*
BP0133	-	-	-	9.23	9.00	-
BP0713	-	-	-	-	-	8.3
BP1722	-	21.42	-	-	-	-
BP1833	-	-	-	-	10.11	-
BP2213	-	15.34	12.20	-	-	15.13
BP30101	-	-	-	-	-	-
BP3472	21.24	-	-	-	30.02	-
BP3543	20.30	19.31	17.52	8.00	15.14	-
BP3922	-	-	-	13.42	10.14	12.33

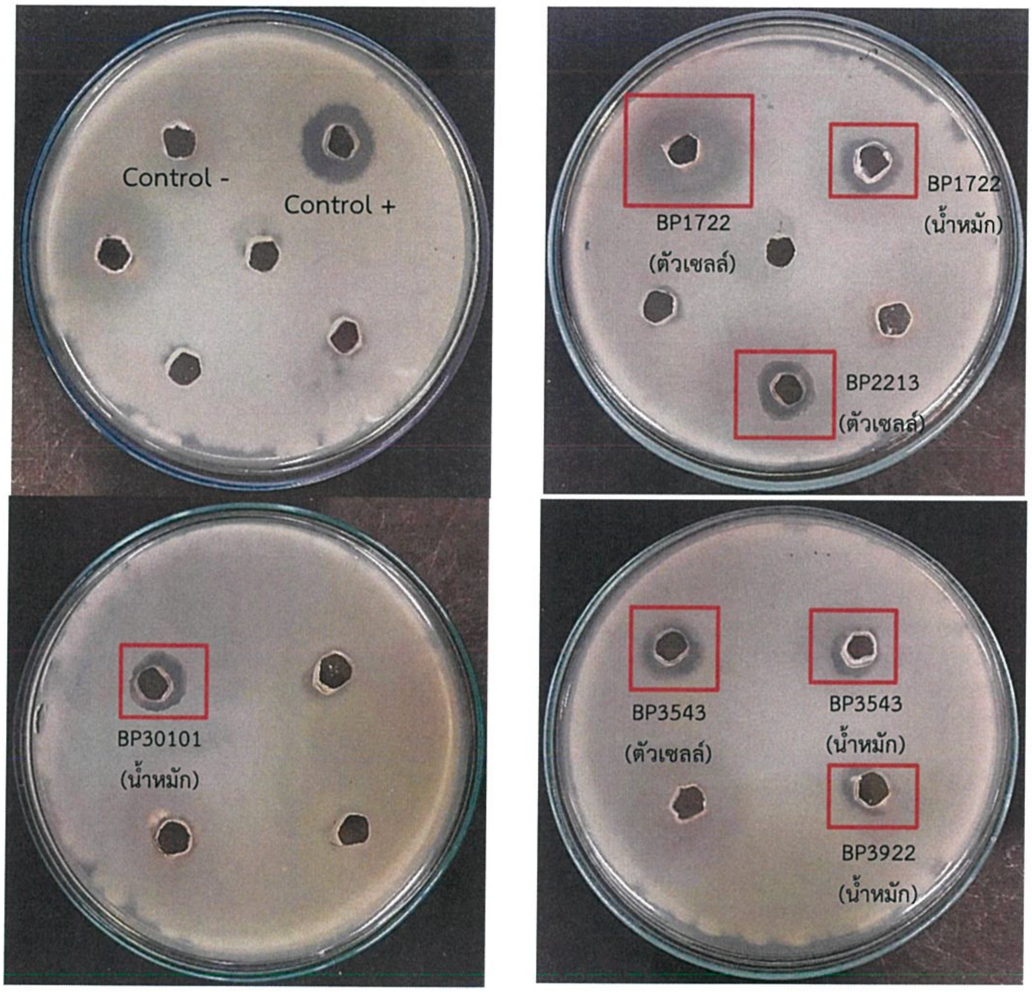
หมายเหตุ : รวมขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง cork borer ขนาด 6.0 มิลลิเมตร

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านทานทางชีวภาพด้วยวิธี Agar well diffusion สารสกัดหยาบจากน้ำหมักและสารสกัดหยาบจากตัวเซลล์ของไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 2374 ได้แก่แอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0133, BP3472, BP3543 และ BP3922 ดังรูปที่ 4.43



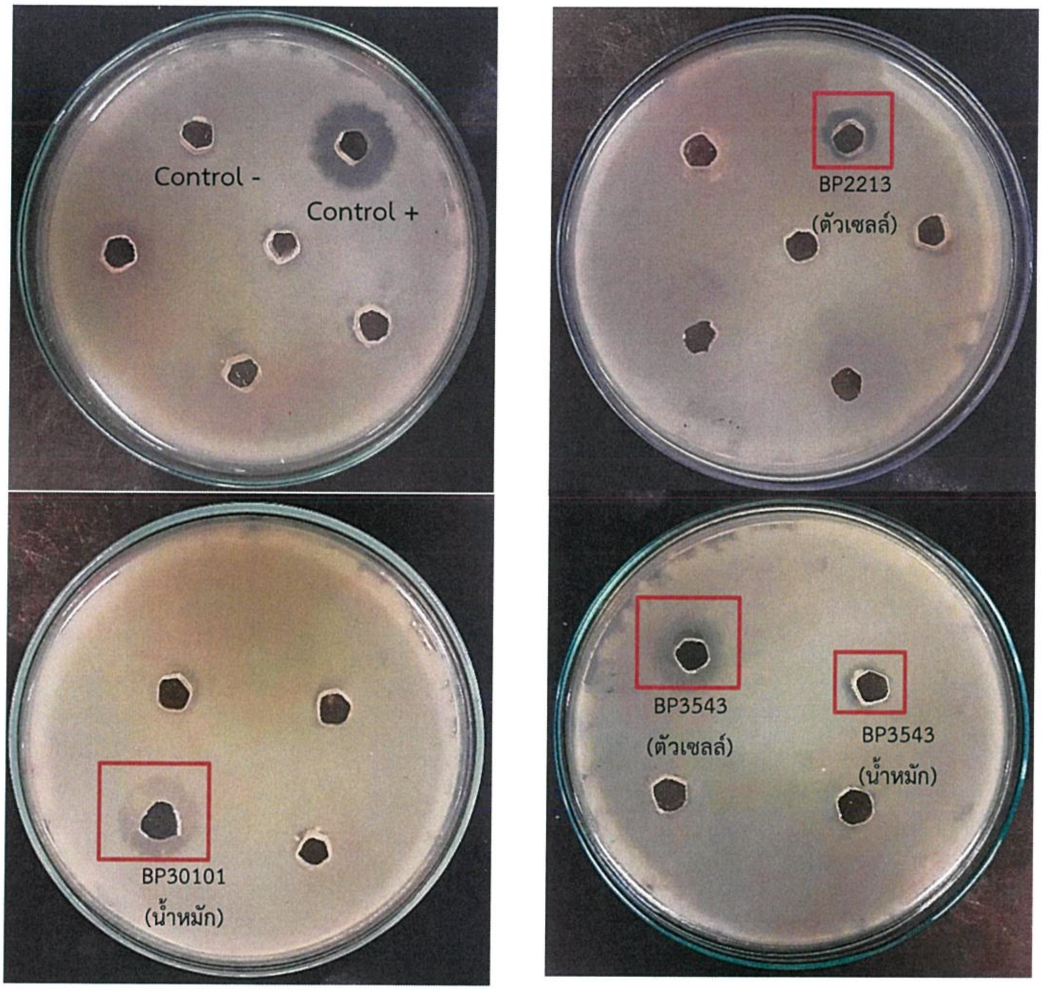
รูปที่ 4.43 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 2374ของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมัก และตัวเซลล์ในชั้นของเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านทานทางชีวภาพด้วยวิธี Agar well diffusion สารสกัดหยาบจากน้ำหมักและสารสกัดหยาบจากตัวเซลล์ของไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 1248 ได้แก่ แอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP1722, BP2213, BP30101, BP3543 และ BP3922 ดังรูปที่ 4.44



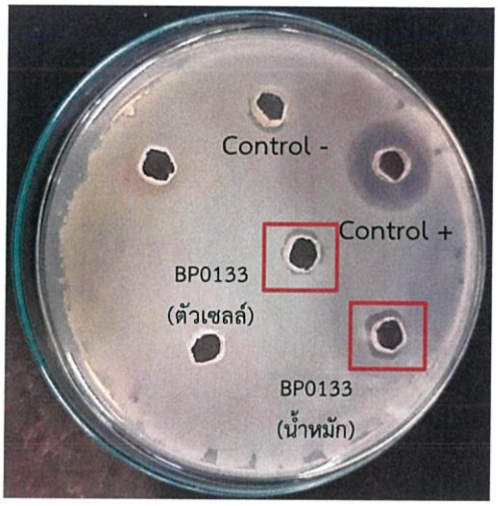
รูปที่ 4.44 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 1248 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักและตัวเซลล์ในชั้นของเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

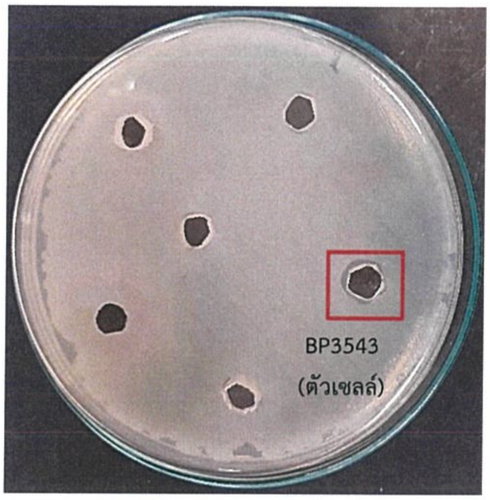
จากการทดสอบฤทธิ์การต้านทานทางชีวภาพด้วยวิธี Agar well diffusion สารสกัดหยาบจากน้ำหมักและสารสกัดหยาบจากตัวเซลล์ของไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 074 ได้แก่ แอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP2213, BP30101 และ BP3543 ดังรูปที่ 4.45



รูปที่ 4.45 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 074 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมัก และตัวเซลล์ในชั้นของเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

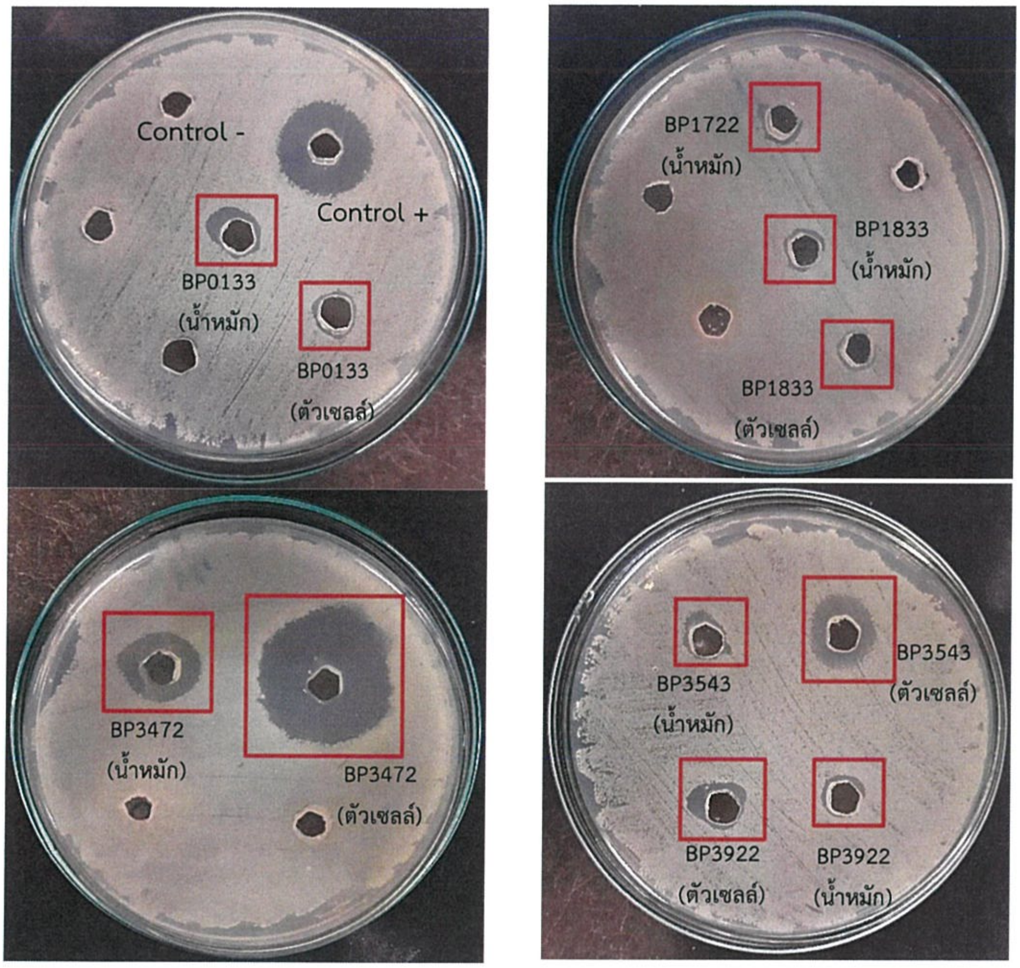
จากการทดสอบฤทธิ์การต้านทานทางชีวภาพด้วยวิธี Agar well diffusion สารสกัดหยาบจากน้ำหมักและสารสกัดหยาบจากตัวเซลล์ของไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 ได้แก่ แอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0133, BP3543 และ BP3922 ดังรูปที่ 4.46





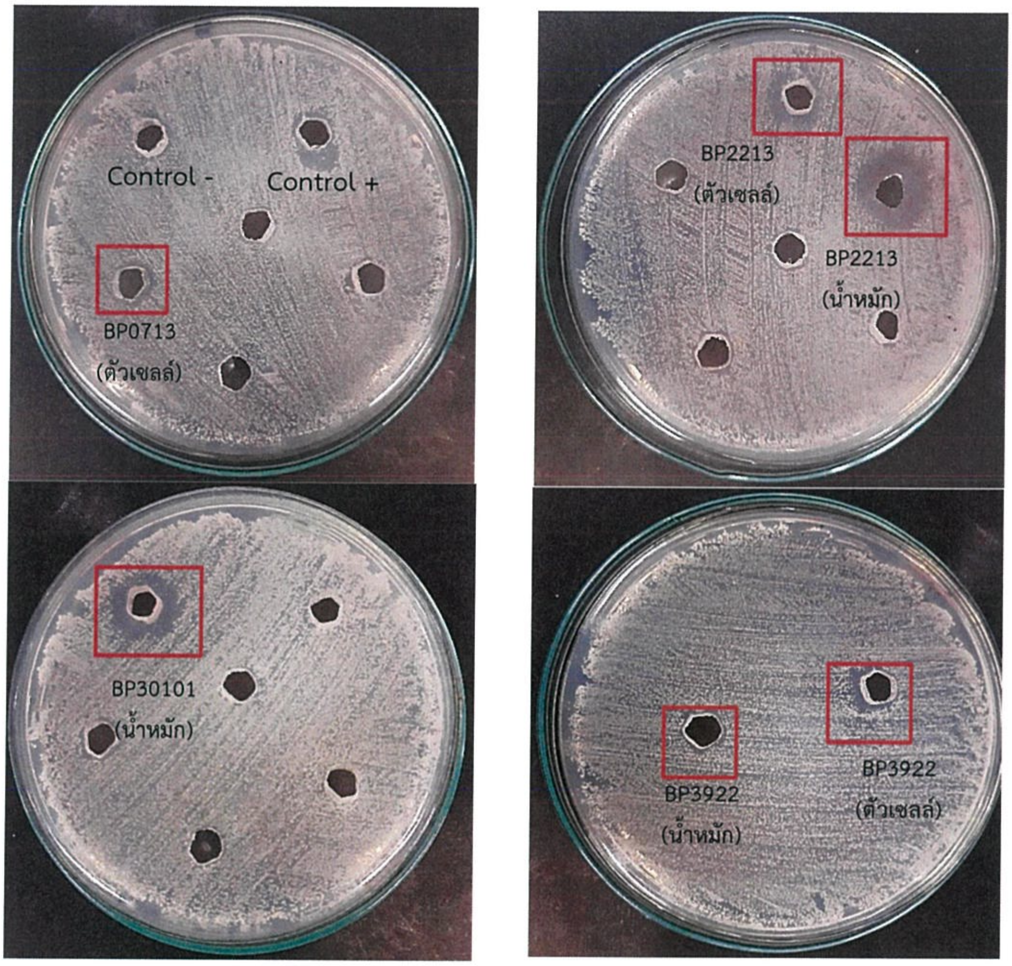
รูปที่ 4.46 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมัก และตัวเซลล์ ในชั้นของเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านทานทางชีวภาพด้วยวิธี Agar well diffusion สารสกัดหยาบจากน้ำหมักและสารสกัดหยาบจากตัวเซลล์ของไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 746 ได้แก่ แอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP0133, BP1722, BP1833, BP3472, BP3543 และ BP3922 ดังรูปที่ 4.47



