การคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรยี่หร่าและฟ้าทะลายโจร

Endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants *Andrographis paniculata* and *Cuminum cyminum*

พรไพลิน พินิจรอบ
รัตติกานต์ สระแก้ว
สุภิญญา แสงรังษี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร ยี่หร่าและฟ้าทะลายโจร

Endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants *Andrographis paniculata* and *Cuminum cyminum*

พรไพลิน พินิจรอบ

รัตติกานต์ สระแก้ว

สุภิญญา แสงรังษี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants *Andrographis paniculata* and *Cuminum cyminum*

PORNPAILIN PINITROB

RATTIKAN SRAKAEW

SUPHINYA SAENGRUNGSEE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรยี่หร่าและฟ้าทะลายโจร Endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants *Andrographis paniculata* and *Cuminum cyminum*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรไพลิน พินิจรอบ รหัสนักศึกษา 56051029 นางสาวรัตติกานต์ สระแก้ว รหัสนักศึกษา 56051055 นางสาวสุภิญญา แสงรังษี รหัสนักศึกษา 56051095
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. วิภาวี เดชติศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ	
ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรยี่หร่าและฟ้าทะลายโจร Endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants *Andrographis paniculata* and *Cuminum cyminum*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรไพลิน พินิจรอบ รหัสนักศึกษา 56051029 นางสาวรัตติกานต์ สระแก้ว รหัสนักศึกษา 56051055 นางสาวสุภิญญา แสงรังษี รหัสนักศึกษา 56051095
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. วิภาวี เดชติศักดิ์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรท้องถิ่นจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ยี่หร่า และ ฟ้าทะลายโจร และทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ต่อเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Candida albicans* ATCC10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC278533, *Micrococcus luteus* ATCC25923 และ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทหลังจากฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธี Surface sterilization ผลการการทดลองพบว่า เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้มีจำนวนทั้งหมด 89 ไอโซเลท ซึ่งพบในยี่หร่าและฟ้าทะลายโจรจำนวน 52 และ 37 ไอโซเลท ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการจัดกลุ่มเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทโดยดูจากฤทธิ์ทางชีวภาพและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่า สามารถจัดจำแนกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทได้เป็น 10 กลุ่ม จากนั้นนำตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ได้แก่ CMR-50, CMR-13, CMR-30, CMR-17, CMR-42, CMR-45, CMR-62, CMR-55, APR-1 และ APR-11 มาทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่า มีเพียง 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CMR-17 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 500 และ 125 µg/ml ตามลำดับ โดยทั้งสองไอโซเลทแสดงบริเวณยับยั้งขนาด 9 มม. เท่ากัน และไอโซเลท APR-1 สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 1000 µg/ml โดยแสดงบริเวณยับยั้งขนาด 9 มม., เชื้อ *M. luteus* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 500 µg/ml โดยแสดงบริเวณยับยั้งขนาด 13 มม., เชื้อ MRSA ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 500 µg/ml โดยแสดงบริเวณยับยั้งขนาด 19 มม. และเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 125 µg/ml โดยแสดงบริเวณยับยั้งขนาด 9 มม. ผลจากการเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า ไอโซเลทที่ CMR-17 และ APR-1 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงต่อเชื้อ *Streptomyses misionensis* และเชื้อ *Streptomyses bacillaris* เท่ากับ 99.93% และ 99.65%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากพืชทั้งสองชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ ผู้วิจัยวางแผนที่จะทำการคัดแยกหาเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีและเป็นชนิดใหม่ต่อไป

คำสำคัญ : เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท, สารสกัดหยาบ, ฤทธิ์ทางชีวภาพ, ยี่หร่า, ฟ้าทะลายโจร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants *Andrographis paniculata* and *Cuminum cyminum*
Students	Miss.Pornpailin Pinitrob Student ID 56051029 Miss.Rattikan Srakaew Student ID 56051055 Miss.Suphinya Saengrungsee Student ID 56051095
Degree	Bachelor of Science (Industy Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Dr.Wipawee Dejtisakdi

Abstract

The objective of this study is to isolate endophytic actinomycetes from two native medicinal plants such as *Cuminum cyminum* and *Andrographis paniculata* and test antimicrobial activity from endophytic actinomycetes crude extract to 7 pathogens, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Candida albicans* ATCC10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC278533, *Micrococcus luteus* ATCC25923, Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA). In the experiments, we isolated endophytic actinomycetes after surface sterilization and found that there were a total of 89 isolates of endophytic actinomycetes that were from *Cuminum cyminum* and *Andrographis paniculata* 52 and 37 isolates, respectively. After that we were grouping endophytic actinomycetes into 10 groups by using primary screening of antimicrobial activity and morphology. We then used a representative in each group such as CMR-50, CMR-13, CMR-30, CMR-17, CMR-42, CMR-45, CMR-62, CMR-55, APR-1 and APR-11 to test antimicrobial activity by using agar disc diffusion. We found that only 2 out of 10 isolates were able to inhibit some pathogens. To illustrate, CMR-17 was able to inhibit *B. subtilis* and *C. albicans* with the minimum concentration of crude extract at 500 µg/ml and 125 µg/ml, respectively and both showed the same inhibition zone of 9 mm. On the other hand, APR-1 was able to inhibit *C. albicans* as shown by the inhibition zone at 9 mm. with the minimum concentration of crude extract at 1000 µg/ml., *M. luteus* as shown by the inhibition zone at 13 mm. with the minimum concentration of crude extract at 500 µg/ml., MRSA as shown by the inhibition zone at 19 mm. with the minimum concentration of crude extract at 500 µg/ml. and *S. aureus* as shown by the inhibition zone at 9 mm. with the minimum concentration of crude extract at 125 µg/ml. After we blasted 16S rRNA of CMR-17 and APR-1, we found that CMR-17 and APR-1 had 99.93% and 99.65% similarity to *Streptomyces misionensis* and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Streptomyces bacillaris, respectively. From this study, we concluded that the endophytic actinomycetes isolated from both plants were able to inhibit some gram-positive bacteria. We further plan to do more endophytic actinomycetes isolation to find a better antimicrobial activity of crude extract and a new species of an endophytic actinomycetes.

Keywords : Endophytic Actinomycetes , Secondary metabolite , Primary screening, *Cuminum cyminum*, *Andrographis paniculata*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งโครงงานพิเศษนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ ที่ให้คำปรึกษา รวมถึงการแนะนำและช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำโครงงาน รวมทั้งได้ตรวจทานและแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ และขอขอบคุณ รศ.ดร.จิตติ ท่าไว และ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการและกรรมการ ตามลำดับที่สละเวลามาตรวจสอบพิจารณาโครงงานพิเศษ รวมถึงให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์เพิ่มเติมในการปฏิบัติงาน

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำโครงงานพิเศษนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในการเบิกสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือการทดลอง

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่ให้โอกาสได้มาศึกษาเล่าเรียน ทั้งยังคอยสนับสนุนเป็นแรงผลักดันและเป็นกำลังใจที่สำคัญเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อนๆรวมถึงบุคคลอื่นๆที่มิได้กล่าว ณ ที่นี้ ที่ป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดมาจนทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จสมบูรณ์ ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