รูปที่ 4.47 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 746 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมัก และตัวเซลล์ ในชั้นของเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านทานทางชีวภาพด้วยวิธี Agar well diffusion สารสกัดหยาบจากน้ำหมักและสารสกัดหยาบจากตัวเซลล์ของไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้แก่ แอคติโนมัยซีทไอโซเลท BP07133, BP2213, BP30101 และ BP3922 ดังรูปที่ 4.48



รูปที่ 4.48 บริเวณยับยั้ง ของเชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมัก และตัวเซลล์ในชั้นของเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากการทดสอบแอคติโนมัยซีททั้งหมด 9 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ด้วยวิธี Re-dual test, Agar disc diffusion และ Agar well diffusion พบว่าแอคติโนมัยซีทมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากที่สุด เมื่อเทียบกับความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและการยับยั้งยีสต์ โดยปรากฏการณ์ยับยั้งสูงสุดต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 746 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yu *et al*. (2015) สาเหตุที่แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเนื่องจากความแตกต่างทางองค์ประกอบของผนังเซลล์ดัง ดังงานวิจัยของ Singh (2016) ที่กล่าวไว้ว่า การออกฤทธิ์ของแอคติโนมัยซีทจะมีกลไกในการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ โดยในแบคทีเรียแกรมบวกจะไม่มีโครงสร้างของชั้นไขมัน แต่ในแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของเพปติโดไกลแคนที่บางและมีชั้นไขมันที่หนา ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ แบคทีเรียแกรมบวกจึงถูกยับยั้งได้ง่ายกว่า

ทำการทดลองด้วยวิธี Agar well diffusion จากสารสกัดหยาบโดยใช้เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ดังงานวิจัยของRamesha *et al*. (2013) ซึ่งเมทานอลเป็น negative control พบว่าเมาทานอลไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ขณะที่สารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตทอาจมีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Borquaye *et al*. (2016)

การทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion และ Agar well diffusion เป็นการทดสอบเพื่อดูระยะการแพร่ของสารเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี Agar disc diffusion เป็นวิธีที่มีการยอมรับได้มากกว่า เนื่องจากแผ่นดิสก์ มีขนาด 6 มิลลิเมตร ที่แน่นอน เมื่อทำการหยดสารสกัดจะทำให้การแพร่มีเส้นผ่านศูนย์กลางที่สม่ำเสมอ ทำให้สะดวกต่อการตีความของผลลัพธ์ (Balouiri, 2015) ขณะที่วิธี Agar well diffusion ถึงแม้ในการทดลองจะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้สูงกว่า แต่เนื่องจากวิธีนี้มีข้อเสียคือ ผลของการปิเปตสารลงไปในอาหารโดยตรง ทำให้การแพร่ของสารมีขนาดวงใสที่ไม่แน่นอน แต่วิธีนี้เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก (Holder and Boyce, 1994)

4.7 ผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยการใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

ในการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทเริ่มจากการคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีความโดดเด่นในการสร้างสารปฏิชีวนะจำนวน 9 ไอโซเลต ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง YEME สูตรปกติและอาหารแข็ง YEME ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 นำไปทำการสกัดฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (ดังวิธีการทดลองที่ 3.7.12) ใช้ออโต้ปิเปตดูดสารที่ได้มาสปอตลงบนแผ่น TLC ครั้งละ 2 ไมโครลิตร และเว้นจุดแรกไว้เพื่อทำการหยด standard 3 ชนิด ได้แก่ L-α phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt from egg yolk lecithin (PG), 3-sn phosphatidylethanolamine from bovine brain (PE) และ cardiolipin sodium salt from bovine heart (CL) เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ สามารถอธิบายได้ ดังรูปที่ 4.50 ซึ่งเปรียบเทียบจุด unknown spot กับ standard ที่หยดไว้ซึ่งจะเกิดสปอต 3 จุดเรียงกันได้แก่ CL, PE และ PG จุดที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำไปใช้เป็นจุดอ้างอิงและระบุชนิดของสารตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษา (Klunbut, 2013) แต่ไม่จำเป็นว่าจุดสปอตของสารตัวอย่างที่เกิดขึ้นจะตรงกับจุดอ้างอิง

ผลจากการทำ TLC และฉีดพ่นด้วยสารละลาย molybdenum blue spray reagent ทิ้งไว้ 2-3 นาทีจะเห็นจุดสีฟ้าเกิดขึ้นบนแผ่น TLC ที่ได้จากการสปอตสารตัวอย่างของไอโซเลต BP0133, BP0713, BP1722, BP1832, BP2213, BP30101, BP3472, BP3543 และ BP3922 พบว่า 4 ไอโซเลท ได้แก่ BP0133, BP1832, BP3543 และ BP3922 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG และ ตำแหน่ง CL อีก 5 ไอโซเลท ได้แก่ BP0713, BP1722, BP2213, BP30101 และ BP3472 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG แต่ไม่พบ ในตำแหน่ง CL ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลท BP1722 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG และ unknow spot ที่คาดว่าจะเป็น PS และ อนุพันธ์ของ PE แต่ไม่สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด CL สร้าง pigment ที่ละลายน้ำ ซึ่งการเกิดจุดสปอตของสารที่สกัดได้เปรียบเทียบกันระหว่างการเลี้ยงบนอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมเกลือจะเกิดจุดสปอตที่เข้มกว่าไม่เติมเกลือ แสดงว่าเกลือส่งผลให้ปริมาณชีวมวลของเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มมากขึ้น

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยไอโซเลท BP1832 และ BP2213

ไอโซเลท BP1832 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG, CL และ unknow spot ที่คาดว่าจะเป็น PS และ อนุพันธ์ของ PE โดย PG ได้เปลี่ยนไปเป็น CL เกือบหมดโดยเหลือ PE มากกว่า ซึ่งการเกิดจุดสปอตของสารที่สกัดได้เปรียบเทียบกันระหว่างการเลี้ยงบนอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเกลือไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเติมเกลือจะเกิดจุดสปอตที่เข้มกว่าเติมเกลือ

ไอโซเลท BP2213 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG และ unknow spot ที่คาดว่าจะเป็น อนุพันธ์ของ PE และ PS (ในสภาวะที่ไม่มีการเติมเกลือ) แต่ไม่พบฟอสโฟลิปิดชนิด CL ซึ่งการเกิดจุดสปอตของสารที่สกัดได้เปรียบเทียบกันระหว่างการเลี้ยงบนอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเกลือไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเติมเกลือจะเกิดจุดสปอตที่เข้มกว่าเติมเกลือ

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยไอโซเลท BP0133 และ BP30101

ไอโซเลท BP0133 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG, CL และ unknow spot ที่คาดว่าจะเป็น PS, อนุพันธ์ของ PE และ PI (ในสภาวะที่มีการเติมเกลือ) โดย PG ได้เปลี่ยนไปเป็น CL บางส่วน ซึ่งการเกิดจุดสปอตของสารที่สกัดได้เปรียบเทียบกันระหว่างการเลี้ยงบนอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมเกลือจะเกิดจุดสปอตที่เข้มกว่าไม่เติมเกลือ แสดงว่าเกลือส่งผลให้ปริมาณชีวมวลของเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มมากขึ้น

ไอโซเลท BP30101 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG และ unknow spot ที่คาดว่าจะเป็น อนุพันธ์ของ PE แต่ไม่พบชนิด CL ซึ่งการเกิดจุดสปอตของสารที่สกัดได้เปรียบเทียบกันระหว่างการเลี้ยงบนอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมเกลือจะเกิดจุดสปอตที่เข้มกว่าไม่เติมเกลือ แสดงว่าเกลือส่งผลให้ปริมาณชีวมวลของเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มมากขึ้น

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยไอโซเลท BP3472 และ BP3543

ไอโซเลท BP3472 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG และ unknow spot ที่คาดว่าจะเป็นอนุพันธ์ของ PE แต่ไม่พบชนิด CL ซึ่งการเกิดจุดสปอตของสารที่สกัดได้เปรียบเทียบกันระหว่างการเลี้ยงบนอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมเกลือจะเกิดจุดสปอตที่เข้มกว่าไม่เติมเกลือ แสดงว่าเกลือส่งผลให้ปริมาณชีวมวลของเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มมากขึ้น

ไอโซเลท BP3543 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG, CL และ unknow spot ที่คาดว่าจะเป็น PS, อนุพันธ์ของ PE และ PI (ในสภาวะที่เติมเกลือ) โดย PG ได้เปลี่ยนไปเป็น CL บางส่วน ซึ่งการเกิดจุดสปอตของสารที่สกัดได้เปรียบเทียบกันระหว่างการเลี้ยงบนอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมเกลือจะเกิดจุดสปอตที่เข้มกว่าไม่เติมเกลือ แสดงว่าเกลือส่งผลให้ปริมาณชีวมวลของเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มมากขึ้น

กลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยไอโซเลท BP0713 และ BP3922

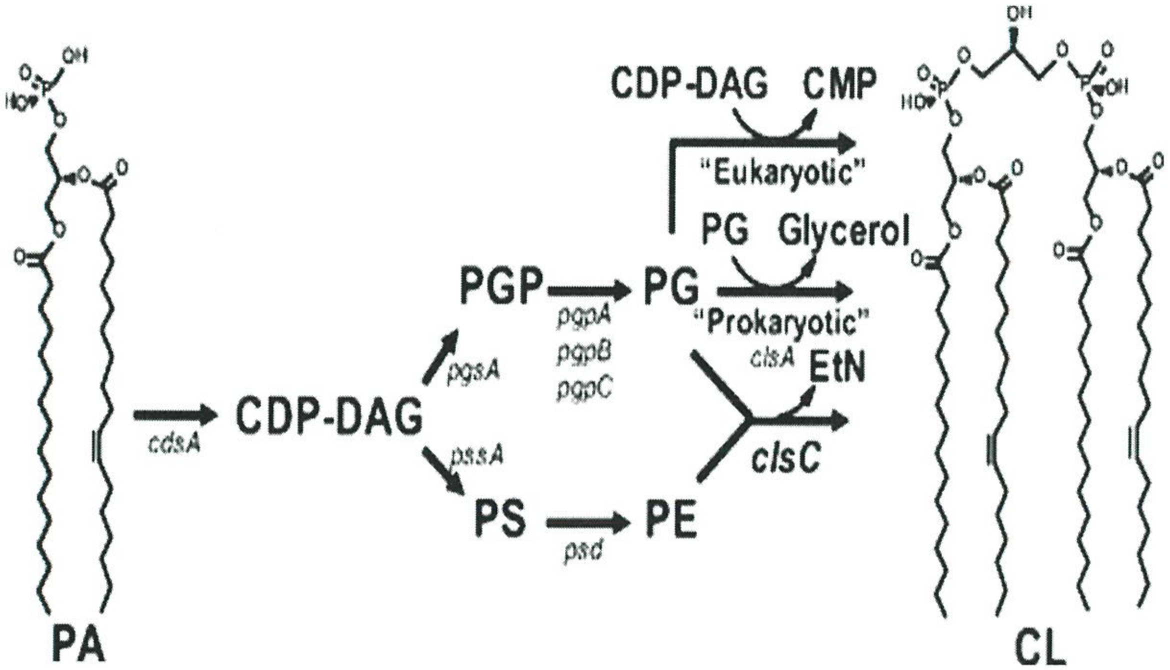
ไอโซเลท BP0713 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG และ unknow spot ที่คาดว่าจะเป็น PS, อนุพันธ์ของ PE และ PI แต่ไม่พบชนิด CL ซึ่งการเกิดจุดสปอตของสารที่สกัดได้เปรียบเทียบกันระหว่างการเลี้ยงบนอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเติมเกลือจะเกิดจุดสปอตที่เข้มกว่าไม่เติมเกลือ แสดงว่าเกลือส่งผลให้ปริมาณชีวมวลของเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มมากขึ้น

ไอโซเลท BP3922 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE (ในสภาวะที่เติมเกลือ), PG และ CL พบ unknow spot ที่คาดว่าจะเป็น PS (ในสภาวะที่ไม่เติมเกลือ) และ พบอนุพันธ์ของ PE จากผลการทดสอบพบว่าในสภาวะที่ไม่เติมเกลือ PG จะเปลี่ยนเป็น CL จนหมด ซึ่งการเกิดจุดสปอตของสารที่สกัดได้เปรียบเทียบกันระหว่างการเลี้ยงบนอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเกลือไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเติมเกลือจะเกิดจุดสปอตที่เข้มกว่าเติมเกลือ แสดงว่าเกลือไม่มีผลต่อปริมาณชีวมวลของเชื้อแอคติโนมัยซีท

การศึกษาฟอสโฟลิปิด หากเชื้อมีการเจริญเติบโตที่ดีในช่วง log phase จะมีการสร้างฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆออกมา โดยเมื่อเชื้อแอคติโนมัยซีทมีการเจริญเติบโตที่ดีมักจะพบฟอสโฟลิปิดชนิด Cardiolipin (CL) ซึ่งจากการทดลองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar (YEME) ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 และไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่มีการสร้างฟอสโฟลิปิดที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 แสดงให้เห็นถึงการสร้างเส้นใยที่เพิ่มขึ้น มีผลดีต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาปฏิชีวนะ ซึ่งฟอสโฟลิปิดที่สำคัญที่มักจะพบในแอคติโนมัยซีทคือ Cardiolipin (CL), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) โดยเฉพาะ Cardiolipin ที่จะพบบริเวณการแตกกิ่งก้านของเส้นใย นอกจากนั้นได้พบฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylserine (PS) และPhosphatidylinositol (PI) หมายถึงการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งในอาหารที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 และไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดได้เกือบทุกชนิด

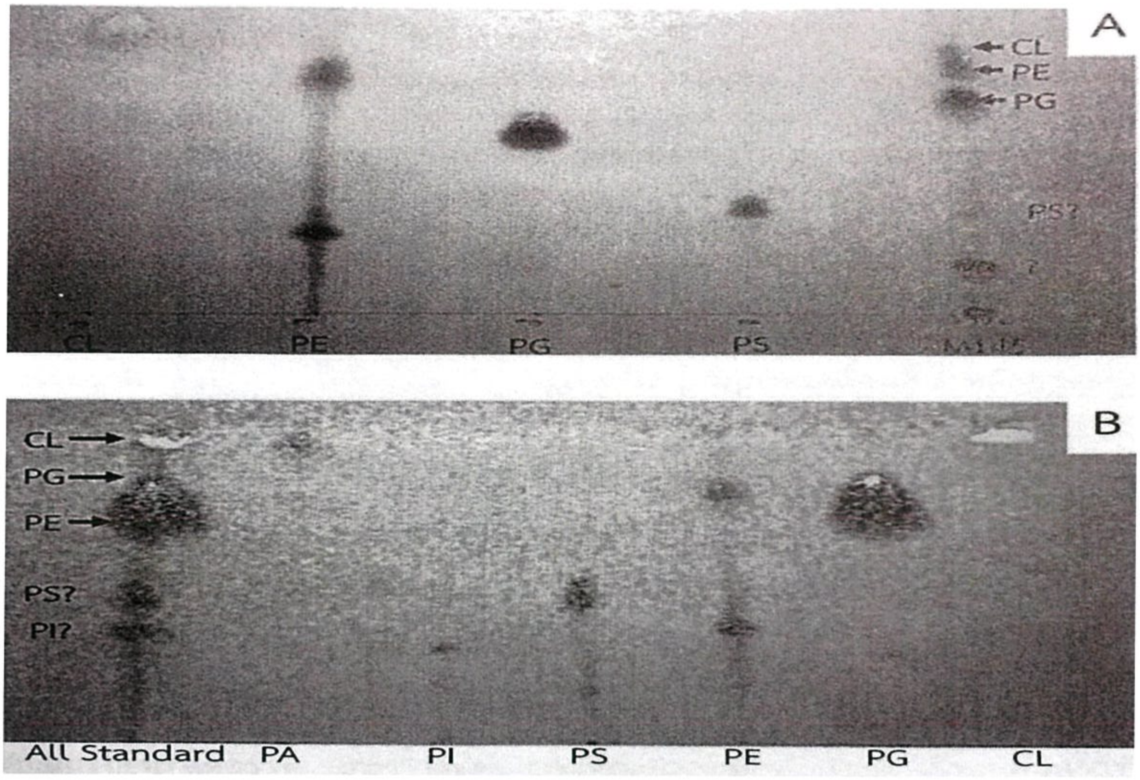
จากการศึกษาฟอสโฟลิปิดพบว่า ฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG) และ Phosphatidylethanolamine (PE) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างฟอสโฟลิปิดอีกชนิดหนึ่ง ที่มีความซับซ้อนมากกว่า คือ Cardiolipin (CL) ซึ่งการพบ CL ช่วยบอกถึงความสามารถในการแตกแขนงของเส้นใย เนื่องจากการสร้าง CL จะเกิดขึ้นในช่วง mid log phase ไปจนถึงช่วง early stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่แอคติโนมัยซีทกำลังสร้างเส้นใย การแตกแขนงกิ่งก้านของเส้นใยในปริมาณมากจะทำให้สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากยิ่งขึ้น (Jyothikumer *et al.*, 2012)

การสร้างฟอสโฟลิปิดในแบคทีเรีย พบว่า PG และ PE เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ CL ดังรูป ที่ 4.49 ดังนั้นการเกิดสปอตของ CL หมายถึงการเปลี่ยน PG และ PE ไปเป็น CL เนื่องจากการสร้าง CL ต้องอาศัยสารตัวกลางเป็น PG และ PE เท่านั้น (Tan *et al.*, 2012)



รูปที่ 4.49 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องและวิถีการสังเคราะห์คาร์ดิโอลิปินในแบคทีเรีย (Tan *et al.*, 2012)

ทำการทดลองโดยอ้างอิงจากการทดลองของ Klanbut (2013) ที่ได้ศึกษาการสร้าง CL, PE และ PG โดยการเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทบนอาหารแข็ง และศึกษาฟอสโฟลิปิดโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography พบว่าทำให้เห็นสปอตของฟอสโฟลิปิดที่ชัดเจนดังรูปที่ 4.5

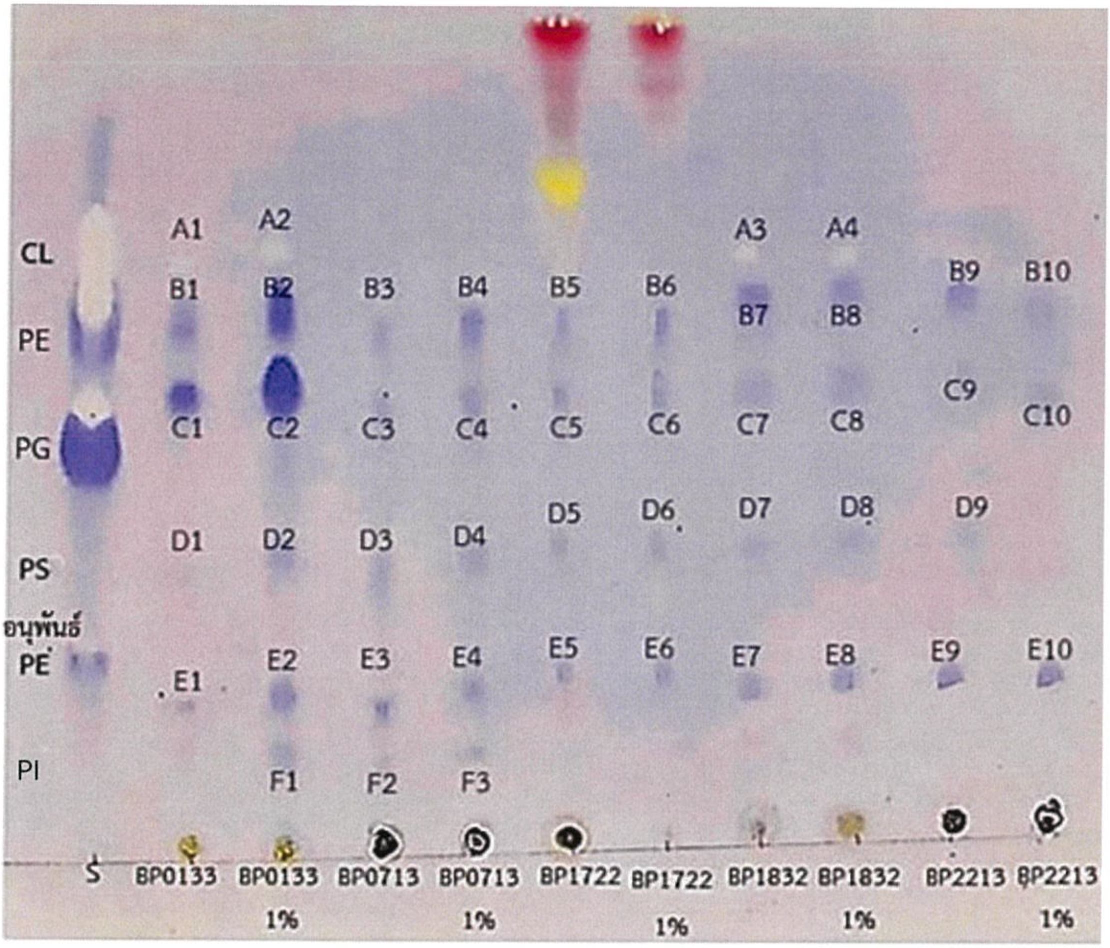


รูปที่ 4.50 ผลของการทำ Thin layer chromatography

A: แผ่นโครมาโทกราฟีที่มีการ spot phospholipid ที่เป็นสารตัวอย่างของ *S. coelicolor* สายพันธุ์ M145 ในระยะ mid-log phase (ช่องที่ 5) และ phospholipid standard ที่ต้องการศึกษา ได้แก่ phosphatidic acid (PA), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) (ช่องที่ 1,2,3,4) จากนั้นปล่อยให้สาร developed ในสารละลาย chloroform/methanol/acetic acid/water ในอัตราส่วน 80:12:15:4 ตามลำดับ แล้วสังเกตช่องของสารตัวอย่างเทียบกับ standard จะพบว่าสารตัวอย่างมีฟอสโฟลิปิดชนิด PE (เทียบกับ standard จะมี 2 จุด) PS และ PG จะจางกว่า standard และ CL จะเกิดเป็นจุดสีขาวอยู่บนสุดเมื่อนำมาเทียบตาม standard

B: แผ่นโครมาโทกราฟีที่มีการ spot ของ phospholipid standard ทั้ง 6 ชนิด คือ phosphatidic acid (PA), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) โดยนำมาละลายใน ethanol ความเข้มข้น 5 mg/ml โดยช่องที่ 1 เป็นการ spot phospholipid standard ทั้ง 6 ชนิดภายในจุดเดียว ส่วนในช่องที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เป็นการ spot phospholipid standard แบบแยกจุดสปอต (Klanbut, 2013)

ผลการทำ TLC และฉีดพ่นด้วยสารละลาย molybdenum blue spray reagent ทิ้งไว้ 2-3 นาทีจะเห็นจุดสีฟ้าเกิดขึ้นบนแผ่น TLC ที่ได้จากการสปอตสารตัวอย่างของไอโซเลท BP0133, BP0713, BP1722, BP1832 และ BP2213 พบว่า ไอโซเลท BP0133 และ BP1832 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG และสปอตในตำแหน่ง CL ไอโซเลท BP0713, BP1722 และ BP2213 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG แต่ไม่พบสปอตในตำแหน่ง CL

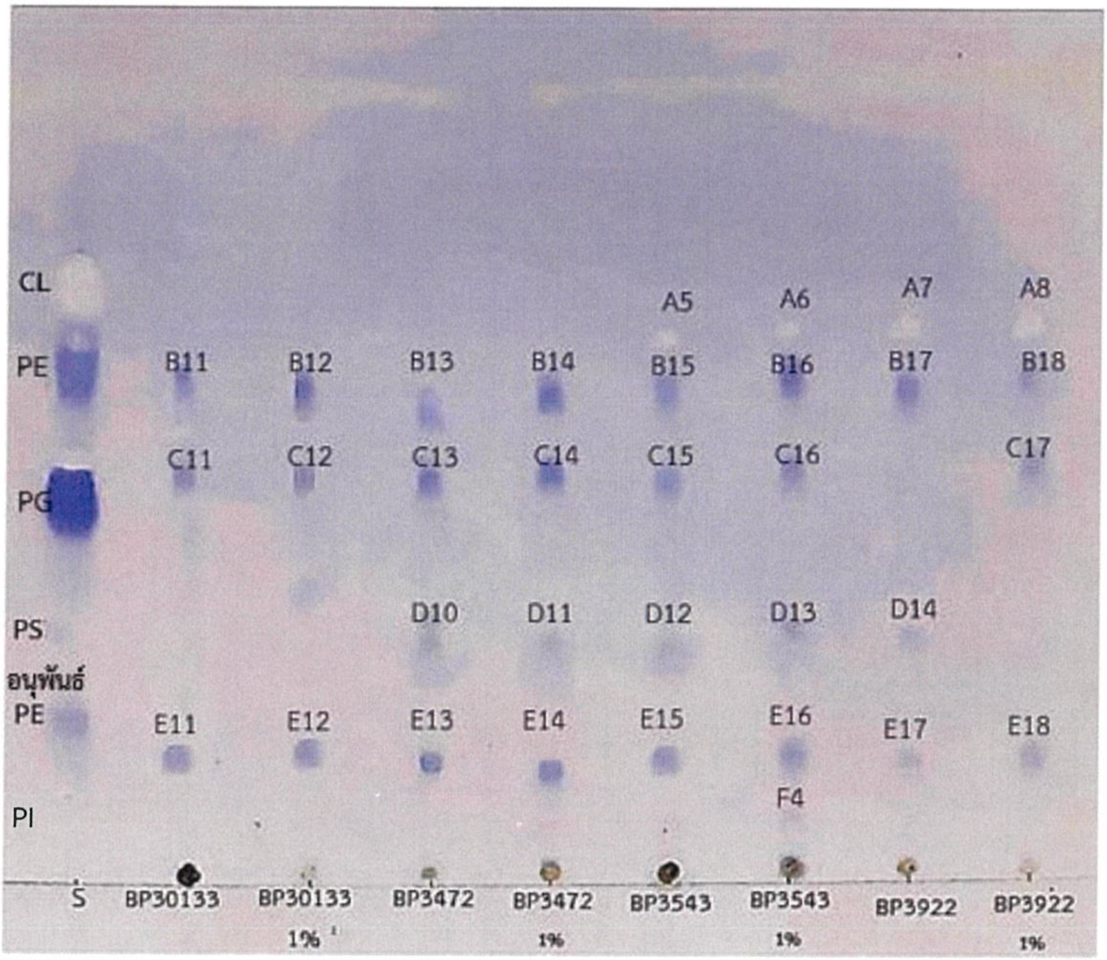


รูปที่ 4.51 แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโทกราฟีเทียบกับสาร standard ผลจากการทำ thin layer chromatography เพื่อศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทในระยะ log phase ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ของเชื้อ 5 ไอโซเลต ได้แก่ BP0133, BP0713, BP1722, BP1832 และ BP2213

***หมายเหตุ

PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylserine อ้างอิงจากงานวิจัยของ Klanbut (2013)

ผลการทำ TLC และฉีดพ่นด้วยสารละลาย molybdenum blue spray reagent ทิ้งไว้ 2-3 นาทีจะเห็นจุดสีฟ้าเกิดขึ้นบนแผ่น TLC ที่ได้จากการสปอตสารตัวอย่างของไอโซเลท BP30101, BP3472, BP3543 และ BP3922 พบว่าไอโซเลท BP3543 และ BP3922 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG และ CL ไอโซเลท BP30101, BP3472 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG แต่ไม่พบ สปอตในตำแหน่ง CL



รูปที่ 4.52 แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโทกราฟีเทียบกับสาร standard ผลจากการทำ thin layer chromatography เพื่อศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีท ในระยะ log phase ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ของเชื้อ 4 ไอโซเลต ได้แก่ BP30101, BP3472, BP3543 และ BP3922

***หมายเหตุ

PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylserine อ้างอิงจากงานวิจัยของ Klanbut (2013)

โครมาโทกราฟีอาศัยหลักการละลายของสารในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ โดยสารที่ต้องการนำมาแยกโดยวิธีนี้จะมีสมบัติการละลายในตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน และตัวถูกดูดซับจะดูดซับได้ไม่เท่ากัน ทำให้สารเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน การเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารแต่ละชนิดในตัวทำละลาย และความสามารถในการดูดซับที่มีต่อสารนั้น กล่าวคือสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดี และถูกดูดซับน้อยจะถูกเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง ถ้าใช้ตัวดูดซับมากๆจะสามารถแยกสารออกจากกันได้

ในการคำนวณค่า rate of flow (Rf) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากบริเวณที่ได้ทำการ spot สารตัวอย่าง เทียบกับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (solvent front) โดยใช้ mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม กรดอะซิติก เมทานอล น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:15:12:4 สารแต่ละชนิดจะมีค่า Rf คงที่เสมอ ดังนั้นค่า Rf จึงเป็นอีกวิธีในการใช้พิสูจน์ชนิดของสาร ในการคำนวณหาค่า Rf ของสาร ซึ่งจะหาได้จากอัตราส่วนระยะทางที่สารเคลื่อนที่เทียบกับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

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

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอคติโนมัยซีทที่ถูกคัดเลือก 9 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้น NaCl (%)	ชนิดของฟอสโฟลิปิด											
		(PG)		(PE)		(CL)		(อนุพันธ์ของ PE)		(PS)		(PI)	
		ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf
Standard	-	PG	0.63	PE	0.71	CL	0.78	PE	0.27	PS?	-	PI?	-
BP0133	-	C1	0.66	B1	0.70	A1	0.71	E1	0.19	D1	0.35	-	-
	1	C2	0.70	B2	0.70	A2	0.73	E2	0.21	D2	0.36	F1	0.16
BP0713	-	C3	0.54	B3	0.68	-	-	E3	0.18	D3	0.36	F2	0.15
	1	C4	0.65	B4	0.68	-	-	E4	0.20	D4	0.36	F3	0.15
BP1722	-	C5	0.64	B5	0.68	-	-	E5	0.20	D5	0.37	-	-
	1	C6	0.63	B6	0.68	-	-	E6	0.21	D6	0.37	-	-
BP1832	-	C7	0.66	B7	0.70	A3	0.73	E7	0.21	D7	0.37	-	-
	1	C8	0.65	B8	0.70	A4	0.71	E8	0.21	D8	0.37	-	-
BP2213	-	C9	0.66	B9	0.70	-	-	E9	0.21	D9	0.36	-	-
	1	C10	0.65	B10	0.70	-	-	E10	0.21	-	-	-	-

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอคติโนมัยซีทที่ถูกคัดเลือก 9 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	ความเข้มข้น NaCl (%)	ชนิดของฟอสโฟลิปิด											
		(PG)		(PE)		(CL)		(อนุพันธ์ของ PE)		(PS)		(PI)	
		ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf	ตำแหน่ง	ค่า Rf
standard	-	PG	0.67	PE	0.74	CL	0.87	PE	0.21	PS?	-	PI?	-
BP30101	-	C11	0.63	B11	0.72	-	-	E11	0.17	-	-	-	-
	1	C12	0.63	B12	0.72	-	-	E12	0.17	-	-	-	-
BP3472	-	C13	0.60	B13	0.71	-	-	E13	0.16	D10	0.39	-	-
	1	C14	0.64	B14	0.72	-	-	E14	0.16	D11	0.39	-	-
BP3543	-	C15	0.64	B15	0.73	A5	0.76	E15	0.17	D12	0.39	-	-
	1	C16	0.66	B16	0.73	A5	0.76	E16	0.18	D13	0.39	F4	0.13
BP3922	-		0.63	B17	0.72	A7	0.75	E17	0.17	D14	0.40	-	-
	1	C17	0.65	B18	0.72	A8	0.75	E18	0.17	-	0.40	-	-