พรไพลิน พินิจรอบ
รัตติกานต์ สระแก้ว
สุภิญญา แสงรังษี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขต	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes)	3
2.2 แหล่งที่พบ	5
2.3 เอนโดไฟติคแอคติโนมัยสีท (Endophytic actinomycetes)	5
2.4 ชีววิทยาทั่วไปของแอคติโนมัยสีท	5
2.5 วงชีวิตของแอคติโนมัยสีท	5
2.6 สัณฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของแอคติโนมัยสีท	6
2.6.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยใช้ Spore ที่อยู่ใน Sporangium	6
2.6.1.1 การสร้างโคโลนี	6
2.6.1.2 โครงสร้างภายในเส้นใย	7
2.6.1.3 รูปร่างลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยสีท	7
2.6.1.4 ลักษณะการเกิดสปอร์แบบต่างๆ	8
2.6.2 การแตกหักเป็นท่อน (Fragmentation)	12
2.7 โครงสร้างที่สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกในระดับสกุล	13
2.7.1 เส้นใย (Mycehm)	13
2.7.2 โคนิเดีย (Conidia)	13
2.7.3 อับสปอร์	13
2.7.4 โครงสร้างอื่นๆ	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8 บทบาทและความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยสีท	14
2.8.1.1 การสร้างสารปฏิชีวนะ	14
2.8.1.2 การสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช	17
2.8.1.3 การย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์	17
2.8.1.4 การตรึงไนโตรเจน	18
2.9 ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีท	18
2.10 พืชสมุนไพรไทยที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอล	19
2.10.1 ยี่หร่า	19
2.10.2 ฟ้าทลายโจร	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	23
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ	23
3.2 พืชสมุนไพร	23
3.3 สารเคมี	23
1. สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ	23
2. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ	23
3. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ	23
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	24
3.5 เครื่องแก้ว อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ	24
3.6 ขั้นตอนการดำเนินการ	25
1. การเตรียมตัวอย่างพืช	25
2. การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของพืชและการบ่มเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท	25
3. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท	25
4. ทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ Primary screen	26
5. สกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ	27
6. การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพโดยวิธี Agar disc diffusion	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
7. การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์	28
7.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท	28
8. การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์	28
8.1 ศึกษาลำดับกรดนิวคลีอิคของ 16s rRNA	28
1) การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์	28
2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerasechain reaction ; PCR)	29
3) การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)	29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	30
4.1 ผลการคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรตัวอย่าง	30
4.2 ผลการการคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทขั้นต้น (Primary screen)	31
4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น (Phenotype characterization)	43
- กลุ่มที่ 1	43
- กลุ่มที่ 2	45
- กลุ่มที่ 3	46
- กลุ่มที่ 4	47
- กลุ่มที่ 5	48
- กลุ่มที่ 6	49
- กลุ่มที่ 7	50
- กลุ่มที่ 8	51
- กลุ่มที่ 9	52
- กลุ่มที่ 10	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 ผลของการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบโดยวิธี Agar disc diffusion	54
4.5 การศึกษาลักษณะทาง Genotype ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทโดยการศึกษาลำดับเบสที่ 16s rRNA	57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก ก	68
ภาคผนวก ข	70
ภาคผนวก ค	71
ภาคผนวก ง	94
ภาคผนวก จ	114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	29
3.2	วงจรพีซีอาร์ (PCR cycles)	29
4.1	จำนวนไอโซเลทของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทั้งหมดที่แยกได้จากพืชสมุนไพรยี่หร่า (*Cuminum cyminum*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*)	30
4.2	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 1	32
4.3	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 2	33
4.4	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 3	34
4.5	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 4	35
4.6	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 5	36
4.7	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 6	37
4.8	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 7	38
4.9	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 8	39
4.10	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของฟ้าทะลายโจรกลุ่มที่ 9	40
4.11	ผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของฟ้าทะลายโจรกลุ่มที่ 10	41
4.12	ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท	42
4.13	ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบของยี่หร่าไอโซเลท CMR-17	54
4.14	ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรไอโซเลท APR-1	55
4.15	ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบโดยวิธี Agar disc diffusion	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่แตกต่าง	3
2.2	ลักษณะเส้นใยของแอคติโนมัยสีท	4
2.3	วงจรชีวิตของแอคติโนมัยสีท	6
2.4	การสร้างสปอร์เดี่ยวของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora*	8
2.5	ลักษณะสปอร์คู่และสปอร์แบบเส้นสายของเชื้อแอคติโนมัยสีท	9
2.6	ชนิดของสปอร์สายยาวแบบต่างๆ ที่สร้างโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*	10
2.7	รูปทรงของอัปสปอร์ที่เจริญบนอาหาร	11
2.8	รูปทรงของอัปสปอร์	11
2.9	ก้านชูสปอร์และการจัดเรียงตัวของสปอร์แบบต่างๆ	12
2.10	ลักษณะดอกและใบของยี่หร่า	19
2.11	ลักษณะลำต้น ใบ และดอกของฟ้าทะลายโจร	21
2.12	สูตรโครงสร้างของสาระสำคัญที่พบในสมุนไพรฟ้าทะลายโจร	22
3.1	ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหาร ISP2	26
3.2	เชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหาร ISP2	26
3.3	เทคนิค primary screen	27
4.1	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-50 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	32
4.2	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-13 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	33
4.3	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-30 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	34
4.4	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-17 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	35
4.5	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-42 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	36
4.6	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-45 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	37
4.7	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-62 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	38
4.8	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-55 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	39
4.9	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท APR-1 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	40
4.10	ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท APR-21 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด	41
4.11	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-50	44
4.12	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-13	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.13	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-30	46
4.14	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-17	47
4.15	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-42	48
4.16	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-45	49
4.17	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-62	50
4.18	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-55	51
4.19	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท APR-1	52
4.20	เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท APR-11	53
4.21	บริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบยี่หร่าไอโซเลท CMR-17	55
4.22	บริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดฟ้าทะลายโจรไอโซเลท APR-1	56
4.23	บริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบยี่หร่าไอโซเลท CMR-17	58
4.24	บริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบยี่หร่าไอโซเลท APR-1	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายกับราสามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (Substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (Aerial mycelium) สามารถพบได้ทั่วไปทั้งในดินและพืช รวมถึงสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ แอคติโนมัยสีทมีระบบสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ 2 แบบ คือ สืบพันธุ์โดยการสร้างเส้นใย (Mycelium fragmentation) และ สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ Sporulation (ศรีสกุล, 2553) แอคติโนมัยสีทสามารถอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ เช่น พืชโดยไม่ทำอันตราย เรียกว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท พบได้ตามเนื้อเยื่อของ ราก เหง้า ลำต้น และใบ ในพืชหลากหลายชนิด (ศรีสกุล, 2553) แอคติโนมัยสีทมีบทบาทสำคัญในการผลิตสารทุติภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทำให้มีความสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการเกษตร, ยา และ อุตสาหกรรมการแพทย์ เช่น ยาปฏิชีวนะ (Hasegawa *et al.*, 2006)

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายของพืชสมุนไพรท้องถิ่น ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร *(Andrographis paniculata)* และยี่หร่า (*Cuminum cyminum)* มีรายงานการวิจัยศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดยี่หร่า ผลจากการศึกษาพบว่ายี่หร่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* และ *Escherichia coli* (รองเดช, 2547) และรายงานการศึกษาสารสกัดจากฟ้าทะลายโจรต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ผลจากการศึกษาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดมี 2 ชั้นคือ สารสกัดฟ้าทะลายโจรชั้น Ethyl acetate และสารสกัดฟ้าทะลายโจรชั้น Hexane สารสกัดที่ยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* ได้ดีที่สุด คือสารสกัดฟ้าทะลายโจรชั้น Ethyl acetate และสารสกัดที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 8739 ได้ดีที่สุดคือสารสกัดฟ้าทะลายโจรชั้น Ethyl acetate (นพปฏล, 2558)

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทหลังจากฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธี Surface Sterilization และคัดแยกเชื้อบนอาหาร Starch casein agar โดยวิธี spread plate จากนั้นเมื่อได้เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทบริสุทธิ์แล้วจึงนำไปจัดจำแนกชนิดโดยทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น ศึกษาสัณฐานวิทยา และนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Candida albicans* ATCC10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC28753, *Micrococcus luteus* ATCC2592 และMethicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ผู้วิจัยคาดหวังว่าจะได้สายพันธุ์ของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทใหม่ๆ ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดทางด้านการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจาก ยี่หร่า (*Cuminum cyminum*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*)

2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากน้ำหมักเชื้อ เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Candida albicans* ATCC10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC28753, *Micrococcus luteus*ATCC25923 และ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA)

3. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

4. เพื่อระบุสกุลและชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16s rRNA และจัดทำสายวิวัฒนาการ Phylogenetic tree

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด คือ ยี่หร่า (*Cuminum cyminum*) และ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) โดยใช้ส่วนประกอบของพืช คือ ราก ลำต้น และใบ ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่บริเวณพื้นผิว (Surface sterilization) เลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร ISP2 เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น (Primary screen) เพื่อคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ และทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเพื่อหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยใช้เชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633 , *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Candida albicans* ATCC10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC28753, *Micrococcus luteus* ATCC25923 และ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) และศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ โดยทำการสกัด DNA และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA เพื่อนำไปจัดทำสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เพื่อระบุสกุลและชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเรียนรู้เทคนิคการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรยี่หร่าและฟ้าทะลายโจร เทคนิคการเตรียมอาหารและเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท เทคนิคการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การสกัดดีเอ็นเอ และการจัดทำ Phylogenetic tree

2. ทราบถึงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes)

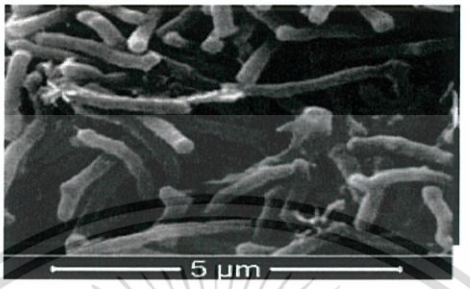
เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่สามารถสร้างเส้นใยลักษณะคล้ายเชื้อราแต่มีลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อรา คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสจึงจัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต (Prokaryote) นอกจากนี้เส้นใยและสปอร์ของแอคติโนมัยสีทมีขนาดเล็กกว่าเชื้อรา โดยเฉลี่ยเส้นใยของแอคติโนมัยสีทมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 ถึง 10 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.1)

รูปที่ 2.1 แสดงแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่แตกต่าง
ที่มา : http://www.rspg.org/microbiology/micro_01.htm