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลน สถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลต เก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มทั้งหมด 10 จุด โดยบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินที่สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 7-8 มีค่าน้ำหนักสารแขวนลอยเฉลี่ยของดินอยู่ที่ 0.744 กรัม ความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 41.32 เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร International Streptomyces Project พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจะมีการเจริญและสร้างสปอร์ในระยะเวลา 7 – 14 วัน นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทมีการสร้างสีของเส้นใยอากาศ สีของเส้นใยอาหาร และสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์และแบ่งกลุ่มได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม (ดังตารางที่ 4.3)

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Brown มีสมาชิกทั้งหมด 5 ไอโซเลท ประกอบด้วย BP15102, BP1671, BP1722, BP2321 และ BP2461

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Orange Yellow มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย BP1141 และ BP3792

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish Brown มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย BP0981 และ 3192

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellow มีสมาชิกทั้งหมด 7 ไอโซเลท ประกอบด้วย BP0262, BP0532, BP1431, BP1832, BP2213, BP2913 และ BP3851

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Greenish Yellow มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลท ได้แก่ BP1392

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Green มีสมาชิกทั้งหมด 4 ไอโซเลท ประกอบด้วย BP0133, BP1033, BP30101 และ BP3661

กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Blue มีสมาชิกทั้งหมด 3 ไอโซเลท ประกอบด้วย BP2112, BP3472 และ BP3543

กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Purple มีสมาชิกทั้งหมด 4 ไอโซเลท ประกอบด้วย BP0663, BP1213, BP1981 และ BP2013

กลุ่มที่ 9 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Neutral มีสมาชิกทั้งหมด 11 ไอโซเลท ประกอบด้วย BP0313, BP0451, BP0713, BP0812, BP2531, BP2693, BP2712, BP2831, BP3231, BP3323 และ BP3922

ทำการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าความสามารถในการย่อยโปรตีนในอาหาร Skim milk agar ร้อยละ 20.51 ให้ผล [+] คือ สามารถย่อยสลายโปรตีนเกิดเป็นเคลียโซนใสรอบโคโลนี การทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเจลาตินพบว่าแอคติโนมัยซีทร้อยละ 38.46 ให้ผล [+] คือสามารถสร้างเอนไซม์ Gelatinase ออกมาย่อยสลายเจลาตินได้ การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท พบว่าร้อยละ 61.54ให้ผล [+] คือ สามารถย่อยสลายไนเตรทได้ การทดสอบความสามารถในการย่อย

สลายแป้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทพบว่าร้อยละ 58.97 ให้ผล [+] คือ สามารถย่อยสลายแป้งได้ จะเกิดเคลียโซนใสเมื่อทดสอบกับไอโอดีน ทดสอบความสามารถการหมักน้ำตาลของเชื้อแอคติโนมัยซีท ในน้ำตาลกลูโคสพบว่าร้อยละ 76.92 ได้ผล A/+ หรือ W/+ แสดงถึงความสามารถในการหมักน้ำตาลได้และเกิดก๊าซจากการหมัก ในน้ำตาลซูโครสพบร้อยละ 23.08 ในน้ำตาลแลคโตสพบร้อยละ 5.13 ในน้ำตาลไซโลสพบร้อยละ 48.72 และในน้ำตาลมานิทอล พบว่าไม่มีไอซเลทที่สามารถหมักน้ำตาลได้

ทดสอบความสามารถการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.46, 1, 3 และ 5 พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ0.46 และ 1 สามารถเจริญได้ดีถึงดีมาก คิดเป็นร้อยละ 38.46 และ 33.33 ตามลำดับ

ในการทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแอคติโนมัยซีทในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Micrococcus luteus* ATCC 2374, *Bacillus subtilis* ATCC 1248 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 746 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 และ *Escherichia coli ATCC* 074 ยีสต์ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 10231 พบว่าแอคติโนมัยซีททั้งหมด 39 ไอโซเลต มีเพียง 9 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ ได้แก่ ไอโซเลท BP0133, BP0713, BP1722, BP1832, BP2213, BP30101, BP3472, BP3543 และ BP3922 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้จำนวน 8 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อยีสต์ได้ 2 ไอโซเลท

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลทที่ให้ผลมีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดสอบด้วยวิธี Dual test (ดังตารางที่ 4.7) แอคติโนมัยซีททั้ง 9 ไอโซเลทถูกนำมาเลี้ยงต่อเพื่อสกัดสารทุติยภูมิที่เชื้อสร้างขึ้น ทำการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ดีที่สุดมีขนาด 16.13 มิลลิเมตร และจากการทดสอบวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดจากตัวเซลล์ในชั้นเมทานอลที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แอคติโนมัยซีทไอโซเลต BP1722 ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 1248 ได้ดีที่สุด โดยโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นมีขนาด 21.42 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074 พบว่าแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BP3543 ให้ผลการยับยั้งเชื้อดีที่สุดจากตัวเซลล์ โดยโซนยับยั้งมีขนาด 17.52 มิลลิเมตร แอคติโนมัยซีทไอโซเลต BA3472 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC 2374 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้สูงสุดจากตัวเซลล์ พบว่ามีโซนยับยั้งถึง 21.24 มิลลิเมตร และ 30.02 มิลลิเมตรตามลำดับ สำหรับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2370 พบว่าแอคติโนมัยซีทไอโซเลต BP3922 ให้ผลการยับยั้งเชื้อดีที่สุดจากตัวเซลล์โดยโซนยับยั้งมีขนาด 13.42 มิลลิเมตร และแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้ดีที่สุดจากน้ำหมัก พบว่าเป็นไอโซเลต BP2213 ซึ่งให้ผลยับยั้งการเจริญขนาด 18.00 มิลลิเมตร (ดังตารางที่ 4.10 และ 4.11)

จากการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอคติโนมัยซีท 9 ไอโซเลต ประกอบไปด้วยไอโซเลต BP0133, BP0713, BP1722, BP1832, BP2213, BP30101, BP3472, BP3543 และ BP3922 ที่เลี้ยงในอาหาร YEME สูตรปกติ และอาหาร YEME ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า 4 ไอโซเลต ได้แก่ BP0133, BP1832, BP3543 และ BP3922

สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylglycerol (PG) และ Cardiolipin (CL) และพบว่า 5 ไอโซเลท ได้แก่ BP0713, BP1722, BP2213, BP30101 และ BP3472 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด PE, PG แต่ไม่พบในตำแหน่ง CL แอคติโนมัยซีททุกไอโซเลทพบจุดสปอตของอนุพันธ์ PE อีกทั้งยังพบฟอสโฟลิปิดที่คาดว่าน่าจะเป็นชนิด Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylinositol (PI) อ้างอิงตำแหน่งจากงานวิจัยของ Klunbut (2013)

จากการศึกษาฟอสโฟลิปิดพบว่า ฟอสโฟลิปิดชนิด Phosphatidylglycerol (PG) และ Phosphatidylethanolamine (PE) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างฟอสโฟลิปิดอีกชนิดหนึ่งที่มีความซับซ้อนมากกว่า คือ Cardiolipin (CL) ซึ่งการพบ CL จะช่วยบอกถึงความสามารถในการแตกแขนงของเส้นใย เนื่องจากการสร้าง CL จะเกิดขึ้นในช่วง mid log phase ไปจนถึงช่วง early stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่แอคติโนมัยซีทกำลังสร้างเส้นใย การแตกแขนงของกิ่งก้านของเส้นใยในปริมาณมากจะทำให้สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากยิ่งขึ้น (Jyothikumar *et al.*, 2012)

จากข้อมูลที่ได้ทำการศึกษา ทำให้ทราบว่าดินตัวอย่างจากดินป่าชายเลน บริเวณสถานตากอากาศบางปู จังหวัด สมุทรปราการ เป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญแห่งหนึ่ง ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี ซึ่งเหมาะสำหรับการวิจัยค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารทุติยภูมิได้ จึงควรศึกษาวิจัยต่อเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทถึงระดับโมเลกุล และสปีชีส์

5.2.2 การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียวคลอไรด์ร้อยละ 1 จึงควรมีการศึกษาถึงสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ ชนิดของอาหาร รวมถึงปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัยซีท

5.2.3 การศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสกัดฟอสโฟลิปิดต่างๆ ของแอคติโนมัยซีทได้ จึงควรเพิ่มชนิดของฟอสโฟลิปิดมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบเพื่อช่วยในการจำแนกเอกลักษณ์ของ Unknow spot ได้

5.3.4 การพบ cardiolipin ในช่วงกลางของการเจริญ mid log phase ถึง early stationary phase อาจนำมาทำการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อควบคุมการแตกกิ่งก้านของแอคติโนมัยซีทให้ผลิตชีวมวล (biomass) ให้มากขึ้น เนื่องจากการแตกกิ่งก้านของแอคติโนมัยซีทจะทำให้ปริมาณของสารทุติยภูมิมากขึ้นตาม ซึ่งนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน. 2555. “ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน Biodiversity of Actinobacteria in Soil”. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

กุสุมา บ่วงราบ, เกศแก้ว พูลรักษา, วงศกร พงศ์โสภิตานันท์, ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์ ,มนตรี แสงลาภเจริญกิจ, ภัครพล พูลสุขโข และเอก แสงวิเชียร. 2557. “ การแยกและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแอคติโนแบคทีเรียทนความร้อนจากไลเคน”. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ชยานันต์ แก้วมีบุญ, ชัญญา พิทักษ์กิจเลขา, สุทิตา อ่อนน่วมน้อย, ธเนศ อินตัน, สมจิตร พงศ์ประเสริฐ,ทินกร สานัก, วิสัย คงแก้ว และสหัส ราชเมืองขวาง. 2559. “ป่าชายเลน”. นิสิตฝึกงาน สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร สถานีวิจัยเพื่อการพัฒนาชายฝั่งอันดามัน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัฎฎากาญน์ สิงห์โตทอง. 2557. “การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากพืชบางชนิดในมหาวิทยาลัยศิลปากรและคุณสมบัติทางชีวภาพ”. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ชัยสิทธิ์ นิยะสม. 2554. “การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณมหาวิยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง”. มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ทายาท ศรียาภัย, กัญจน์ ศิลป์ประสทิธิ์ , อรินทม์ งามนิยม, และ พิชาภัค ศรียาภัย. 2558. “การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์เพื่อใช้ในการเตรียมสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพและพัฒนาสูตรหัวเชื้อผงสำหรับควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคข้าว”. วารสารวนศาสตร์ 34 (2) : 51-61 (2558)

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจน์ และ ปรีชา สุวรรณพินิจน์. 2541. “**อาหารเลี้ยงเชื้อ และการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ จุลชีววิทยาทั่วไป**”. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นวลรัตน์ หนูขาว. 2554. “การคัดแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Ralstonia solanacearum ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ”. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

นุกูล อินทระสังขา และ ชัยสิทธิ์ นิยะสม. 2554. “การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินบริเวณมหาวิทยาลัย ทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง”. สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาทักษิณ.

พงชัย หาญยุทธนากร. 2555. **Triacylglycerol และ phospholipid**. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา. มปป. *Bacillus subtilis.* [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1226/bacillus. ค้นเมื่อวันที่ 17 พฤษภาคม พ.ศ. 2561.

พูลศรี วันธงไชย, วรวุฒิ พิทักษ์สันติกุล, นวพร สุญาณเศรษฐกร, ปวีณา เชื้อผู้ดี. (2556). “**กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งส่วนกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งส่วนส่งเสริมและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนสำนักอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน**”. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์พลอยมีเดีย.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2548. “การเก็บรวบรวมและตรวจหา Actinomycetes จากดินป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารยับยั้งทางจุลชีพ”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา.

ลักษมี ศุภระกาญจนะ. 2556.“ การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ”. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

วสุ ปฐมอารีย์. 2557. “ แอคติโนมัยซีทจากตะกอนชายฝั่งทะเลและป่าชายเลนภาคตะวันออกของไทยและความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ”. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิพัฒน์ หันบัญญัติ และเอกภพ สกุลกิจกาญจ์. 2549. “การตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากป่าชายเลน”. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. 2554. “การดื้อยาต้านจุลชีพ : ความสำคัญต่อระบบสุขภาพ”. ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. มปป. “*Streptomyces* spp : แบคทีเรียคุณค่าสูงจากธรรมชาติ”. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และหน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งมหาวิทยาลัยมหดลิ และมหาวิทยาลัยโอซาก้า (MU-OU:CRC) คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหดล.

ศรีสกุล ชนะพันธ์. 2553. “การแยกและคัดกรองเชื้อเอ็นโดไฟติคแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการประยุกต์ใช้”. สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ศิริรัตน์ ทองอุ่น. 2552. “การคัดกรองสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล”. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศูนย์วิจัยป่าไม้. 2553. **รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการการจำแนกเขต การใช้ประโยชน์ที่ดินป่าชายเลน**. กรุงเทพฯ : คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุขสันติ ประกอบวงษ์. 2557. “จุลชีววิทยาเบื้องต้น”. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

เสาวนิตย์ ชอบบุญ, พัชรี หลุ่งหม่าน และผจงสุข สุธารัตน์. 2559. “การพัฒนาการผลิตปุ๋ยหมักจากฟางข้าวของกลุ่มเกษตรกร ตำบลบางเขียด อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา”. ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

A.Holder and S. T. Boyce. 1994. “ Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture”. Biochemistry and Microbiology and 'Department of Surgery,

University of Cincinnati College of Medicine and 'Shriners Bums Institute, Cincinnati, OH, USA

Afaf Ahmed Elbendary a , Ashgan Mohamed Hessain b , Mahmoud Darderi El-Hariri a , Ahmed Adel Seida a , Ihab Mohamed Moussa c , Ayman Salem Mubarak c , Saleh A. Kabli d , Hassan A. Hemeg e , Jakeen Kamal El Jakee. 2017. "Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples". Saudi Journal of Biological Sciences.

Balakrishnan Meena, Lawrance Anbu Rajan, Nambali Valsalan Vinithkumar and Ramalingam Kirubagaran. 2013. "Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical byproducts". BMC Microbiology, 13:145

Efron Castro - Rodrfguez , Ivan Leon - Luna , Jose Pinedo – Hernandez. 2017. "Biogeochemistry of mangrove sediments in the Swamp of Mallorquin, Colombia". Regional Studies in Marine Science 17 38–46.

Hotam S. Chaudhary, Jayprakash Yadav, Anju R. Shrivastava, Smriti Singh, Anil K. Singh, Natrajan Gopalan. 2013. "Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India)". Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research.

Jicheng Yu, Liu Zhang, Qiu Liu, Xiaohui Qi, Ying Ji, Beom Seok Kim. 2015. "Isolation and characterization of actinobacteria from Yalujiang coastal wetland, North China". Asian Pac J Trop Biomed. 5(7) : 555–560

Jyothikumar, V., Klunbut, K., Tiong., Rouxburge, J.S, Hunter, I.S., Smith, T.K. and Herron, P.R. 2012. Cardiolipin synthase is required for Streptomyces coelicolor morphogenesis. Molecular Microbiology. 84(1): 181-197

Khanungkan Klanbut. 2013. "The role of phospholipids in the growth and development of *Streptomycetes*". Ph.D in Microbiology (SIPBS). University of Strathclyde, Glasgow, UK, 50-51.