เส้นใยแอคติโนมัยสีทมี 2 ประเภท คือ เส้นใยอาหาร (Substrate hypha) และเส้นใยอากาศ (Aerial hypha) เส้นใยทั้งสองประเภทมักมีผนังกั้นและยืดยาวออกที่ส่วนปลายของเส้นใยและมีส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) ทำหน้าที่ห่อหุ้มส่วนของไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) ที่ประกอบด้วยสารพันธุกรรมทั้งดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) และไรโบโซม (Ribosome) ตลอดจนสารต่างๆที่สะสมภายในเซลล์ นอกจากนี้อาจพบมีโซโซม (Mesosome) ซึ่งจะเชื่อมต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์ (Vobis, 1997) โคโลนีของแอคติโนมัยสีทมีลักษณะจำเพาะและแตกต่างจากโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่น โคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการเกิดจากเส้นใยที่อัดกันแน่นเป็นก้อนแข็ง มักสังเกตเส้นใยบางส่วนฝังอยู่ในเนื้อวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีของแอคติโนมัยสีทหลายสกุลมักปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศทำให้มีลักษณะเป็นฝุ่นผงแห้ง เส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ มักมีสีเฉพาะในแต่ละสปีชีส์ (รูปที่ 2.2) บางสปีชีส์สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ การสร้างโคโลนีของแอคติโนมัยสีทเริ่มจากการถ่ายชิ้นส่วนของเชื้อไม่ว่าจะเป็นสปอร์เดี่ยว (Single spore) สปอร์ที่อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ (Sporangium) หรือเส้นใยที่เกิดจากการแตกหักไปเลี้ยง บนอาหารแข็ง ชิ้นส่วนต่างๆนี้จะเริ่มงอกเส้นใยใหม่แทงลงไปใต้ผิวอาหาร เรียกว่า เส้นใยอาหาร จากนั้นจะมีการสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นบนอากาศ เรียกว่า เส้นใยอากาศ รวมตัวกันเป็นกลุ่มเส้นใย (Mycelium) ที่อัดตัวแน่น โดยทั่วไปแอคติโนมัยสีทมีการสร้างเส้นใย 2 แบบ แต่อาจพบแอคติโนมัยสีทบางสกุลที่มีการสร้างเฉพาะเส้นใยอาหาร ไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เช่น สกุล *Micromonospora, Salinpora* และ *Actioplanes* เป็นต้น นอกจากนี้แอคติโนมัยสีทบางสกุลอาจพบเพียงการสร้างเส้นใยอากาศสั้นๆ เช่น สกุล *Sporichthya* จึงทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นเส้นใยที่ฝังลงไปในวุ้น โคโลนีของแอคติโนมัยสีทมักมีการเจริญแบบเป็นวงกระจายจากจุดศูนย์กลางในแนว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รัศมี อาจมีลักษณะนูน (Raise) เรียบแบน (Flat) บางครั้งอาจมีการปกคลุมแบบชั้นที่เหนียวคล้ายหนัง (Leather) มีลักษณะแข็ง ความแข็งของโคโลนีอาจมีตั้งแต่ระดับที่อ่อนมากจนถึงโคโลนีที่แข็งมาก สีโคโลนีมีตั้งแต่สีขาว เหลือง ส้ม แดง ม่วง ชมพู ฟ้า เขียว น้ำตาลและดำ ผิวของโคโลนีมีลักษณะเรียบ (Smooth) เป็นสันนูน (Ridged) เหี่ยวย่น (Wrinkled) เป็นตุ่ม (Granular) หรือเป็นเกล็ด (Squamous) ส่วนขนาดของโคโลนีจะขึ้นอยู่กับสปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญ



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะเส้นใยของแอคติโนมัยสีท
ที่มา : http://www.thai-explore.net/search_detail/result/844

แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ การเรียงตัวของสปอร์มีความหลากหลาย อาจเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือการสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวโดยไม่มีสิ่งที่ห่อหุ้มสปอร์ เรียกว่า โคนิเดีย (Conidia) อยู่บนเส้นใยอากาศหรือบางสกุลอาจสร้างสปอร์ภายในโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุงหุ้ม เรียกว่า สปอร์แรงเจียม (Sporangium) มีหลายรูปแบบ เช่น ทรงกลม (Sphearical Sorangium) รูปแท่งคล้ายนิ้วมือ (Finger like sporangium) จนถึงมีรูปร่างไม่แน่นอนแอคติโนมัยสีทมักสร้างสปอร์เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญแต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญ เช่น มีสารอาหารเพียงพอ อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม สปอร์จะงอกและเจริญเป็นเส้นใย แอคติโนมัยสีทมีความสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น แหล่งน้ำจืด มหาสมุทร ขั้วโลก ทะเลทราย เนื้อเยื่อพืช สัตว์ คน โดยเฉพาะในดินจัดเป็นแหล่งที่อยู่ของแอคติโนมัยสีทมากที่สุดเพราะในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์จะมีเชื้ออยู่มาก เชื้อเหล่านี้สามารถย่อยสลายและดูดซึมสารอินทรีย์ที่มีอยู่เพียงเล็กน้อยในดินเป็นแหล่งอาหาร แอคติโนมัยสีททั่วไปเจริญได้ดีในดินที่มีน้ำขังหรือดินตะกอนใต้น้ำ เนื่องจากเป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเซลล์ไม่ทนต่อความแห้งแล้งแต่สปอร์สามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดี

แอคติโนมัยสีทสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้ดี ดังนั้นจึงสามารถพบแอคติโนมัยสีทได้ในดินที่มีสภาวะเป็นกลางถึงด่างในทางตรงกันข้ามแอคติโนมัยสีททนต่อสภาวะดินที่เป็นกรดได้ไม่ดีนัก พบว่าถ้าค่าความเป็นกรด – ด่าง ของดินต่ำกว่า 5 ประชากรของแอคติโนมัยสีทอาจลดลงเหลือเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (Coyne, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แหล่งที่พบ

ดินจัดเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของแอคติโนมัยสีท ดังนั้นความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทในดินจึงมีสูงมาก ทำให้สามารถพบเชื้อได้เป็นจำนวนมากและหลายชนิด โดยพบได้ทั้งในดินสำหรับทำการเกษตร ดินธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์ในภูมิภาคต่างๆทั่วทุกแห่งของโลก โดยทั่วไปเชื้อกลุ่มนี้ดำรงชีวิตแบบอิสระสามารถเจริญได้โดยอาศัยการย่อยสลายสารอินทรีย์แต่พบเชื้อบางสกุล เช่น *Frankie* มักอาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชและต้นไม้ใหญ่โดยมีส่วนร่วมในการตรึงไนโตรเจนแก่พืช รวมถึงการพบในเนื้อเยื่อพืช เรียกว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท เป็นต้น

2.3 เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท (Endophytic actinomycetes)

เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่สามารถสร้างเส้นใย ทำให้มีลักษณะคล้ายเชื้อราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและสามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่ทำให้ให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้นๆ

2.4 ชีววิทยาทั่วไปของแอคติโนมัยสีท

ในทางวิทยาศาตร์ แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างหลายแบบ กลม ท่อน หรือเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราโดยอาจเป็นเส้นสายที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศหรืออาจจะเป็นเส้นสายที่มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ ซึ่งโครงสร้างของสปอร์มีทั้งแบบที่มีถุงหุ้มและไม่มีถุงหุ้ม แบคทีเรียแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน แต่ก็มีบางชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนหรือต้องการก็เพียงเล็กน้อย

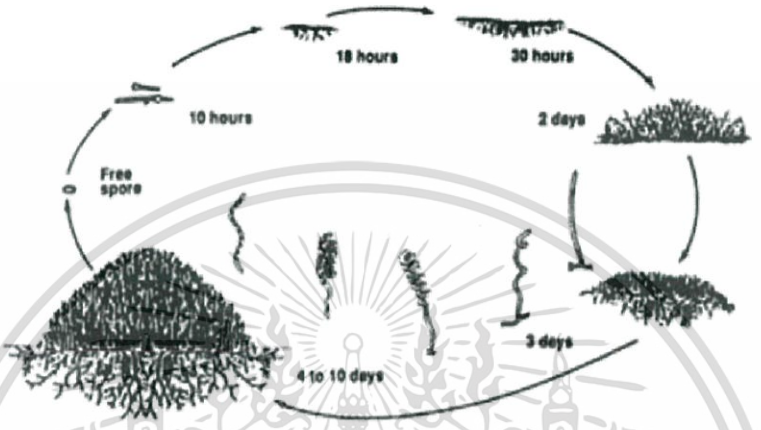
ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ความเข้าใจทางด้านชีววิทยาของแอคติโนมัยสีทเริ่มกว้างขวางมากขึ้น และในทางก้าวหน้านี้ ทำให้ต้องมีการเปลี่ยนคำนิยามที่เคยเรียกแอคติโนมัยสีทจากเดิมว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างลักษณะเป็นเส้นใย มีการแตกแขนงของกิ่งก้านในช่วงกาลเวลาหนึ่งของวงชีวิต มาเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ mol% ของกัวนีนและไซโตซีน (G+C) สูง และได้ขยายขอบเขตของการจัดกลุ่มทางอนุกรมวิธานรวมไปถึงเชื้อแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม อย่างในสกุล *Micrococcus* นอกจากนั้น ยังเป็นที่ทราบกันดีอีกว่าความแตกต่างของคุณสมบัติทาง สัณฐานวิทยา ได้ทำให้นักวิจัยมีความสนใจในเรื่องนี้มากขึ้นโดยเฉพาะเมื่อมีการศึกษารูปร่างลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน ซึ่งยังเป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อการช่วยบอกความแตกต่างทาง สัณฐานวิทยา (ศรีวิบูลย์, 2548) นอกจากนี้การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ยังคงเป็นสิ่งที่สำคัญในการช่วยบอกความแตกต่างในระดับโมเลกุลเช่นกัน (Taechowisan *et al.*, 2009)