Krishna, C. 1996. " primary versus secondary metabolites". Journal of Applied Microbiology, Vol. 25 Issues 1-2, pp1-30

M. KOCUR, ZDENA PkCOVA, and T. MARTINEC.(1972). "Taxonomic Status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872, and Designation of the Neotype Strain". INTERNATIONAL JOURNAL of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY., p. 218-223

Mukesh Sharma, Pinki Dangi and Meenakshi Choudhary. (2014). "Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications". Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci : 801-832

Lawrence Sheringham Borquaye, Godfred Darko, Novisi Oklu, Constance Anson-Yevu and Annette Ababio. 2016. "Antimicrobial and antioxidant activities of ethyl

acetate and methanol extracts of *Littorina littorea* and *Galatea paradoxa*". *Cogent Chemistry*, 2: 1161865

Mounyr Balouiri n, Moulay Sadiki,Saad Koraichilbnsouda. 2016. "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review". Journal of Pharmaceutical Analysis6 71–79

Nandkishor Jha. 2015. " Primary Metabolites, Secondary Metabolites and Bioconversions".[Online].http://www.biologydiscussion.com/biotechnology/bioprocesstechnology/primary-metabolites-secondary-metabolites-and-bioconversions/10126.

Polpass Arul Jose and Solomon Robinson David Jebakumar. 2012. "Phylogenetic diversity of actinomycetes cultured from coastal multipond solar saltern in Tuticorin, India". Department of Molecular Microbiology, School of Biotechnology, Madurai Kamaraj University, Madurai 625 021, India.

Ramesha. A, Sunitha.V. H, and C. Srinivas. 2013. "Antimicrobial activity of secondary methabolites from endophytic fungi isolated from Nerium Oleander L". Department of Studies in Microbiology & Biotechnology, Jnanabharathi Campus,Bangalore University, Bangalore. Int J Pharm Bio Sci; 4(1): (B) 683 – 693

Shuvankar Ballav, Savita Kerkar, Sabu Thomas, and Nimmy Augustine.(2014) . "Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. Journal of Bioscience and Bioengineering VOL. 119 No. 3, 323e330, 2015

Sivakumar, K. 2001. "Centre of Advanced Study in Marine Biology Annamalai University". An Inventory. Ph.D. thesis, Annamalai University, India, 91 pp.

Thangavel Arumugam, Muniappan Ayyanar, Yesudason Justin Koil Pillai and Thangavel Sekar.(2011) "Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf and callus extracts of *Centella asiatica*". Bangladesh J Pharmacol ; 6: 55-60

Thawai, C., Tanasupawat, S. and Kudo, T. 2008. "Micromonospora pattaloongensis sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58 : 1516–1521.

Vineeta Singh, Shafiul Haque, Harshita Singh, Jyoti Verma, Kumari Vibha, Rajbir Singh, Arshad Jawed and C.K.M.Tripathi.2016."Isolation, Screening, and Identification of Novel Isolates of Actinomycetes from India for Antimicrobial Applications". Microbiol, DOI: 10.3389.

Wongsakorn Phongsopitanun, Khanit Suwanborirux, and Somboon Tanasupawat.(2014). " Identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from Thai mangrove sediment". The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences 38 (1), January - March 2014: 1-56

Yuki Nakamura. (2017). "Plant PhospholipidDiversity: Emerging Functionsin Metabolism andProtein–Lipid Interactions". Institute ofPlantandMicrobial Biology.

Yang, Q., Lei, A.P., Li, F.L., Liu, L.N., Q.J. Zan, P.K.S. Shin , S.G. Cheung , N.F.Y. Tam. 2014. "Structure and function of soil microbial community in artificially planted Sonneratia apetala and S. caseolaris forests at different stand ages in Shenzhen Bay, China". Marine Pollution Bulletin. 85 : 754–763

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

1. Starch – Casein agar (Jose and Jebakumar, 2012)

Soluble starch	10.0	กรัม
KNO_3	2.0	กรัม
Casein	0.3	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	กรัม
$CaCO_3$	0.02	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7 - 7.2

2. Starch – Casein agar (สูตรผสมน้ำทะเลจริง) (Ballav *et al.*, 2014)

Soluble starch	10.0	กรัม
KNO3	2.0	กรัม
Casein	0.3	กรัม
MgSO4• 7H2O	0.05	กรัม
CaCO3	0.02	กรัม
FeSO4• 7H2O	0.01	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำทะเลจริง	500	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

pH 7 - 7.2

3. Starch – Casein agar (สูตรผสมน้ำทะเลเทียม)

Casein	1.0	กรัม
Starch	10.0	กรัม
Reef salt	37.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 7 – 7.4

4. Skim milk agar

Skim milk powder	28.0	กรัม
Casein enzymatic hydrolysate	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7 – 7.2		

5. Bouillon gelatin broth

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO_3	5.0	กรัม
Gelatin	150.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7 – 7.2		

6. Peptone KNO_3 broth

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO_3	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7 – 7.2		

7. International Streptomyces Project medium no.4 (ISP4) (ลักษมี, 2556)

Soluble starch	10.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
MgSO4• 7H2O	1.0	กรัม
$CaCO_3$	0.02	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
Trace salt solution	1.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7 - 7.2		

Trace salt solution

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.1	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

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

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

9. International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) (ลักษมี, 2556)

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

10. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (ศรีสกุล, 2553)

Dextrose	40.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 5.4-5.8		

11. Phenol Red glucose (or other sugar) broth

Trypticase (proteose peptone)	10.0	กรัม
Beef Extract	1.0	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.4		

หมายเหตุ: Sugar แต่ละชนิดเตรียมแยกหลอดกัน ได้แก่ Dextrose, Sucrose, Xylose, Lactose, Manitol

12. Muller Hinton Agar (MHA)

Beef Extract	2.0	กรัม
Acid Hydrolysate of Casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH 7.2-7.4		

13. Nutrient Agar (NA)

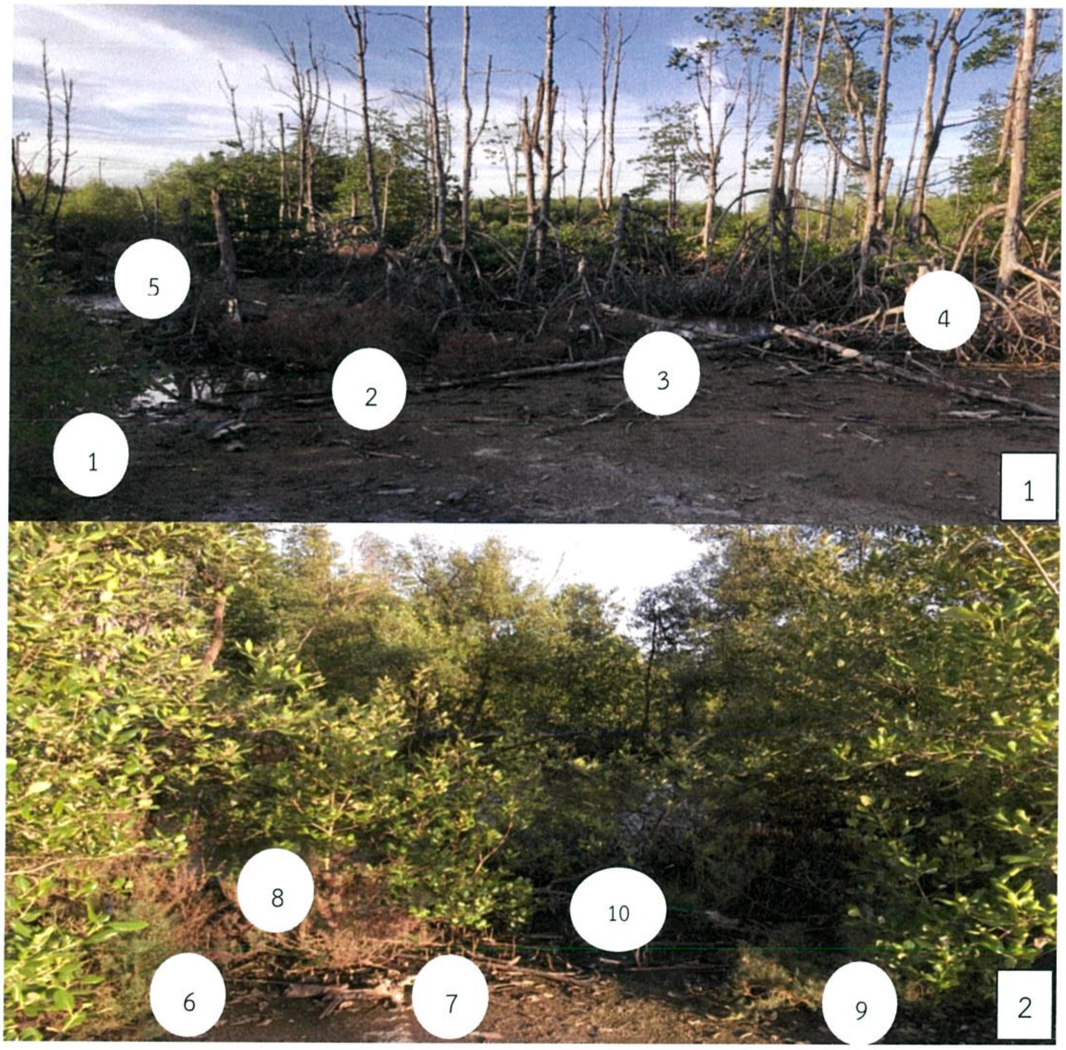
Peptone	5.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

14. Glucose Yeast Extract Agar (GYEA)

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

ภาคผนวก ข
ภาพถ่ายสถานที่เก็บตัวอย่างดิน

จุดเก็บตัวอย่างดิน 10 จุด ตำแหน่งจากสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ



รูปที่ 1(ข) แสดงถึงสภาพแวดล้อมของจุดเก็บตัวอย่างดินป่าชายเลน

(1) จุดเก็บตัวย่างจุดที่ 1- 5 เป็นดินจากป่าโกงกาง

(2) จุดเก็บตัวย่างจุดที่ 6- 10 เป็นดินจากป่าแสม

1

2

3

4

5

รูปที่ 2 (ข) แสดงถึงจุดเก็บตัวอย่างดิน จุดที่ 1-5 อยู่ในบริเวณป่าโกงกาง

6

7

8

9

10

รูปที่ 3 (ข) แสดงถึงจุดเก็บตัวอย่างดิน จุดที่ 6-10 อยู่ในบริเวณป่าแสม

ภาคผนวก ค
การคำนวณหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

ดัดแปลงมาจาก (AOAC, 1990)

วิธีการคำนวณน้ำหนักดิน

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักบีกเกอร์ และสารแขวนลอยของดินที่มีความเจือจางที่ 10^{-1} (กรัม) ก่อนอบ

น้ำหนักบีกเกอร์และดินก่อนอบ = น้ำหนักบีกเกอร์ (กรัม) + น้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่มีความเจือจางที่ 10^{-1} ก่อนอบ (กรัม)

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินที่ใช้ในการแยกเชื้อ (กรัม)

ปริมาณน้ำหนักดิน (กรัม) = น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและบีกเกอร์ก่อนอบ (กรัม) - (น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและบีกเกอร์หลังอบ (กรัม)

วีธีคำนวณหาปริมาณความชื้นในดิน

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)

น้ำหนักดินหลังอบ (กรัม) = น้ำหนักดินและบีกเกอร์หลังอบ (กรัม) - น้ำหนักบีกเกอร์ก่อนอบ (กรัม)

คำนวณหาปริมาณความชื้นในดิน (%)

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

ภาคผนวก ง
เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ (Slide culture) และการ Mount ด้วยสี Methylene blue

(บงกชกรรณ, 2550)

การศึกษาลักษณะเส้นใยของแอคติโนมัยซีท นิยมใช้เทคนิค Slide culture ในการศึกษา เนื่องจากเส้นใยจะไม่แตกหัก ทำให้สปอร์ไม่หลุดออกจากเส้นใย ซึ่งจะทำให้เราเห็นเส้นใยที่สมบูรณ์ได้ และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค wet mount ย้อมสี methylene blue เพื่อดูโครงสร้างของเส้นใยได้ง่ายขึ้น โดยเทคนิค Slide culture ทำได้โดย

1. นำสำลี คอตตอนบัด 2 อัน สไลด์และกระจกปิดสไลด์ ใส่ลงในเพลท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
2. เทอาหาร YEME สูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งให้แข็ง
3. ใช้มีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ กรีดอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดประมาณ 1×1 มิลลิเมตร
4. วางอาหารที่ตัดแล้วลงบนสไลด์ที่วางอยู่ในเพลทที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว
5. เขี่ยเชื้อแอคติโนมัยซีทวางทั้ง 4 มุมของวุ้นอาหาร และนำกระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ววางทับลงไป
6. เทน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงบนสำลี จากนั้นทำการปิดฝาเพลทและพันเพลทด้วยพาราฟิล์ม
7. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำกระจกปิดสไลด์มาย้อมด้วยสี Methylene blue และส่องใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก จ

การเตรียมสารละลาย McFarland standard No.0.5

(โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกรียติ, 2555)

สารละลาย McFarland standard No. 0.5 ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความขุ่นมาตรฐานของการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ สำหรับกิจกรรมต้านการเจริญของเชื้อ ซึ่งสารละลาย McFarland standard No. 0.5 สามารถเทียบเท่าได้กับจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.0×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (ซึ่งเทียบกับการปรับระดับความขุ่นให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.08 - 0.1 โดยทำการวัดที่ความคลื่น 624 นาโนเมตร)

ส่วนประกอบของสารละลาย McFarland standard No. 0.5

1 % v/v Conc. H_2SO_4	99.50	มิลลิลิตร
1.175 % w/v $BaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.50	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปตกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรที่มีน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลตร
2. ชั่งสารแบเรียมคลอไรด์ 1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรและทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายจากข้อ 1. ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร และสารละลายในข้อ 2. ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลาย McFarland standard No. 0.5 มาบรรจุใส่ในหลอดฝาเกลียดปิดสนิทกันการระเหย และนำไปเก็บในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 2 – 30 องศาเซลเซียส
4. ก่อนใช้งานต้องเขย่าสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน รวมทั้งตรวจสอบความขุ่นทุกเดือน โดยสารดังกล่าวนั้นมีอายุการใช้งานประมาณ 6 เดือน

ภาคผนวก ฉ

ตารางที่ 1(ฉ) ปริมาตรของน้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจาง 10^{-1}

จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักฟลอยด์ (g)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจาง 10^{-1} ก่อนอบ (g)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจาง 10^{-1} และน้ำหนักฟลอยด์ ก่อนอบ (g)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดินและบีกเกอร์ที่ความเจือจาง 10^{-1} หลังอบ (g)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจาง 10^{-1}หลังอบ (g)
จุดที่ 1	0.581	7.723	8.304	1.464	0.883
จุดที่ 2	0.622	7.391	8.013	1.311	0.689
จุดที่ 3	0.588	7.427	8.015	1.091	0.503
จุดที่ 4	0.599	7.769	8.368	1.168	0.569
จุดที่ 5	0.583	7.643	8.226	1.512	0.929
จุดที่ 6	0.593	7.426	8.019	1.491	0.898
จุดที่ 7	0.576	7.559	8.135	1.538	0.962
จุดที่ 8	0.575	7.736	8.311	1.662	1.087
จุดที่ 9	0.554	7.556	8.110	1.476	0.922
จุดที่ 10	0.557	7.614	8.171	1.477	0.920

ตารางที่ 2(ฉ) ปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินที่หายไป หลังจากนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักดินคงที่

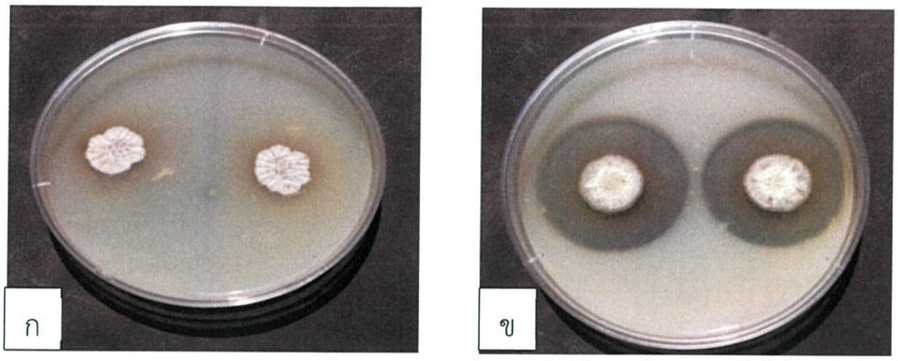
จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักบีกเกอร์ (g)	น้ำหนักดินก่อนอบ (g)	น้ำหนักดินและบีกเกอร์หลังอบ (g)	น้ำหนักดินหลังอบ (g)	น้ำหนักของน้ำ (g)	ปริมาณความชื้น (%)
จุดที่ 1	28.717	1.611	29.485	0.768	0.843	52.33
จุดที่ 2	29.092	1.722	30.097	1.005	0.717	41.64
จุดที่ 3	29.750	1.696	30.785	1.035	0.661	38.97
จุดที่ 4	29.155	1.641	30.250	1.095	0.546	33.27
จุดที่ 5	29.371	1.439	30.291	0.920	0.519	36.07
จุดที่ 6	28.960	1.287	29.810	0.850	0.437	33.95
จุดที่ 7	29.198	1.049	29.807	0.609	0.440	41.94
จุดที่ 8	36.100	1.289	36.864	0.764	0.525	40.23
จุดที่ 9	29.034	1.506	29.625	0.591	0.915	60.76
จุดที่ 10	29.081	1.221	29.887	0.806	0.415	33.99