2.5 วงจรชีวิตของแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เจริญโดยอาศัยออกซิเจนและสารอินทรีย์มีการสร้าง Aerial spores จำนวนมากเพื่อแพร่พันธุ์วงชีวิต เริ่มจากเมื่อสปอร์ตกลงในบริเวณที่เหมาะสม เกิดการงอกเป็นเส้นใยอยู่ใต้อาหาร เรียกว่า Substrate mycelium เส้นใยเหล่านี้จะมีการแตกแขนงและขยายวงกว้างเพื่อดูดซึมธาตุอาหาร ต่อมาจะมีการสร้างเส้นใยที่โผล่พ้นผิวโคโลนีขึ้นในอากาศ เรียกว่า Aerial mycelium และพัฒนาไปเป็นสปอร์บน Sporophores ในระยะนี้อาหารเริ่มเป็นปัจจัยจำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่สังเคราะห์สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ สารเมตาโบไลท์ยังมีบทบาทกระตุ้นให้เกิด Differentiation เปลี่ยนแปลงจาก Vegetative cell กลายเป็นสปอร์จำนวนมากอยู่บนก้านชูสปอร์ที่เกิดขึ้นในอากาศ เมื่อสปอร์พัฒนาเต็มที่สามารถแพร่กระจายไปตามลม (วิโรจน์, 2549) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 แสดงวงจรชีวิตของแอคติโนมัยซีท
ที่มา : Buschur *et al.* (2011)

2.6 สัณฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของแอคติโนมัยสีท

2.6.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยใช้ Spore ที่อยู่ใน Sporangium

2.6.1.1 การสร้างโคโลนี

โคโลนีของแอคติโนมัยสีทเกิดจากการรวมตัวของเส้นใยการเกิดโคโลนีใหม่อาจเริ่มจากการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งอาจเป็นเพียงสปอร์หรือ 1 อับสปอร์ หรือ 1 ท่อนของเส้นใยของชิ้นส่วนเล็กๆของโคโลนีเก่าๆเชื้อจะเริ่มเจริญเป็นเส้นใยแทรกลงไปในอาหารวุ้นเส้นใยใต้ผิวอาหาร จะเรียกว่า Primary mycelium หรือ Substrate mycelium หลังจากนั้นจึงมีการเจริญเส้นใยในแนวตั้งขึ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อและกลายมาเป็น Secondary mycelium หรือ Aerial mycelium จะเป็นส่วนที่สัมผัสอากาศความแตกต่างระหว่างธรรมชาติที่ชอบน้ำของเส้นใยใต้ผิวอาหารและธรรมชาติที่ไม่ชอบน้ำของเส้นใยเหนือผิวอาหารนี้ยังเป็นที่น่าสงสัยมากและที่สามารถสังเกตได้ง่ายๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เมื่อเรามองเห็นเส้นใยแทงใต้ผิวอาหารจะยอมให้แสงผ่านเห็นเป็นเส้นใยใสๆและมีพื้นสีเข้ม ขณะที่เส้นใยเหนือผิวอาหารจะตรงกันข้าม คือจะสะท้อนแสงขณะที่พื้นสว่างความแตกต่างของเส้นใยใต้ผิวอาหารและเส้นใยเหนือผิวอาหารจึงมีลักษณะหลักของการพิจารณารูปร่างลักษณะภายนอกและภายในของโคโลนี ยกตัวอย่าง เช่น *Streptomyces* อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ที่มีอะไรที่แตกต่างไปจากนี้บ้าง เช่น *Sporichthya* พบแค่ Aerial hyphae เท่านั้น โคโลนีของแอคติโนมัยซีทอาจยกสูงขึ้น (Raise) หรือ มีลักษณะแบน (Flat) หรือบางทีก็อาจปกคลุมด้วยชั้นที่คล้ายกับหนังสัตว์ มีตั้งแต่โคโลนีที่อ่อนมากและอ่อนนุ่มไปจนถึงโคโลนีที่แข็งมากๆ นอกจากนี้ยังมีสีที่หลากหลาย ผิวหน้าโคโลนีอาจเรียบ (Smooth) เป็นสันนูน (Ridged) เหี่ยวย่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Wrinkled) เป็นเม็ดๆ (Granular) หรืออาจพบเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส (Squamous) บางโคโลนีอาจอัดกันแน่นหรืออาจมีหลายๆโซนของการเจริญลักษณะของโคโลนีที่เป็นวงๆ หรือกระจายออกจากจุดศูนย์กลางในลักษณะรัศมีและมักมีสองโซน ส่วนขนาดของโคโลนีจะขึ้นอยู่กับอายุและภาวะของการเจริญและอาจมีความแตกต่างกันได้ตั้งแต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตรขึ้นไปจนถึงหลายเซนติเมตร

2.6.1.2 โครงสร้างภายในเส้นใย

เส้นใยเดี่ยวๆ มีความหนาประมาณ 0.4 – 1.3 ไมโครเมตร โดยปกติแล้วจะมีผนังกั้นและยืดยาวออกที่ส่วนปลายเส้นใยและสามารถสร้างเป็นกิ่งแขนง โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะที่มีการเจริญองค์ประกอบภายในเซลล์ของเส้นใยก็เช่นเดียวกันกับองค์ประกอบของโปรคาริโอตทั่วๆไป คือ มีไซโทพลาสซึม ที่มี Fibrillar DNA และมี Ribosome และโครงสร้างขนาดเล็กที่อยู่ภายในเซลล์หลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างที่สะสมอาหาร เช่น โพลีฟอสเฟตไลปิด หรือสารโพลีแซคคาไรด์ มีเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) และอาจมีมีโซโซมซึ่งจะต่อเชื่อมกับโครงสร้างของผนังเซลล์ โดยผนังของเส้นใยจะประกอบด้วยผนังชั้นเดียว หนาประมาณ 10-20 นาโนเมตร ผนังกั้นเส้นใยของ Vegetative hyphae ที่ไม่แตกหัก ก็มีลักษณะโครงสร้างเช่นเดียวกันและจะเรียกว่าเป็นโครงสร้างผนังกั้นเซลล์ชนิดที่ 1

2.6.1.3 รูปร่างลักษณะสปอร์ของแอคติโนมัยสีท

นอกจากการเจริญของเส้นใยแล้วการสร้างสปอร์ก็เป็นปัจจัยสำคัญทางสัณฐานวิทยาที่ทำให้สามารถจำแนกลักษณะของแอคติโนมัยสีทได้ สมัยก่อนนั้นหลายคนอาจคิดว่าการสร้างสปอร์นั้นจำกัดอยู่เพียงแอคติโนมัยสีทในกลุ่ม Sporoactinomycetes เท่านั้น ในขณะที่ขบวนการสร้างสปอร์นั้นเกิดขึ้นในส่วนของเส้นใยทั้งนี้ไม่รวมกรณีของ Nocardioform actinomycetes ที่มีการแตกหักของเส้นใยเหมือนกัน และในบางสกุลก็ยากที่จะแยกความแตกต่างของสปอร์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ดังนั้นด้วยเหตุผลนี้ขบวนการสร้างสปอร์จึงมีความหมายรวมไปถึงการแตกหักของเส้นใยเป็นท่อนๆด้วย ซึ่งสามารถเห็นได้จากแอคติโนมัยสีทในสกุล *Nocardia, Nocrdiopsis, Oerskovia , Promicromonospora* และ *Inteasporangium*

สปอร์นั้นอาจเกิดขึ้นเดี่ยวๆหรือเกิดขึ้นเป็นสายสั้นๆและโดยทั่วไปแล้วจะมีความหนามากกว่าเส้นใยแต่ในบางชนิดที่มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวๆมักจะมีขนาดสปอร์ที่มีความหนาเท่ากันกับขนาดของเส้นใย สปอร์มีความหนาประมาณ 1-2 ไมโครเมตรและมีรูปร่างหรือตัวสปอร์ที่แตกต่างกันไป

สปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (Planospores หรือ Zoospores) มักจะมีแฟลกเจลลาซึ่งทำให้สามารถเคลื่อนที่ในน้ำได้ สปอร์ที่พบแฟลกเจลลา เพียง 1 อัน เรียกว่า Monotrichous เช่น ใน *Sporichthya* ถ้ามีหลายๆแฟลกเจลลาโดยรอบสปอร์ เช่นใน *Actinosynnema* และ *Catenuloplanes* เรียกว่า Peritrichous สปอร์ที่พบหลายๆอันเป็นกลุ่ม เรียกว่า Polytrichous เช่น ใน *Actinoplanes* สปอร์ที่พบแฟลกเจลลา อยู่ที่บริเวณขั้วใดขั้วหนึ่งของสปอร์ เรียกว่า Lophotrichous เช่น ใน *Ampullariella* หรืออาจพบใกล้ๆขั้วเซลล์ เช่น ใน *Spirllospora* หรืออยู่ที่บริเวณด้านข้างของเซลล์ เช่น ใน *Pilimelia* ซึ่งถ้าเป็นซูสปอร์ก็จะมีผิวสปอร์ที่เรียบ

สปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ (Aplanospore) อาจมีผิวเรียบหรือผิวที่ขรุขระแบบต่างๆซึ่งได้มีการศึกษา Ultrastructure พบว่า *Streptomyces* นั้นมีผิวสปอร์หลายแบบ เช่น ผิวเรียบ (Smooth) มีขน (Hairy) เป็นหนามแหลม (Spine) เป็นปุ่มๆ (Warty) เหี่ยวย่น (Rugose) หรือ ตุ่มเล็กๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Tuberculate) เป็นต้น ซึ่งลักษณะของผิวสปอร์หลายๆลักษณะนี้สามารถพบได้ในสกุล *Actinomadura* , *Microtetrapora* และ *Microbispora* ได้เช่นกัน ผิวสปอร์ชนิดเป็นตุ่มและดอกเล็กๆค่อนข้างหายาก ส่วนสปอร์ชนิดผิวที่มีหนามไม่แหลมสร้างขึ้นที่เส้นใยใต้ผิวอาหารและเป็นสปอร์ที่ปกคลุมด้วย Fiber sheath ซึ่งโดยปกติแล้วถ้าผิวสปอร์มีลักษณะเหมือนมีก็สิ่งที่มาหุ้ม คือ Fibrous sheath ซึ่งกรณีที่ผิวสปอร์เป็นหนามไม่แหลมแบบนี้อาจเกิดจากผิวชั้นนอกของสปอร์เจริญมาเป็นปุ่มๆ ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะแล้วจะเหมือนกับพื้นผิวของผนังเส้นใยที่ทำให้เกิดสปอร์นั้น

2.6.1.4 ลักษณะการเกิดสปอร์แบบต่างๆ

แอคติโนมัยสีทมีการสร้างสปอร์อยู่ 3 ลักษณะใหญ่ๆ คือ สปอร์เดี่ยวๆ สปอร์ที่ต่อกันเป็นเส้นสายและสปอร์ที่ถูกสร้างอยู่ในอับสปอร์

2.6.1.4.1 สปอร์แบบเดี่ยว (Single spore)

เรียกสปอร์ชนิดนี้ว่า Monosporous พบได้ในหลายๆสกุล เช่น *Micromonospora* ซึ่งมีก้านชูสปอร์เกิดอยู่บนเส้นใยใต้ผิวอาหารหรือบางครั้งเป็นสปอร์ชนิดไม่มีก้านหรือมีก้านสั้นๆ หรืออาจอยู่เป็นกระจุกการเกิดสปอร์มักเริ่มที่ปลายเส้นใยมีการขยายขนาดขึ้นต่อจากนั้นมีการสร้างผนังกั้นใน สกุล *Thermomonaspora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวๆที่ปลาย Aerial hyphae หรืออาจสร้างอยู่บน Sporphore ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนงเมื่อมีการแตกแขนงซ้ำๆและมีก้านสั้นก็จะทำให้เห็นสปอร์อยู่รวมกันเป็นกระจุก การสร้างสปอร์อาจเกิดขึ้นที่เส้นใยใต้ผิวอาหารด้วย ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยสีทอื่นๆ ที่สร้างสปอร์เดี่ยวๆ เช่น *Saccharomonospora* ซึ่งสร้างสปอร์ที่เส้นใยเหนือผิวอาหารเป็นก้านชูสปอร์ที่แตกกิ่งแขนง สปอร์มีลักษณะรูปไข่ติดอยู่ที่ปลายก้านชูสั้นๆ เนื่องจากเป็นสปอร์ที่ไม่สร้างสี สปอร์มีการเจริญมาจากปลายของแขนงของเส้นใย (รูปที่ 2.4)

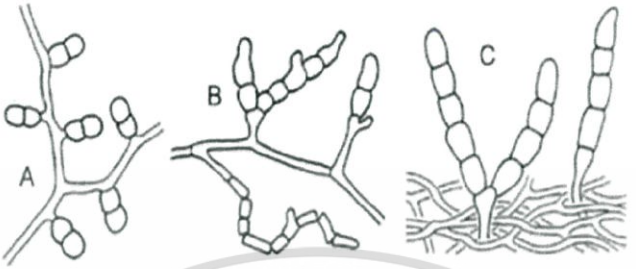
รูปที่ 2.4 แสดงการสร้างสปอร์เดี่ยวของเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Micromonospora* สกุล *Thermomonospora* (B) *Saccharomonospora* (C) *Micromonospora*
ที่มา : www.thapra.lib.su.ac.th

2.6.1.4.2 สปอร์เรียงตัวเป็นเส้นสาย (Spore formed in chains)

เมื่อมีการสร้างผนังกั้นเส้นใยขึ้นในแต่ละห้องก็สามารถเปลี่ยนไปเป็นสปอร์ได้และการสร้างสปอร์แบบนี้เกิดขึ้นส่วนใหญ่ในแอคติโนมัยสีทการเรียกชนิดสปอร์จะเรียกตามลักษณะความยาวหรือตามจำนวนสปอร์ เช่น ถ้ามี 2 สปอร์ เรียก Di-หรือ Bisporous ถ้ามีประมาณ 7-20 สปอร์ เรียก Oligosprous ถ้ามีหลายๆสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว เรียก Polysporous ส่วนที่พบสปอร์เรียงตัวกันตามความยาว 2 สปอร์ พบในสกุล *Microbispora* ซึ่งเป็นแบบที่หายาก โดยสปอร์มีลักษณะกลมหรือรูปไข่และมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2-3 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่เป็น 3-4 เท่าของความหนาของเส้นใยและอาจพบเรียงตัวอยู่ที่ Aerial hyphae หรือ อยู่บนก้านชูสปอร์ที่สั้นมากๆ การสร้างสปอร์จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มต้นจากที่มีการแตกหน่อ ที่ด้านข้างของ Aerial hyphae สร้างเป็นแขนงด้านข้างสั้นๆและขยายขนาดขึ้นพร้อมกับมีผนังกั้นห้องตรงกลางลักษณะของการเรียงตัวแบบนี้ พบได้ในสกุล *Actinomadura echinospora* และ *Actinomadura rugatobispora* ด้วย (รูปที่ 2.5)



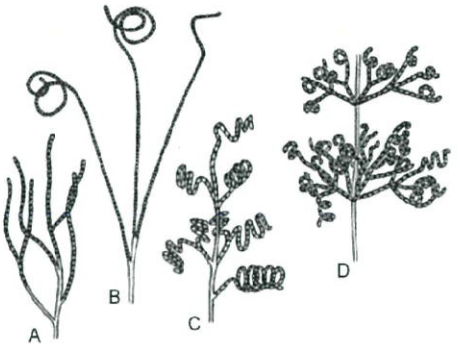
รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะสปอร์คู่และสปอร์แบบเส้นสายของเชื้อแอคติโนมัยสีท
(A) การสร้างสปอร์คู่ของ *Microbispora* (B) สปอร์สายสั้นของ *Nocardia brevicatena*
(C) สปอร์สายสั้นของ *Catellatospora*
ที่มา : www.thapra.lib.su.ac.th

สปอร์สายสั้นๆ สามารถพบได้ใน *Sporichthya polymorpha* ในขณะที่ Aerial hyphae สามารถแบ่งออกเป็นสปอร์ที่มีรูปร่างแท่งหรือกลม ส่วนใน *Catellatospora* สร้างสปอร์เป็นสายตรงหรือโค้งงอ และมีประมาณ 5-30 สปอร์ ซึ่งเจริญขึ้นมาจากเส้นใยใต้ผิวอาหารโดยตรงจากก้านชูที่แตกแขนงหรืออาจไม่แตกแขนง ในสกุล *Herbidospora* มีการสร้างสปอร์ต่อเป็นสายตรงหรือโค้งงอ เจริญขึ้นมาจากเส้นใยใต้ผิวอาหารเช่นกัน แต่มีการชูสปอร์เป็นกลุ่ม

ตัวอย่างแอคติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์จำนวนมาก คือ *Streptomyces* ซึ่งสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว ปกติแล้วมีมากกว่า 50 สปอร์ สปอร์ของ *Streptomyces* และ *Polysprous Actinomycetes* อื่นๆ มักเรียกว่า Arthrouspore ใน *Streptomyces* ส่วนมากแล้วสร้างสปอร์ขึ้นที่เส้นใยเหนือผิวอาหารและมีหลายลักษณะต่างๆกัน ดังนี้ (รูปที่ 2.6)

1. Ractiflexibiles เป็นลักษณะเส้นสายของสปอร์ที่ตรงและมีการโค้งงอเล็กน้อย
2. Retinaculiaperti เส้นสายสปอร์มีลักษณะเป็นตะขอ หรือห่วงปลายเปิดหรือที่ปลายมีการบิดเป็นเกลียวสั้นๆ 1-3 รอบ
3. Spirales เส้นสายสปอร์มีการบิดเป็นเกลียว อาจเป็นเกลียวที่ชิดกันแน่นๆหรืออาจเป็นเกลียวหลวมๆ หรือเป็นเกลียวต่างๆยาวและมีปลายเปิด
4. Verticillati เป็นสายสปอร์เรียงตัวแบบ Whorls และมีแขนงแบบ Umbels สปอร์ที่สร้างอยู่ภายในถุงหุ้ม (Spores formed within sporangia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

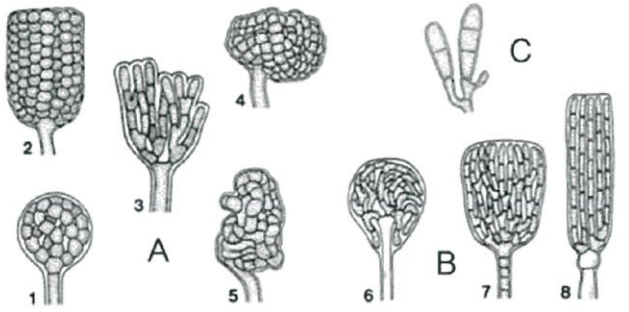


รูปที่ 2.6 แสดงชนิดของสปอร์สายยาวแบบต่างๆที่สร้างโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces*
(A) rectiflexibiles (B) retinaculiaperti (C) spira (D) verticillati
ที่มา : www.thapra.lib.su.ac.th