ตารางที่ 3(ฉ) ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-เบสของตัวอย่างดิน

จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (g)	ค่าความเป็นกรดเบส			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
จุดที่ 1	2.403	7.1	7.2	7.1	7.1
จุดที่ 2	2.189	7.5	7.5	7.4	7.5
จุดที่ 3	2.453	7.5	7.6	7.6	7.6
จุดที่ 4	2.015	7.4	7.3	7.3	7.3
จุดที่ 5	2.718	7.4	7.4	7.4	7.4
จุดที่ 6	2.553	7.3	7.4	7.4	7.4
จุดที่ 7	1.998	7.1	7.3	7.1	7.2
จุดที่ 8	2.524	7.1	7.2	7.1	7.1
จุดที่ 9	2.608	7.2	7.5	7.4	7.4
จุดที่ 10	2.570	7.5	7.1	7.2	7.3

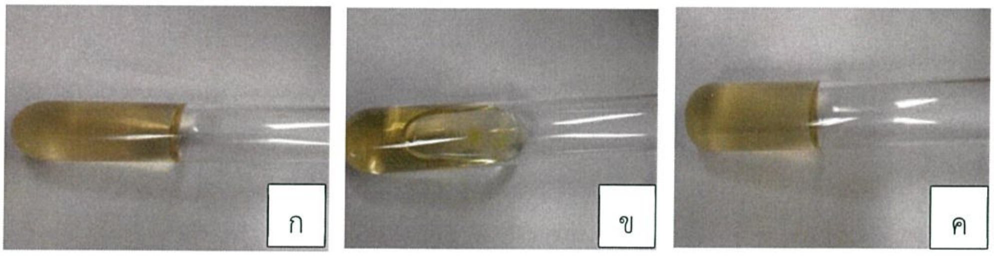
ภาคผนวก ช
ภาพแสดงตัวอย่างผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมี

1. การย่อยสลายโปรตีนในนม (Peptonizationn)



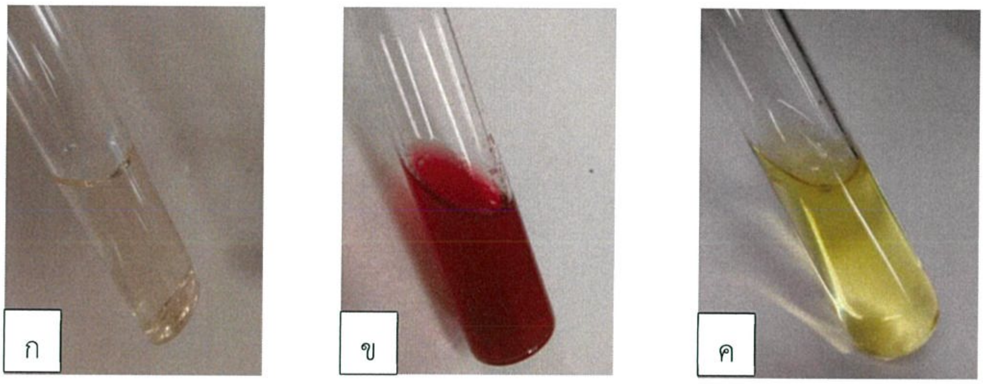
รูปที่ 1 (ช) ผลการทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในนม (Peptonizationn)
(ก) ไม่เกิดการย่อยสลายโปรตีนในนม แสดงผล -
(ข) เกิดการย่อยสลายโปรตีนในนม แสดงผล +

2. การย่อยสลายเจลาติน (Gelatinization)



รูปที่ 2 (ช) ผลการทดสอบการย่อยสลายเจลาตินในอาหาร Bouilon Gelatin broth
(ก) ชุดควบคุมการทดสอบ
(ข) เกิดการย่อยสลายเจลาติน แสดงผล +
(ค) ไม่เกิดการย่อยสลายเจลาติน แสดงผล –

3. การย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction)



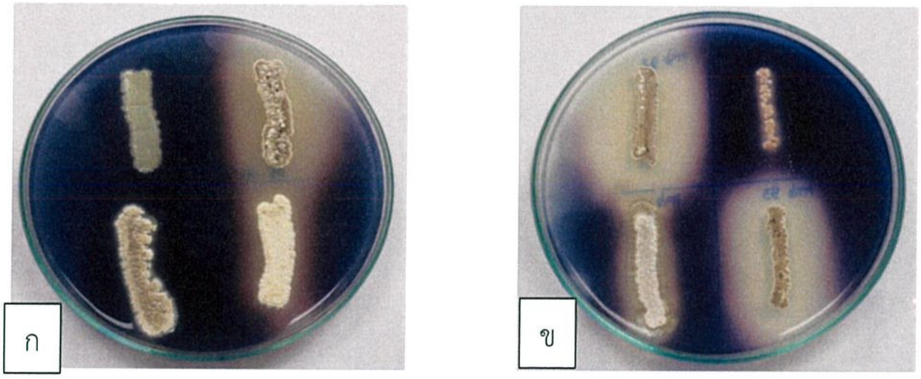
รูปที่ 3 (ข) ผลการทดสอบการย่อยสลายไนเตรทในอาหาร Peptone nitrite broth

(ก) ชุดควบคุมการทดสอบ

(ข) เกิดการย่อยสลายไนเตรท แสดงผล +

(ค) ไม่เกิดการย่อยสลายไนเตรท แสดงผล –

4. การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

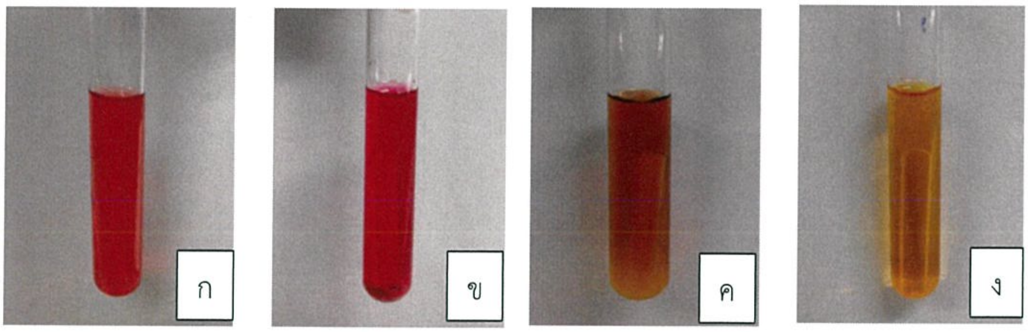


รูปที่ 4 (ข) ผลการทดสอบการย่อยสลายแป้งในอาหาร Inorganic salt-strach agar (ISP4)

(ก) ไม่เกิดการย่อยสลายแป้ง แสดงผล –

(ข) เกิดการย่อนสลายแป้ง แสดงผล +

5. **การย่อยสลายน้ำตาล 5 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส ไซโลส แลคโตส และมานิทอล**



รูปที่ 5 (ช) ผลทดสอบการย่อยสลายน้ำตาล กลูโคส ซูโครส ไซโลส แลคโตส และมานิทอล

(ก) ชุดควบคุมการทดสอบ

(ข) ไม่เกิดการย่อยสลายน้ำตาล แสดงผล K/-

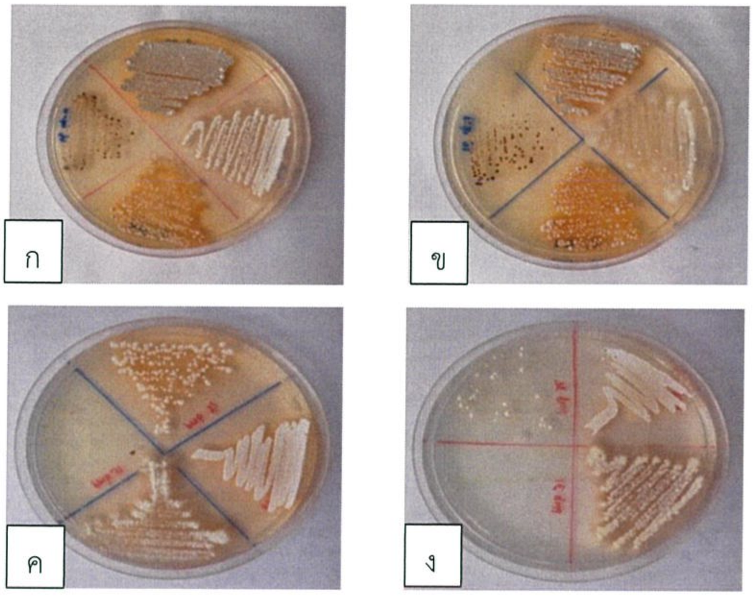
(ค) เกิดการย่อยสลายน้ำตาลเล็กน้อย แสดงผล W/+

(ง) เกิดการย่อยสลายน้ำตาล แสดงผล A/+

***หมายเหตุ

A (Acid)	เมื่อมีการหมักน้ำตาล สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
K (Alkaline)	เมื่อไม่เกิดการหมักน้ำตาล
W (Weakly)	เมื่อเกิดการหมักน้ำตาลเพียงเล็กน้อย สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงสีส้ม
+	เมื่อมีการเฟอร์เมนต์น้ำตาล สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
-	เมื่อไม่มีการเฟอร์เมนต์น้ำตาล สารละลายไม่มีการเปลี่ยนแปลง

6. **ความสามารถในการเจริญเติบในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 0.46, 1. 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์**



รูปที่ 6 (ช) ผลการทดสอบการใช้เกลือที่ความเข้มข้น 0.46, 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

(ก) ชุดควบคุมการทดสอบ ความเข้มข้นเกลือ 0.46 เปอร์เซ็นต์

(ข) อาหาร Starch – Casein agar ที่มีความเข้มข้นเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์

(ค) อาหาร Starch – Casein agar ที่มีความเข้มข้นเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์

(ง) อาหาร Starch – Casein agar ที่มีความเข้มข้นเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก ซ
จุลินทรีย์ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ

1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรีย ที่มีลักษณะกลมเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองหรือสีทอง เจริญเติบโตได้ดีในสภาพมีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 35-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH หรือความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ที่ 7-7.5 ส่วนค่า Aw (ปริมาณน้ำอิสระในอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเติบโต) ต่ำสุดสำหรับการเติบโตในสภาพมีออกซิเจนประมาณ 0.86 สภาพไม่มีออกซิเจนประมาณ 0.90 (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, มปป)

รูปที่ 1 (ซ) แสดงลักษณะรูปร่างของ *Staphylococcus aureus*
ที่มา : (Sahil, 2017)

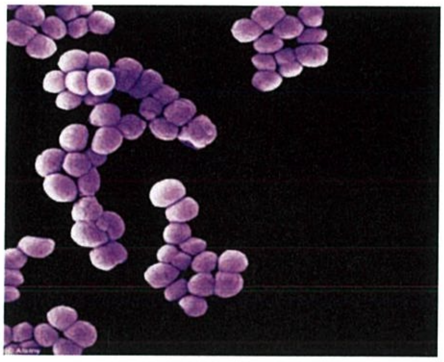
2. *Bacillus subtilis*

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) ที่สร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) สปอร์แบคทีเรีย (bacterial spore) Bacillus จะทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ดี Bacillus เป็น protiolytic bacteria มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารให้เป็นกรดอะมิโน เป็นจุลินทรีย์สาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) และทำให้อาหารที่เน่าเสียเกิดกลิ่นเหม็น (พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา, 2010)

รูปที่ 2 (ซ) แสดงลักษณะรูปร่างของ *Bacillus subtilis*
ที่มา : (Edward *et al.*, 2017)

3. *Micrococcus luteus*

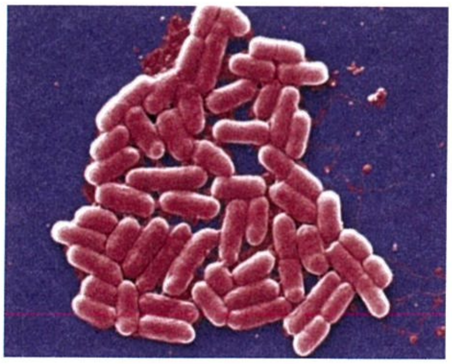
เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram-positive bacteria) รูปร่างกลม (coccus) การแบ่งเซลล์แบบ binary fission ของแบคทีเรียวงศ์นี้ จะเกิดการแบ่งมากกว่าหนึ่งแนวทำให้เซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม ไม่สร้างสปอร์ สร้างเม็ดสี (pigment) ได้ ทำให้มีสีต่างๆ เช่น สีชมพู สีแดง สีส้มมี metabolism แบบ respiratory คืออาศัยปฏิกิริยาออกซิเดทีฟในการเปลี่ยนสารประกอบคาร์บอนเป็นน้ำและพลังงาน สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรด แต่ไม่ผลิตก๊าซต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic bacteria) มีปฏิกิริยา catalase-positiveเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophillic bacteria) แต่บางสายพันธุ์เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) (Kocer, 1972)



รูปที่ 3 (ซ) แสดงลักษณะรูปร่างของ *Micrococcus luteus*
ที่มา : (Kocer, 1972)

4. *Escherichia coli*

เชื้ออีโคไล E. coli (Escherichia coli) เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อน (Gram negative rod) อยู่ใน Family Enterobacteriaceae ปกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของ คนและสัตว์เลือดอุ่น พบเป็นจำนวนมากในอุจจาระ แต่ไม่พบในปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้ทำให้อีโคไลมีความสำคัญ ในการตรวจเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยใช้เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) ที่บ่งบอกว่าผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนของสิ่งปฏิกูลหรือไม่ (เกษร, 2548)



รูปที่ 4 (ซ) แสดงลักษณะโคโลนีของ *Escherichia coli*
ที่มา : (Enderson, 2018)

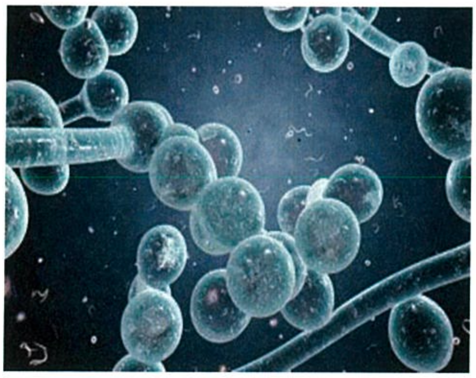
5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง aerobic เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Pseudomonadaceae สามารถเคลื่อนที่ได้โดย flagellum 1 เส้นที่ติดอยู่ตรงหัว ปกติจะพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช และเป็นnormal flora ในลำไส้คน Pseudomonas aeruginosa สามารถทำให้เกิดโรคในคนได้ รวมทั้งสัตว์ แมลงและต้นไม้ได้บ้าง (Friedrich, 2017)

รูปที่ 5 (ซ) แสดงลักษณะโคโลนีของ *Pseudomonas aeruginosa*
ที่มา : (Gschmeissner, 2013)

6. *Candida albicans*

Candida เป็นชื่อวงศ์ของยีสต์ (yeast) ซึ่งเป็น fungi เซลล์ที่มีรูปทรงกลมหรือรูปไข่ ผิวด้านหน้าโคโลนีเรียบหรือย่น สร้างสายราเทียม บางครั้งสร้างสายราแท้ ไม่สร้างโคนิเดียป่อง มีความสามารถในการก่อโรค *Candida albicans* มีการสร้างเส้นใยแท้ อาจมีการเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อแล้วหน่อที่เกิดขึ้นไม่หลุดจากเซลล์แม่ทำให้มีการเรียงต่อของเซลล์เป็นเส้นสาย (พิมพ์เพ็ญ และ นิธิยา, 2010)



รูปที่ 6 (ซ) แสดงลักษณะโคโลนีของ *Candida albicans*
ที่มา : (Kon, 2018)

ภาคผนวก ณ
ตารางเทียบกระดาษสีมาตรฐาน
(The NBS/ISCC Color System)

(John, 2004)

ตารางที่ 1 (ณ) แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS/ISCC Color System)

Abbreviation, number, color	Munsell (chart span) centroid	Mundie RGB	Mundie Swatch	convert from Munsell	Foster Swatch
Pink					
v.Pk 1 Vivid Pink	(9RP-1R,1-4R) 1R8/13 OUT	#FF7E93		#FFB5BA	
s.Pk 2 Strong Pink	(9RP-1R,1-4R) 1.2R6.9/8.2	#FD7B7C		#EA9399	
deep Pk 3 Deep Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.1R6/11.1	#F3545E		#E4717A	
l.Pk 4 Light Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.6R8.5/4	#FFBCAD		#F9CCCA	
m.Pk 5 Moderate Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.8R7.2/5.3	#EE9086		#DEA5A4	
d.Pk 6 Dark Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.7R5.9/6.1	#C76864		#C08081	
p.Pk 7 Pale Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.0R8.7/2.1	#FFCBBB		#EAD8D7	
gy.Pk 8 Grayish Pink	(9RP-1R,1R-6R) 2.6R7.2/2.3	#CF9B8F		#C4AEAD	
pkWhite 9 Pinkish White	(1-9R,9R-1YR,1-7YR) 5.8R9/0.8	#F9DBC8		#EAE3E1	
pkGy 10 Pinkish Gray	(1-9R,9R-1YR,1-7YR) 9.8R7.4/1	#C8A696		#C1B6B3	
Red					
v.R 11 Vivid Red	(1-9R) 5R3.9/15.4 OUT	#C10020		#BE0032	
s.R 12 Strong Red	(1-7R) 4R4.4/12.1	#BF2233		#BC3F4A	
deep R 13 Deep Red	(1-9R) 5.1R2.8/10.1	#7B001C		#841B2D	
v.deep R 14 Very Deep Red	(1-9R) 6.5R1.7/8.4	#4F0014		#5C0923	
m.R 15 Moderate Red	(1-7R) 3.8R4.4/9.1	#AB343A		#AB4E52	
d.R 16 Dark Red	(1-9R) 4.0R2.8/6.8	#681C23		#722F37	

l.gy.R 18 Light Grayish Red	(1-8R) 5.3R5.9/3.5	#B17267		#AD8884	
gy.R 19 Grayish Red	(1-8R) 4R4.4/4.8	#8C4743		#905D5D	
d.gy.R 20 Dark Grayish Red	(1-6R) 2.9R2.7/2.1	#482A2A		#543D3F	
Blackish R 21 Blackish Red	(1-6R) 3.9R0.8/1.7 OUT	#1F0E11		#2E1D21	
rGy 22 Reddish Gray	(1-9R,9R-1YR,1-2YR) 7R5.4/1.3	#8B6C62		#8F817F	
d.rGy 23 Dark Reddish Gray	(1-9R,9R-1YR) 6R3.4/1	#523C36		#5C504F	
rBlack 24 Reddish Black	(1-9R,9R-1YR) 2R0.9/0.9 OUT	#1E1112		#282022	
Yellowish Pink					
v.yPk 25 Vivid Yellowish Pink	(4-9R,9R-1YR,1-2YR)8R8/13OUT	#FF845C		#FFB7A5	
s.yPk26Strong Yellowish Pink	(4-9R,9R-1YR,1-2YR) 8.4R7/9.5	#FF7A5C		#F99379	
deep yPk 27 Deep Yellowish Pink	(4-7R) 5.5R5.8/12.1	#F64A46		#E66761	
l.yPk 28 Light Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-7YR)1.9YR8.2/4.6	#FFB28B		#F4C2C2	
m.yPk 29 Moderate Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-7YR) 0.7YR7.2/4.9	#EE9374		#D9A6A9	
d.yPk 30 Dark Yellowish Pink	(6-8R) 7R6/6.1	#CC6C5C		#C48379	
p.yPk 31 Pale Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-8YR)4.2YR8.6/2.2	#FFC8A8		#ECD5C5	
gy.yPk 32 Grayish Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1-5YR)1.3YR7.2/2.4	#D39B85		#C7ADA3	
Brownish Pink					
brPk 33 Brownish Pink	(5-8YR) 7YR7.1/2.3	#CD9A7B		#C2AC99	
Reddish Orange					
v.rO 34 Vivid Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR)9.8R5.4/14.5	#F13A13		#E25822	
s.rO 35 Strong Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR)9.3R5.4/12.2	#FFB961 see #70		#D9603B	
deep rO 36 Deep Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR)9.2R3.9/12.1	#A91D11		#AA381E	
m.rO 37 Moderate Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR) 9.3R5.5/9.2	#D35339		#CB6D51	

d.rO 38 Dark Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1-2YR) 9.3R4/9.1	#9B2F1F		#9E4732	
gy.rO 39 Grayish Reddish Orange	(8-9R,9R-1YR,1-3YR)0.4YR5.4/6.2	#B85D43		#B4745E	
Reddish Brown					
s.rBr 40 Strong Reddish Brown	(9R-1YR,1-2YR) 0.3YR3.1/9.9	#7F180D		#882D17	
deep rBr 41 Deep Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1-2YR)1.6YR1.5/8.3	#490005		#56070C	
l.rBr 42 Light Reddish Brown	(8-9R,9R-1YR,1-3YR)0.5YR5.5/4.1	#AA6651		#A87C6D	
m.rBr 43 Moderate Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1-3YR) 9R3.4/5.2	#712F26		#79443B	
d.rBr 44 Dark Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1-3YR) 9.6R1.3/3.6	#321011		#3E1D1E	
l.gy.rBr 45 Light Grayish Reddish Brown	(1-5YR) 2.9YR5.4/2.3	#966A57		#977F73	
gy.rBr 46 Grayish Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1-3YR) 9R3.4/2.4	#5E3830		#674C47	
d.gy.rBr 47 Dark Grayish Reddish Brown	(6-9R,9R-1YR,1-3YR) 9R2/2	#371F1C		#43302E	
Orange					
v.O 48 Vivid Orange	(2-7YR) 4.1YR6.5/15 OUT	#FF6800		#F38400	
brill.O 49 Brilliant Orange	(2-7YR) 4YR9/12 OUT	#FFB841		#FD943F	
s.O 50 Strong Orange	(2-7YR) 4.3YR6.5/12.2	#FF6F1A		#ED872D	
deep O 51 Deep Orange	(2-7YR) 4.1YR5.1/11.3	#C34D0A		#BE6516	
l.O 52 Light Orange	(2-7YR) 4.8YR7.8/7.2	#FFA161		#FAB57F	
m.O 53 Moderate Orange	(2-7YR) 4.6YR6.5/8.2	#E8793E		#D99058	
Brownish Orange					
brO 54 Brownish Orange	(2-7YR) 4.1YR5/8	#B15124		#AE6938	
Brown					
s.Br 55 Strong Brown	(2-8YR) 4.6YR3.5/7.6	#753313		#80461B	
deep Br 56 Deep Brown	(2-8YR) 5.6YR2.4/5.2	#4D220E		#593319	

m.Br 58 Moderate Brown	(3-8YR) 5.6YR3.5/3.9	#673923		#6F4E37	
d.Br 59 Dark Brown	(3-8YR) 5.3YR1.6/3.4	#35170C		#422518	
l.gy.Br 60 Light Grayish Brown	(5-8YR) 6.4YR5.4/2.2	#946B54		#958070	
gy.Br 61 Grayish Brown	(3-8YR) 5.5YR3.5/1.8	#5A3D30		#635147	
d.gy.Br 62 Dark Grayish Brown	(3-8YR) 5.5YR2/1.5	#32221A		#3E322C	
l.brGy 63 Light Brownish Gray	(2-8YR,8YR-1Y,1-4Y) 7YR5.4/1.2	#8B6D5C		#8E8279	
brGy 64 Brownish Gray	(1-8YR,8YR-1Y,1-4Y) 5.65R3.4/0.9	#503D33		#5B504F	
brBlack 65 Brownish Black	(1-8YR,8YR-1Y,1-4Y) 7.8YR0.6/0.9 OUT	#140F0B		#28201C	
Orange Yellow					
v.OY 66 Vivid Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 8.6YR7.3/15.2OUT	#FF8E00		#F6A600	
brill.OY 67 Brilliant Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 0.1Y8.1/10.5 OUT	#FFB02E		#FFC14F	
s.OY 68 Strong Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.1YR7.1/11.6	#FF8E0D		#EAA221	
deep OY 69 Deep Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 8.6YR6/12.1 OUT	#D76E00		#C98500	
l.OY 70 Light Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.4YR8.3/6.8	#FFB961 see #35		#FBC97F	
m.OY 71 Moderate Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 8.7YR7.2/8.3	#F7943C		#E3A857	
d.OY 72 Dark Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.3YR6/7.9	#C37629		#BE8A3D	
p.OY 73 Pale Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.2YR8.7/4.4	#FFCA86		#FAD6A5	
Yellowish Brown					
s.yBr 74 Strong Yellowish Brown	(7-8YR,8YR-1Y) 8.8YR4.6/8.5	#95500C		#996515	
deep yBr 75 Deep Yellowish Brown	(8YR-1Y) 8.8YR3.1/5	#593315		#654522	
l.yBr 76 Light Yellowish Brown	(7-8YR,8YR-1Y) 8.7YR6.5/5	#BB8B54		#C19A6B	
m.yBr 77 Moderate Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.5YR4.4/3.9	#7D512D		#826644	
d.yBr 78 Dark Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.4YR2.3/3.3	#3F2512		#4B3621	

gy.yBr 80 Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.5YR4.6/2.1	#785840		#7E6D5A	
d.gy.yBr 81 Dark Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 8.8YR2.5/1.6	#3D2B1F		#483C32	
Yellow					
v.Y 82 Vivid Yellow	(1-7Y) 3.3Y8/14.3 OUT	#FFB300		#F3C300	
brill.Y 83 Brilliant Yellow	(1-7Y) 4.4Y8.7/8.9	#FFCF40		#FADA5E	
s.Y 84 Strong Yellow	(1-7Y) 3.7Y7.2/9.3	#E59E1F		#D4AF37	
deep Y 85 Deep Yellow	(1-7Y) 3.7Y5.9/9.1	#B57900		#AF8D13	
l.Y 86 Light Yellow	(1-7Y) 4.3Y8.8/6.8	#FFD35F		#F8DE7E	
m.Y 87 Moderate Yellow	(1-7Y) 3.8Y7.1/6.5	#D79D41		#C9AE5D	
d.Y 88 Dark Yellow	(1-7Y) 3.9Y6/6.4	#B07D2B		#AB9144	
p.Y 89 Pale Yellow	(1-7Y) 4.7Y9/3.8	#FFDB8B		#F3E5AB	
gy.Y 90 Grayish Yellow	(1-9Y) 4.4Y7.2/3.8	#CEA262		#C2B280	
d.gy.Y 91 Dark Grayish Yellow	(1-7Y) 3.8Y5.9/4	#A47C45		#A18F60	
yWhite 92 Yellowish White	(7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 4.5Y9.2/1.2	#FFE2B7		#F0EAD6	
yGy 93 Yellowish Gray	(7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 3.8Y7.4/1.4	#CAA885		#BFB8A5	
Olive Brown					
l.OlBr 94 Light Olive Brown	(1-4Y) 2.1Y4.9/7.9	#945D0B		#967117	
m.OlBr 95 Moderate Olive Brown	(1-4Y) 2.7Y3.6/5.5	#64400F		#6C541E	
d.OlBr 96 Dark Olive Brown	(1-4Y) 2Y1.9/2.2	#302112		#3B3121	
Greenish Yellow					
v.gY 97 Vivid Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.1Y8.2/12 OUT	#F4C800		#DCD300	
brill.gY 98 Brilliant Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.8Y8.8/9.5	#FFDC33		#E9E450	

d.gY 100 Deep Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.2Y5.9/9.2 OUT	#9F8200		#9B9400	
l.gY 101 Light Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.8Y8.9/7	#FFDE5A		#EAE679	
m.gY 102 Moderate Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.5Y7.1/6.5	#C4A43D		#B9B459	
d.gY 103 Dark Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.4Y5.9/6.3	#9B8127		#98943E	
p.gY 104 Pale Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.5Y9/4.2	#FFDF84		#EBE8A4	
gy.gY 105 Grayish Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9Y7.2/3.9	#C4A55F		#B9B57D	
Olive					
l.Ol 106 Light Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 8.2Y5.1/5.6	#846A20		#867E36	
m.Ol 107 Moderate Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 7.6Y3.8/5.4	#5E490F		#665D1E	
d.Ol 108 Dark Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 8.9Y2.4/3.1	#362C12		#403D21	
l.gy.Ol 109 Light Grayish Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 7.85Y5.5/2.5	#8B734B		#8C8767	
gy.Ol 110 Grayish Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 8Y3.6/2	#52442C		#5B5842	
d.gyOl 111 Dark Grayish Olive	(4-9Y,9Y-2GY) 9.7Y2/1.8	#2B2517		#363527	
l.OlGy 112 Light Olive Gray	(4-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 6.9Y5.5/1.3	#887359		#8A8776	
OlGy 113 Olive Gray	(4-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 8.1Y3.5/0.9	#4D4234		#57554C	
OlBlack 114 Olive Black	(4-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 9Y1.1/0.9	#121910		#25241D	
Yellow Green					
v.YG 115 Vivid Yellow Green not vivid yellowish green see #129	(2-8GY) 5.4GY6.8/11.2 OUT	#93AA00		#8DB600	
brill.YG 116 Brilliant Yellow Green	(2-8GY) 4.9GY8.2/9.1	#CED23A		#BDDA57	
s.YG 117 Strong Yellow Green	(2-8GY) 5.4GY6/8.7	#7F8F18		#7E9F2E	
deep YG 118 Deep Yellow Green	(2-8GY) 7.4GY4.2/7.1	#425E17		#467129	

m.YG 120 Moderate Yellow Green	(2-8GY) 4.8GY6/5	#8B8940		#8A9A5B	
p.YG 121 Pale Yellow Green not pale yellowish green	(9Y-2GY,2-8GY) 3.4GY8.7/2.4	#F0D698		#DADFB7	
gy.YG 122 Grayish Yellow Green not grayish yellowish green	(9Y-2GY,2-8GY) 4.4GY6/2.3	#90845B		#8F9779	
Olive Green					
s.OlG 123 Strong Olive Green	(2-8GY) 4GY3/11 OUT	#0A4500		#404F00	
deep OlG 124 Deep Olive Green	(2-8GY) 4GY1.5/11 OUT	#142300		#232F00	
m.OlG 125 Moderate Olive Green	(2-8GY) 5.7GY3.6/4.8	#434B1B		#4A5D23	
d.OlG 126 Dark Olive Green	(2-8GY) 8GY2.2/3.6	#232C16		#2B3D26	
gy.OlG 127 Grayish Olive Green	(2-8GY) 4.6GY3.5/2	#48442D		#515744	
d.gy.OlG 128 Dark Grayish Olive Green	(2-8GY) 5.4GY2/1.8	#27261A		#31362B	
Yellowish Green					
v.yG 129 Vivid Yellowish Green see #115	(8GY-3G) 1.1G5.9/11.2	#379931		#27A64C	
brill.yG 130 Brilliant Yellowish Green	(8GY-3G) 0.3G7.7/8.6	#8CCB5E		#83D37D	
s.yG 131 Strong Yellowish Green	(8GY-3G) 0.4G5.4/8.7	#478430		#44944A	
deep yG 132 Deep Yellowish Green	(8GY-3G) 0.9G3.5/9 OUT	#00541F		#00622D	
v.deep yG 133 Very Deep Yellowish Green	(8GY-3G) 10GY1.5/11 OUT	#002800		#003118	
v.l.yG 134 Very Light Yellowish Green	(8GY-3G) 0.2G8.6/4.6	#C6DF90		#B6E5AF	
l.yG 135 Light Yellowish Green	(8GY-3G) 0.7G7.4/5.2	#007BA7 see #167 #170		#93C592	