2.6.1.4.3 สปอร์ที่สร้างอยู่ภายในอับสปอร์ที่อยู่ในถุงบรรจุสปอร์หรือสปอแรงเจีย (sproesformed withinsporangia)

การสร้างสปอร์อยู่ภายในอับสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายเป็น Vesicle โดยสปอร์จะถูกปล่อยออกมาภายนอกเมื่อแก่ก็จะเหลือเพียงอับสปอร์ว่างๆ อับสปอร์ของแอคติโนมัยสีทมีรูปร่างและขนาดหลายแบบมีตั้งแต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-50 ไมโครเมตร ขนาดที่พบได้ทั่วไป คือ 10 ไมโครเมตรและรูปร่างลักษณะของอับสปอร์อาจจะมีตั้งแต่ทรงกระบอก คล้ายกระบอง คล้ายท่อยาว คล้ายขวด คล้ายระฆัง คล้ายลูกแพร์ มีลักษณะกลมแป้น หรืออาจมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน มีลักษณะเป็นก้อนๆ การเรียกชื่อของอับสปอร์ที่พบอยู่ภายใน อับสปอร์ที่มี 2-3 จนถึง 5 สปอร์ อยู่ภายนอกอาจ เรียกว่า Oligosporous sporangia ถ้ามีอยู่ 1 สปอร์ เรียกว่า Monosporous sporangia และถ้ามีอยู่ 2 สปอร์ เรียกว่า Biosporous sporangia อับสปอร์ที่สร้างสปอร์เป็นจำนวนมากอยู่ภายใน จะเรียกว่า Polysporous sporangia โครงสร้างการเรียงตัวของสปอร์มีหลายลักษณะ โดยมีตั้งแต่ลักษณะบิดเป็นเกลียวหรือเรียงตัวขนานเป็นแถว อย่างไรก็ตามสปอร์ทั้งหมดจะถูกห่อหุ้มไว้ด้วยผนังของอับสปอร์ ซึ่งจะกลายเป็นผนังชั้นนอกของอับสปอร์ ยกเว้น ในสกุล *Streptosporangium* และ *Kutzneria* ซึ่งภายในอับสปอร์เคลื่อนที่ได้ (รูปที่ 2.7 และ 2.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



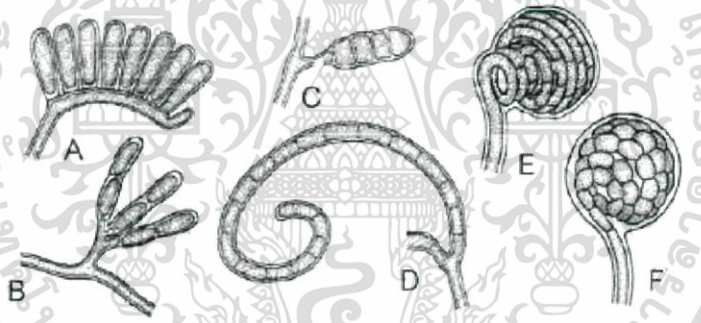
รูปที่ 2.7 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนอาหาร

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*

ที่มา : www.thapra.lib.su.ac.th



รูปที่ 2.8 รูปทรงของอับสปอร์

A: สกุล *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 : www.thapra.lib.su.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1.4.4 ก้านชูสปอร์และก้านชูอับสปอร์ (Sporophoresและ Sporangiophores)

สปอร์เดี่ยวๆและสปอร์ที่อยู่เป็นเส้นสายจะเจริญอยู่บนก้านชูสปอร์ซึ่งเป็นเส้นใยที่ไม่แตกแขนงหรือมีแขนงและมีการสร้างสปอร์หรือรองรับสปอร์ไว้และอาจเกิดขึ้นได้ทั้งที่เส้นใยเหนือผิวอาหารหรือเส้นใยใต้ผิวอาหาร ก้านชูสปอร์อาจสร้างรวมตัวกันคล้ายเส้นใยซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นก้าน 1 หรือ 2 ก้าน พร้อมกับทำหน้าที่รองรับไปด้วย ต่อจากนั้นก็จะเจริญไปเป็นส่วนที่จะสร้างสปอร์ สปอร์อาจถูกสร้างขึ้นที่ด้านข้างหรือส่วนปลายของก้านชูที่เป็นแบบเดี่ยวๆ หรือแบบแตกแขนงที่มีลักษณะซับซ้อน เช่น ที่พบใน *Streptoverticllium* ซึ่งก้านชูสปอร์จะประกอบด้วยก้านหลัก ที่มี 3-4 แขนงด้านข้าง โดยเรียงตัวโดยรอบแกน เป็นห่วงและมีระยะความยาวที่แน่นอน แต่ละแขนงจะมีเส้นสายสปอร์จัดเรียงตัวแบบก้านร่ม ลักษณะการเรียงตัวชนิดนี้ เรียกว่า Umbellate monoverticillate แต่ถ้ามีการจัดเรียงตัวแบบ Vertical 2 ชั้น ก็เรียกก้านชูสปอร์แบบนี้ว่า Biverticillate (รูปที่ 2.9)

รูปที่ 2.9 แสดงก้านชูสปอร์ (Sporophores) และ การเรียงตัวของสปอร์แบบต่างๆ ของเชื้อแอคติโนมัยสีท
ที่มา : www.thapra.lib.su.ac.th

2.6.2 การแตกหักเป็นท่อน (Fragmentation)

การขาดออกเป็นท่อน (Fragmentation) ส่วนที่หลุดไปจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งพัฒนาไปเป็นสิ่งมีชีวิตตัวใหม่ได้โดยเซลล์ในส่วนที่หลุดไปนั้นเกิดรีเจนเนอเรชั่น (Regeneration) กลับเป็นเนื้อเยื่อเจริญได้อีก ตัวอย่างเช่น เนื้อเยื่อพืช และ แอคติโนมัยสีท เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 โครงสร้างที่สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกในระดับสกุล

2.7.1 เส้นใย (Mycelium)

มีหลายลักษณะถ้ามีการแตกหักควรสังเกตรูปร่างของชิ้นส่วนที่แตกหักหรือดูว่ามีการเคลื่อนที่ได้หรือไม่ได้ เช่น *Oerskovia* spp. สามารถปล่อยส่วนที่แตกหักที่มีแฟลคเจลลา ต้องสังเกตการแตกกิ่งแขนงของเส้นใยว่ามีลักษณะแบบใดมีทั้งเส้นใยเหนือผิวอาหารและเส้นใยใต้ผิวอาหารหรือไม่หรือมีเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหาร ซึ่งพบบ่อยในแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ เช่น *Sporicthya* ที่เส้นใยของแอคติโนมัยสีทอาจมีการสร้างถุงเล็กๆระหว่างปล้องของเส้นใย (Intercalary vesicle) ที่ไม่สร้างสปอร์ภายใน เช่น Intrasporangium หรือมีสปอร์อยู่ภายในด้วย เช่น Frankia นอกจากนี้ยังต้องสังเกตลักษณะของสปอร์และการติดของสปอร์ที่เส้นใยอยู่เหนือผิวอาหารรวมทั้งที่อยู่ใต้ผิวอาหารด้วยถ้ามี

2.7.2 โคนิเดีย (Conidia)

เป็นสปอร์ที่สร้างแบบไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) ที่ไม่ใช่คลาไมโดสปอร์อยู่ระหว่างปล้องของเส้นใย (Intercalary chlamydospores) หรือสปอร์ที่อยู่ภายในอับสปอร์ (Sporanggiospore) แอคติโนมัยสีทสามารถสร้างโคนิเดียได้หลายแบบคือ

(1) โคนิเดียเดี่ยวๆ พบในหลายๆสกุลเช่น *Thermoactinomyces* ซึ่งสามารถทนทานต่อความร้อนได้สูงส่วนโคนิเดียที่ไม่ทนความร้อนพบใน *Saccharomonuspora*, *Micromonospora* *Promicromonospora* และ*Thermomonospora* และนอกจากนี้พวก *Frankia*, *Dactylosporangium* และ *Intrasporangium* อาจจะมีการสร้างเวสิเคิลที่ปลายเส้นใยซึ่งอาจทำให้สับสนกับสปอร์ได้หรือบางทีพวก *Actinomadurae* ก็สามารถสร้างเวสิเคิลเดี่ยวๆได้เมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม

(2) โคนีเดียคู่ เป็นโคนีเดียที่ติดกันเป็นพู่คู่ตามยาวที่เส้นใยเหนือผิวอาหาร เช่น *Microbispora* แต่ *Faenia* บางชนิดก็สามารถสร้างโคนิเดียเป็นคู่ทั้งเส้นใยที่อยู่เหนือและอยู่ใต้ผิวอาหาร

(3) โคนิเดียต่อกันเป็นสายใช่สั้นๆ อาจจะเป็นการยากที่จะพิจารณาว่าความเป็นสายโซ่สั้น ๆ (Shot chain) อย่างไรก็ตามถ้ามี 20 สปอร์ที่เรียงต่อกัน 20 สปอร์ มักจะยังคงเรียกว่าสายโซ่สั้นๆ พบในหลายสกุล เช่น *Nocardia*, *Psuedonocardia*, *Faenia*, *Saccharomonospora*, *Streptomonospora*, *Sporichthya*, *Actinomadura*, *Microtetraspora*, *Streptoalloteichus* และ *Glycomyces*