d.yG 137 Dark Yellowish Green	(8GY-3G) 0.6G3.5/5	#304B26		#355E3B	
v.d.yG 138 Very Dark Yellowish Green	(8GY-3G) 0.3G1.8/4.3	#132712		#173620	
Green					
v.G 139 Vivid Green	(3-9G) 3.2G4.9/11.1 OUT	#007D34		#008856	
brill.G 140 Brilliant Green	(3-9G) 6.2G6.5/8.3	#47A76A		#3EB489	
s.G 141 Strong Green	(3-9G) 5.8G4.4/8.7 OUT	#006B3C		#007959	
deep G 142 Deep Green	(3-9G) 5.1G3/8.1 OUT	#004524		#00543D	
v.l.G 143 Very Light Green	(3-9G) 6.5G7.8/4.9	#98C793		#8ED1B2	
l.G 144 Light Green	(3-9G) 6G6.4/5.1	#719B6E		#6AAB8E	
m.G 145 Moderate Green	(3-9G) 6.3G4.5/5.1	#386646		#3B7861	
d.G 146 Dark Green	(3-9G) 6.6G2.8/4.6	#203A27		#1B4D3E	
v.d.G 147 Very Dark Green	(3-9G) 8G1.8/3	#16251C		#1C352D	
v.p.G 148 Very Pale Green	(8GY-3G,3-9G) 7.3G8.8/1.9	#D8DEBA		#C7E6D7	
p.G 149 Pale Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 7.6G6.4/1.7	#8D917A		#8DA399	
gy.G 150 Grayish Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 8.8G4.5/1.8	#575E4E		#5E716A	
d.gy.G 151 Dark Grayish Green not dark greenish yellowish green or dark grayish yellowish green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 1BG2.9/1.8	#313830		#3A4B47	
blackish G 152 Blackish Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 10G1/1.4	#141613		#1A2421	
gWhite 153 Greenish White	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 10G9.2/0.8	#F5E6CB		#DFEDE8	
l.gGy 154 Light Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 3G7.5/0.9	#BAAF96		#B2BEB5	

gGy 155 Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 7.5G5.5/1	#7A7666		#7D8984	
d.gGy 156 Dark Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 1.5BG3.5/0.9	#45433B		#4E5755	
gBlack 157 Greenish Black	(4GY-8GY,8GY-3G,3G-9G,9G-10BG) 8.7G1/0.7	#181513		#1E2321	
Bluish Green					
v.bG 158 Vivid Bluish Green	(9G-10BG) 5BG5/13 OUT	#00836E		#008882	
brill.bG 159 Brilliant Bluish Green	(9G-10BG) 2.9BG6/9.6 OUT	#009B76		#00A693	
s.bG 160 Strong Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG4.5/8.5 OUT	#006D5B		#007A74	
deep bG 161 Deep Bluish Green	(9G-10BG) 2.8BG2.4/8.3 OUT	#00382B		#00443F	
v.l.bG 162 Very Light Bluish Green	(9G-10BG) 4.4BG8.3/4.6	#A0D6B4		#96DED1	
l.bG 163 Light Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG6.5/4.9	#669E85		#66ADA4	
m.bG 164 Moderate Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG4.5/5	#2F6556		#317873	
d.bG 165 Dark Bluish Green	(9G-10BG) 4.9BG2.7/5 OUT	#013A33		#004B49	
v.d.bG 166 Very Dark Bluish Green	(9G-10BG) 3.6BG1.2/4 OUT	#001D18		#002A29	
Greenish Blue					
v.gB 167 Vivid Greenish Blue	(10BG-9B) 5B5/13 OUT see #170 #176	#007BA7 see #135 #170		#0085A1	
brill.gB 168 Brilliant Greenish Blue	(10BG-9B) 4.6B5.9/7.7	#2A8D9C		#239EBA	
s.gB 169 Strong Greenish Blue	(10BG-9B) 4.9B4.5/8.4 OUT	#00677E		#007791	
deep gB 170 Deep Greenish Blue	(10BG-9B) 5B5/13 OUT see #167 #176 same as #167; guess 5B2/9	#007BA7 see #135 #167		#2E8495	
v.l.gB 171 Very Light Greenish Blue	(10BG-9B) 4B8/4	#A3C6C0		#9CD1DC	
l.gB 172 Light Greenish Blue	(10BG-9B) 4.5B6.5/5.4	#649A9E		#66AABC	

m.gB 173 Moderate Greenish Blue	(10BG-9B) 4.7B4.5/5.2	#30626B		#367588	
d.gB 174 Dark Greenish Blue	(10BG-9B) 3.7B2.7/5 OUT	#003841		#004958	
v.d.gB 175 Very Dark Greenish Blue	(10BG-9B) 5B1.5/3.6 OUT	#022027		#002E3B	
Blue					
v.B 176 Vivid Blue, ultramarine	(9B-5PB,5-7PB) 5B5/14 OUT see #167 #170	#007CAD		#00A1C2	
brill.B 177 Brilliant Blue, celestial blue	(9B-5PB,5-7PB) 1.6PB5.9/9.4	#4285B4		#4997D0	
s.B 178 Strong Blue, bright blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.9PB4.1/10.4OUT	#00538A		#0067A5	
deep B 179 Deep Blue, royal blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.8PB2.5/7.9 OUT	#002F55		#00416A	
v.l.B 180 Very Light Blue, baby blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.7PB7.9/6	#A6BDD7		#A1CAF1	
l.B 181 Light Blue, sky blue	(9B-5PB,5-7PB) 1.6PB6.4/6.9	#6C92AF		#70A3CC	
m.B 182 Moderate Blue, cerulean blue	(9B-5PB,5-7PB) 3PB4.3/6.8	#395778		#436B95	
d.B 183 Dark Blue, navy blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.2PB1.7/5.5 OUT	#002137		#00304E	
v.p.B 184 Very Pale Blue, cloud blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 1.5PB8.3/3.3	#C1CACA		#BCD4E6	
p.B 185 Pale Blue, alice blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.6PB6.5/2.6	#919192		#91A3B0	
gy.B 186 Grayish Blue, slate blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.2PB4.2/3	#4A545C		#536878	
d.gy.B 187 Dark Grayish Blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.2B2.7/2	#2C3337		#36454F	
blackish B 188 Blackish Blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.8B1.3/1.5	#161A1E		#202830	
bWhite 189 Bluish White	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.2B9.1/1.2	#F9DFCF		#E9E9ED	
l.bGy 190 Light Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 8.2B7.5/1	#BEADA1		#B4BCC0	
bGy 191 Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 8.9B5.5/0.9	#7D746D		#81878B	
d.bGy 192 Dark Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.3PB3.6/1.1	#464544		#51585E	
bBlack 193 Bluish Black	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.6B1.1/0.8	#151719		#202428	
Purplish Blue					

v.pB 194 Vivid Purplish Blue not very purplish blue	(7-9PB) 7.8PB2/12.5	#20155E		#30267A	
brill.pB 195 Brilliant Purplish Blue	(7-9PB) 7.3PB5.1/9	#62639B		#6C79B8	
s.pB 196 Strong Purplish Blue	(7-9PB) 8PB4/10.9	#474389		#545AA7	
deep pB 197 Deep Purplish Blue	(7-9PB) 7.8PB1.5/8	#1A153F		#272458	
v.l.pB 198 Very Light Purplish Blue	(7-9PB) 7.4PB7.6/5.2	#BAACC7		#B3BCE2	
l.pB 199 Light Purplish Blue	(7-9PB) 7.3PB6/6.5	#837DA2		#8791BF	
m.pB 200 Moderate Purplish Blue	(7-9PB) 7.9PB3.5/6.5	#423C63		#4E5180	
d.pB 201 Dark Purplish Blue	(7-9PB) 8PB1.3/4.3	#1A162A		#252440	
v.p.pB 202 Very Pale Purplish Blue	(5-9PB) 7PB8/3.7	#CBBAC5		#C0C8E1	
p.pB 203 Pale Purplish Blue	(5-9PB) 7PB6/3.9	#8A7F8E		#8C92AC	
gy.pB 204 Grayish Purplish Blue	(5-9PB) 6.9PB3.4/3.8	#413D51		#4C516D	
Violet					
v.V 205 Vivid Violet	(9PB-3P) 2P5/14	#884BAE		#9065CA	
brill.V 206 Brilliant Violet	(9PB-3P) 9.9PB5.1/9.4	#755D9A		#7E73B8	
s.V 207 Strong Violet	(9PB-3P) 0.2P3.7/10.1	#53377A		#604E97	
deep V 208 Deep Violet	(9PB-3P) 1.1P1.2/8.6	#240935		#32174D	
v.l.V 209 Very Light Violet	(9PB-3P) 2P8.5/7 OUT	#EEBEF1		#DCD0FF	
l.V 210 Light Violet	(9PB-3P) 0.5P5.6/7.1	#876C99		#8C82B6	
m.V 211 Moderate Violet	(9PB-3P) 1.4P3.6/7	#543964		#604E81	
d.V 212 Dark Violet	(9PB-3P) 1.4P1.3/4.9	#22132B		#2F2140	
v.p.V 213 Very Pale Violet	(9PB-3P) 9.7PB7.9/3.7	#D8B1BF		#C4C3DD	
p.V 214 Pale Violet	(9PB-3P) 1.3P6/4	#957B8D		#9690AB	

gy.V 215 Grayish Violet	(9PB-3P) 1.2P3.3/3.9	#46394B		#554C69	
Purple					
v.P 216 Vivid Purple	(3-9P) 6P4.5/14.0	#943391		#9A4EAE	
brill.P 217 Brilliant Purple	(3-9P) 6P7/11	#DD80CC		#D399E6	
s.P 218 Strong Purple	(3-9P) 6.5P4.3/9.2	#803E75		#875692	
deep P 219 Deep Purple	(3-9P) 6.3P2.7/9.1	#531A50		#602F6B	
v.deep P 220 Very Deep Purple	(3-9P) 5P1.5/8	#320B35		#401A4C	
v.l.P 221 Very Light Purple	(3-9P) 6.5P7.8/5.1	#E3A9BE		#D5BADB	
l.P 222 Light Purple	(3-9P) 6.2P6.5/6.5	#BA7FA2		#B695C0	
m.P 223 Moderate Purple	(3-9P) 6.6P4.5/7.1	#7F4870		#86608E	
d.P 224 Dark Purple	(3-9P) 6.3P2.8/4.9	#472A3F		#563C5C	
v.d.P 225 Very Dark Purple	(3-9P) 6.9P1/4.5	#230D21		#301934	
v.p.P 226 Very Pale Purple	(9PB-3P,3-9P) 5.5P8.2/3.2	#E6BBC1		#D6CADD	
p.P 227 Pale Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 7.9P6.4/3.1	#AE848B		#AA98A9	
gy.P 228 Grayish Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 8.1P4.5/2.7	#72525C		#796878	
d.gy.P 229 Dark Grayish Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP	#452D35		#50404D	
blackish P 230 Blackish Purple	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 0.8RP0.9/1.6 OUT	#1D1018		#291E29	
pWhite 231 Purplish White	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP) 2.5RP9/0.8	#FADBC8		#E8E3E5	
l.pGy 232 Light Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP) 0.3RP7.5/1.1	#C8A99E		#BFB9BD	
pGy 233 Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 1RP5.5/0.9	#88706B		#8B8589	

pBlack 235 Purplish Black	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 9.54P0.9/0.6 OUT	#1B1116		#242124	
Reddish Purple					
v.rP 236 Vivid Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP3/14 OUT	#7E0059		#870074	
s.rP 237 Strong Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP4.4/10.2	#9A366B		#9E4F88	
deep rP 238 Deep Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP2.8/9.5	#641349		#702963	
v.deep rP 239 Very Deep Reddish Purple	(9P-3RP) 0.9RP1.9/8.9	#470736		#54194E	
l.rP 240 Light Reddish Purple	(9P-3RP) 0.7RP6/6.9	#BB6C8A		#B784A7	
m.rP 241 Moderate Reddish Purple	(9P-3RP) 0.8RP4.5/7	#8C4566		#915C83	
d.rP 242 Dark Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP2.8/4.8	#4F273A		#5D3954	
v.d.rP 243 Very Dark Reddish Purple	(9P-3RP) 1.5RP1/4.8	#270A1F		#341731	
p.rP 244 Pale Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP6/4.2	#AC7580		#AA8A9E	
gy.rP 245 Grayish Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP4.5/4.2	#7D4D5D		#836479	
Purplish Pink					
brill.pPk 246 Brilliant Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 6RP8.5/11 OUT	#FF97BB		#FFC8D6	
s.pPk 247 Strong Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 5.6RP6.8/9	#F6768E		#E68FAC	
deep pPk 248 Deep Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 4.4RP6/12.2	#EB5284		#DE6FA1	
l.pPk 249 Light Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 4.6RP8/5.5	#FFA8AF		#EFBBCC	
m.pPk 250 Moderate Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 4.6RP6.8/6.7	#E28090		#D597AE	
d.pPk 251 Dark Purplish Pink	(3-9RP) 6.4RP5.9/7	#C76574		#C17E91	
p.pPk 252 Pale Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 3.7RP8.4/3.3	#FDBDBA		#E8CCD7	
gy.pPk 253 Grayish Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 3.7RP7/3.5	#CC9293		#C3A6B1	

v.pR 254 Vivid Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.6RP4.9/13.6	#D5265B		#CE4676	
s.pR 255 Strong Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.3RP4.4/11.4	#B32851		#B3446C	
deep pR 256 Deep Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.3RP2.6/10.1	#6F0035		#78184A	
v.deep pR 257 Very Deep Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 6.8RP1.7/8	#470027		#54133B	
m.pR 258 Moderate Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.1RP4.5/9	#A73853		#A8516E	
d.pR 259 Dark Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.1RP2.7/6	#5B1E31		#673147	
v.d.pR 260 Very Dark Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 6.6RP0.9/4.8 OUT	#28071A		#38152C	
l.gy.pR 261 Light Grayish Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7.8RP5.9/4.2	#B27070		#AF868E	
gy.pR 262 Grayish Purplish Red	(3-9RP,9RP-1R) 7RP4.5/5.1	#8C4852		#915F6D	
Neutral					
White 263 White	(all) 2.5PB9.5/0.2	#FFC9D7		#F2F3F4	
l.Gy 264 Light Gray	(all) 6.7Y7.4/0.2	#C2A894		#B9B8B5	
med.Gy 265 Medium Gray	(all) 3.3GY5.4/0.1	#817066		#848482	
d.Gy 266 Dark Gray	(all) 2.5PB3.5/0	#49423D		#555555	
Black 267 Black	(all) 2.5PB0.8/0 OUT	#131313		#222222	

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวศรสวรรค์ อินพุ่ม
E-mail millshiny.sornsawan@gmail.com
ประวัติการศึกษา
2556 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์)
โรงเรียนชลบุรี "สุขบท"
จังหวัดชลบุรี
2561 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร

ชื่อ-นามสกุล นางสาวสวรส เลิศสัฒนนนท์
E-mail sawarot.pondy@gmail.com
ประวัติการศึกษา
2556 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์)
โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ เตรียมอุดมศึกษาน้อมเกล้า
กรุงเทพมหานคร
2561 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 9 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นางสาวศรสวรรค์ อินพุ่ม รหัสประจำตัว 57050896

นางสาวสวรส เลิศสัฒนนนท์ รหัสประจำตัว 57050904

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษเรื่อง

ชื่อภาษาไทย	ฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนสถานตากอากาศบางปู จังหวัดสมุทรปราการ
ชื่อภาษาอังกฤษ	Phospholipids and Antimicrobial Activity of Actinomycetes from Bangpu Recreation Center Mangrove Forest Soil, Samutprakan
ปีการศึกษา	2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มสหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 1.54 %

ลงชื่อ ศรสวรรค์ อินพุ่ม
(นางสาวศรสวรรค์ อินพุ่ม)
นักศึกษา

ลงชื่อ สวรส เลิศสัฒนนนท์
(นางสาวสวรส เลิศสัฒนนนท์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..............................
(ผศ.วีนา ชูโชติ)
ประธานกรรมการ

ลงชื่อ คนึงกานต์ กลั่นบุศย์
(ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ลงชื่อ..............................
(รศ.ดร.จิตติ ท่าไว)
กรรมการ