(4) โคนิเดียต่อกันเป็นสายโซ่ยาวพบในหลายสกุลเช่น *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Actinopolyspora*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Actinosynnema*, *Nocardiopsis*, *Streptoalloteichus*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatosporia*, *Glycomyces*, *Saccharothrix* และ *Amycolatopsis*

2.7.3 อับสปอร์

เป็นโครงสร้างที่ภายในมีสปอร์ซึ่งอาจจะสร้างที่เส้นใยเหนือผิวอาหารหรือที่ผิวหน้าโคโลนีที่มีเส้นใยเหนือผิวอาหารอยู่เล็กน้อยหรือไม่มีเลยเช่น *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia*, *Dacylosporangium*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium* หรืออาจจะสร้างอยู่ในอาหารเช่น *Kineosporia*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.4 โครงสร้างอื่นๆ

แอคติโนมัยสีทบางชนิดสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะต่างออกไป เช่น สร้าง Synnemata ที่มีสปอร์หรือบางกลุ่มอาจมีการสร้างสปอร์จำนวนมากจากการแบ่งเซลล์หลายๆระนาบและอับสปอร์ลักษณะนี้เรียกว่า Multilocular sporangia นอกจากนี้แอคติโนมัยสีทหลายชนิดยังสามารถสร้างโครงสร้างกลมๆที่เส้นใยเหนือผิวอาหารซึ่งภายในอาจไม่มีสปอร์อยู่เลยหรืออาจเป็นเพียงหยดน้ำที่ล้อมรอบสายโซ่ของสปอร์ที่ม้วนงอไว้หรือไม่ก็มีสปอร์อัดแน่นอยู่ภายในเช่นใน *Kibdelosporangium* และบางชนิดของ *Streptomycete* ก็สร้างโครงสร้างที่เรียกว่า สเคลอโรเทีย (sclerotia) ซึ่งเป็นโครงสร้างรูปร่างกลมภายในสเคลอโรเทียไม่มีสปอร์อยู่ภายในแต่จะมีเซลล์ที่มีไลปิดสะสมอยู่จำนวนมาก

2.8 บทบาทและความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยสีท

2.8.1 ความสำคัญและประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ในธรรมชาติเชื้อแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการสร้างสารที่มีบทบาทต่อสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่เพื่อเหตุผลในการดำรงชีวิต เช่น การสร้างสารยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตอื่น การสร้างเอนไซม์หลายชนิดเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆ และการสร้างสารส่งเสริมการเจริญ เป็นต้น ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน เช่น ทางการด้านการแพทย์ ทางด้านการเกษตร และทางด้านอุตสาหกรรม ซึ่งความสำคัญและประโยชน์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทได้แก่

2.8.1.1 การสร้างสารปฏิชีวนะ

แอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด (Birdy, 2005) สารปฏิชีวนะที่เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิตขึ้น มีความหลากหลายสูงทั้งด้านโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ (Sneader, 2005) ได้กล่าวถึงสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทไว้เป็นกลุ่มดังนี้คือ

1. กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycosides)

โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยน้ำตาลอะมิโน (Amino sugar) เชื่อมต่อด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้โดยตรง (Bactericidal) มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยรบกวนการแปลรหัสจาก mRNA ไปเป็นโปรตีน สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่

1.1 สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) ผลิตโดย *Streptomyces griseus* มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* และจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของกาฬโรค (Plague) โรคบรูเซลโลซิส (Brucellosis) และแบคทีเรียต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง สเตรปโตมัยซินถูกนำไปใช้เป็นยาอันดับแรก (First line) ในการรักษาวัณโรคแต่การใช้ในปริมาณมากเป็นอันตรายต่อเส้นประสาท หู ซึ่งเป็นผลให้เกิดอาการหูหนวกได้ จึงอนุญาตให้ใช้ในปริมาณน้อยร่วมกับยาต้านวัณโรคที่เกิดจากการสังเคราะห์

1.2 นีโอมัยซิน (Neomycin) เป็นสารปฏิชีวนะเชิงซ้อน (Antibiotic complex) ผลิตโดย *Streptomyces fradiae* ส่วนประกอบที่ใช้รักษาโรค คือ นีโอมัยซิน-บี (Neomycin B) มีความเป็นพิษต่อระบบประสาท (Neurotoxicity) นำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อที่ผิวหนังหูและตา

1.3 กานามัยซิน (Kanamycin) เป็นสารปฏิชีวนะเชิงซ้อนผลิตโดย *Streptomyces kanamyceticus* สารประกอบหลัก คือ กานามัยซิน-เอ (kanamycin A) มีความเป็นพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ชนิดอื่นๆใช้สำหรับรักษาการติดเชื้อจาก *Staphylococcus* ที่ดื้อต่อยาเพนนิซิลลิน (Penicillin) และการติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาเจนทาไมซิน

1.4 ลินโคมัยซิน (Lincomycin) ผลิตโดย *Streptomyces lincolnensis* เป็นยาที่มีความเป็นพิษสูงในเวลาต่อมาจึงมีการพัฒนาคลินดามัยซิน (clindamycin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของลินโคมัยซินมาใช้แทนโดยมีกิจกรรม (activity)ที่คล้ายกันแต่มีประสิทธิภาพมากกว่า

1.5 เจนทาไมซิน-ซี1 (Gentamicin C1) แยกได้จากสารปฏิชีวนะเชิงซ้อน ซึ่งผลิตโดย *Micromonospora purpurea* และ *Micromonospora. echinospora* เจนทาไมซินเป็นทางเลือกในการนำประโยชน์ที่หลากหลาย เช่น ต้านการติดเชื้อจาก *Pseudomonas*

2. กลุ่มคลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol)

คลอแรมเฟนิคอล เป็นยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง (Broad-spectrum antibiotic) ผลิตโดย *Streptomyces venezuelae* ออกฤทธิ์แบบยับยั้งการเจริญของเชื้อ (bacteriostatic) มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยการจับกับหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม ทำให้การสร้างเอนไซม์เปปติดิลทรานสเฟอเรส (Peptidyltransferase) ถูกยับยั้งจนไม่สามารถสร้างพันธะเปปไทด์ได้ คลอแรมเฟนิคอลใช้รักษาโรคไทฟอยด์ โรคจากการติดเชื้อ *Salmonella* โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis) และโรคจากการติดเชื้อริกเก็ตเซีย นอกจากนี้ยังใช้รักษาการติดเชื้อที่ตาและหู

3. กลุ่มเตตราซัยคลิน (Tetracycline)

โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยวงอะโรมาติกต่อกัน 4 วง เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างโดยออกฤทธิ์แบบยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Bacteriostatic) มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยการจับกับหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ คลอร์เตตราซัยคลิน (Chlortetracycline) ผลิตโดย *Streptomyces aureofaciens* ออกซีเตตราซัยคลิน (Oxytetracycline) ผลิตโดย *Streptomyces rimosus* และดีมีโคลซัยคลิน (Demeclocycline) ผลิตโดย *Streptomyces aureofaciens* ที่เกิดการกลายพันธุ์

4. กลุ่มแมคโครไลด์ (Macrolide)

โมเลกุลมีขนาดใหญ่ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมมากกว่า 20 อะตอม มีวงแลคโตนแมคโครไลด์ (Macrocyclic lactone ring) หรือวงแลคแตมแมคโครไลด์ (Macrocyclic lactam-ring) เป็นองค์ประกอบหลักออกฤทธิ์แบบยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Bacteriostatic) โดยจับกับหน่วยย่อย 50S ของไรโบโซม มีผลให้การสังเคราะห์โปรตีนถูกยับยั้งสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่

4.1 อิริโทรมัยซิน (Erythromycin) ผลิตโดย *Streptomyces erythreus* เป็นสารปฏิชีวนะชนิดแรกในกลุ่มนี้ที่นำไปใช้ในทางคลินิก อิริโทรมัยซิน มีการออกฤทธิ์คล้ายกับยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (Penicillin) โดยที่โครงสร้างทางเคมีนั้นไม่มีความสัมพันธ์กันสามารถนำไปใช้ในผู้ป่วยที่แพ้ยาเพนนิซิลลิน หรือใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *Staphylococcus* ที่ดื้อต่อยาเพนนิซิลลินได้ นอกจากนี้ อิริโทรมัยซิน ยังเป็นยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ผิวหนังเนื้อเยื่ออ่อนและระบบทางเดินหายใจ

4.2 ราปามัยซิน (Rapamycin) ผลิตโดย *Streptomyces hygroscopicus* มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Candida albicans* และเชื้อราบางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. กลุ่มไรฟามัยซิน (Rifamycin)

โครงสร้างประกอบด้วยวงอะโรแมติก (Aromatic ring) เชื่อมต่อกันด้วยอะลิฟาติกบริดจ์ (Aliphatic bridge) ไรฟามัยซิน ผลิตโดย *Nocardia mediterranei* ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และ *Mycobacterium tuberculosis* สามารถดัดแปลงไรฟามัยซินต่อได้เป็นไรฟามัยซิน-บี (Rifamycin B) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ปานกลางเมื่อนำไปใช้กับสัตว์ แต่ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษา จึงได้มีการพัฒนา ไรฟามัยซิน-เอสวี (Rifamycin SV) ที่ออกฤทธิ์ต่อสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวางขึ้นมาแทน สามารถยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae* แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้

6. กลุ่มโพลีอีน (Polyene)

โครงสร้างโมเลกุลมีขนาดใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ (Antifungal) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่

6.1 นิสเตติน (Nystatin) ผลิตโดย *Streptomyces noursei* และ *Streptomyces aureus* เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ เนื่องจากนิสเตตินมีความเป็นพิษสูงจึงถูกจำกัดในการใช้รักษาการติดเชื้อจาก *Candida albicans* ที่ผิวหนัง และเนื่องจากมันไม่ถูกดูดซึมจากลำไส้ จึงสามารถใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *Candida albicans* ในช่องปากและลำไส้

6.2 แอมโฟเทอริซิน (Amphotericin) ผลิตโดย *Streptomyces nodosus* เป็นสารปฏิชีวนะที่มีความเป็นพิษ แต่มีความปลอดภัยพอที่จะใช้ในการรักษาการติดเชื้อราในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องเนื่องจากการรักษาโรคมะเร็งด้วยการทำเคมีบำบัดหรือ เนื่องจากโรคเอดส์ แอมโฟเทอริซินมีการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยจะจับกับเออโกสเตอรอล (Ergosterol) ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ เกิดการสูญเสียโพแทสเซียมและสารต่างๆในเซลล์แต่แอมโฟเทอริซินก็สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของมนุษย์ ได้เช่นกัน

7. กลุ่มอะโซมัยซิน (Azomycin)

อะโซมัยซิน ผลิตโดย *Streptomyces* ที่ยังไม่ระบุสปีชีส์ มีความเป็นพิษสูงมากจึงมีการพัฒนาสารได้เป็นเมโทรไนดาโซล (Metronidazole) ใช้ฆ่าโปรโตซัวและแบคทีเรีย

8. กลุ่มแวนโคมัยซิน (Vancomycin) และ ไตโคพลานิน (Teicoplanin)

แวนโคมัยซิน ผลิตโดย *Streptomyces orientalis* มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกทั้งชนิดที่ต้องการอากาศและชนิดที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มสแตปฟีโลคอคไค (Staphylococci) โดยออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแวนโคมัยซินที่มีความบริสุทธิ์ใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดในช่องปากแต่การใช้แวนโคมัยซินที่ไม่บริสุทธิ์จะทำให้เกิดผลข้างเคียง (Side effects) สูงไตโคพลานิน (Teicoplanin) เป็นสารปฏิชีวนะเชิงซ้อนผลิตโดย *Actinoplanes teichomycetius* มีการออกฤทธิ์เหมือนกับแวนโคมัยซิน แต่มีการคงอยู่ในร่างกาย (Half-life) นานกว่าและมีการระคายเคืองน้อยกว่า สามารถฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อหรือเส้นเลือดได้โดยตรง

9. ธิอีนามัยซิน (Thienamycin)

ธิอีนามัยซินเป็นสารในกลุ่มคาร์บาพีเนม (Carbapenem) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์มากและมีความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้สูง แยกได้จาก *Streptomyces* กว่า 40 ชนิด โดยธิอีนามัยซิน เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดในกลุ่มนี้ผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดย *Sterptomyces cattleya* มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคนมีคุณสมบัติทนต่อเอนไซม์เบต้า-แลคทาเมส (β-lactamase) สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

10. กลุ่มกรดคลาวูลานิก (Clavulanic acid)

เชื้อที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคทาเมส (β-lactamase) นั้น สามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (Penicillin) และซีฟาโลสปอริน (Cephalosporin) ได้จึงมีการค้นหายาที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เบต้า-แลคทาเมส โดยกรดคลาวูลานิก แม้จะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ต่ำ แต่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เบต้า-แลคทาเมส จึงมีการใช้กรดคลาวูลานิกร่วมกับยาปฏิชีวนะตัวอื่นเช่น อะม็อกซีซิลลิน (Amoxicillin) ซึ่งการใช้ตัวยาร่วมกัน (Combination) ระหว่างกรดคลาวูลานิกกับยาชนิดอื่นนั้น ได้รับการพัฒนาเป็นยาที่ขายในท้องตลาดและทางการแพทย์ได้แล้ว โดยใช้รักษาโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจและทางเดินปัสสาวะ

2.8.1.2 การสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญต่อสิ่งมีชีวิตอื่นที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช (Waksman, 1950) เช่นการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชเป็นต้น (Shrivastava *et al.*, 2008) ศึกษาการผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติก ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง จากเชื้อ *Kitasatospora* sp. ที่แยกได้จากดิน โดยทำการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (Calcium alginate) พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงจะผลิตกรดอินโดล-3-อะซีติกที่ความเข้มข้นสูงขึ้นในช่วง ระยะเวลาที่นานขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกตรึง (Khamna et al., 2010) รวบรวมเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้จากดินบริเวณราก พืชสมุนไพรไทยจำนวน 14 ชนิด พบว่าเชื้อดังกล่าวมีการผลิตฮอร์โมนพืช (กรดอินโดล-3-อะซีติก) ในอาหารยีสต์มอลต์เอ็กแทรกท์ (Yeast malt extract medium) ซึ่งเติมแอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรด อินโดล-3-อะซีติก มากที่สุด คือ เชื้อ *Streptomyces* sp. ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณรากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*)

2.8.1.3 การย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์

เชื้อแอคติโนมัยสีทมีความสามารถในการสลายสารประกอบอินทรีย์ต่างๆไม่ว่าจะเป็นโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ทำให้สามารถย่อยสลายส่วนประกอบของพืชและสัตว์ในธรรมชาติได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดิน แหล่งน้ำ และปุ๋ยอินทรีย์ จากการศึกษาการย่อยสลายกรดอะมิโนพบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถย่อยสลายไกลซีน (Glycine) และ อะลานีน (Alanine) ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าเชื้อรา เชื้อแอคติโนมัยสีทหลายสปีชีส์ (Species) สามารถย่อยสลายโปรตีนทั้งในพืชและสัตว์ได้ เช่น ซีอิน (Zein) อีเดสติน (Edestin) ไกลอาดิน (Gliadin) แอลบูมิน (Albumin) และคาซีอิน (Casein) สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตต่างๆ เช่น น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส สามารถย่อยสลายสเตียรอยด์ต่างๆ เช่น คลอเรสเตอรอล (Choresterol) สารประกอบอะโรแมติค (Aromatic compounds) และอะเซทิลีน (Acetylene) นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ได้อีกมากมาย เช่น วุ้นจากสาหร่าย (Agar) ยาง (Rubber) พาราฟิน (Paraffin) และลิกนิน (Lignin) (Waksman, 1950) เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ได้เนื่องจากความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งเอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) และเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Endocellular enzyme) โดยเอนไซม์ที่สร้างได้มีหลายชนิด เช่น เอนไซม์โปรตีเอส (Protease)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์อะไมเลส (Amylases) เอนไซม์อินเวอเทส (Invertase) เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส (Cellulolytic enzymes) และเอนไซม์ไลเปส (Lipase) เป็นต้น (Waksman, 1950)

2.8.1.4 การตรึงไนโตรเจน

ตั้งแต่ช่วงปลายปี 1970 เป็นต้นมา นักวิทยาศาสตร์พบวาเชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้โดยอยู่ร่วมกับพืชหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นไม้ในเขตอบอุ่นประเภทไม้เนื้ออ่อน และยังสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีเมื่ออยู่ร่วมกับรากข้าวในนาที่มีน้ำขัง โดยไม่จำเพาะเจาะจง เหมือนไรโซเบียมกับรากถั่วเท่านั้น (ไพรัตน์, 2546) มีรายงานว่าเชื้อสกุล *Nocardia* บางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 12 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลลูโลสที่ใช้ไปและยังมีเชื้อแอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้คือ เชื้อสกุล *Frankia* (Alexander, 1995)

2.9 ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีท

นักวิทยาศาสตร์พบว่าการเจริญของแอคติโนมัยสีทถูกยับยั้งได้ด้วยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของแอคติโนมัยสีท มีบทบาทที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ ช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุในธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ช่วยย่อยส่วนประกอบของพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และไคติน แอคติโนมัยสีทบางชนิด เช่น *Streptomycetes bambergensis* และ *Streptomycetes violaceoniger* สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถช่วยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นน้ำตาลฟลุกโทสได้ ปัจจุบัน มีการใช้ประโยชน์แอคติโนมัยสีทช่วยผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม เช่น การใช้แอคติโนมัยสีทชนิด *Thermomonospora* ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 60 -70 องศาเซลเซียสและเอนไซม์ไซแลนที่ทำงานที่อุณหภูมิสูงซึ่งเอนไซม์นี้มีประโยชน์ในการผลิตน้ำตาลไซโลสจากซังข้าวโพด นอกจากนั้น มีการใช้แอคติโนมัยสีทบางชนิดในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารพิษอะลิฟาติก-อะโรมาติก โคโพลีเอสเตอร์ (Aliphatic-Aromatic Copolyesters และ 1,4 – ไดออกเซน) (1,4-Dioxane) บทบาทของแอคติโนมัยสีทในธรรมชาติมีหลายด้าน ในดินจะพบแอคติโนมัยสีทมากที่สุด แต่อาจจะพบในเนื้อเยื่อพืชด้วย เรียกว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท อีกทั้งยังจัดเป็นผู้ย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ที่ดีทำให้เกิดการหมุนเวียนสารประกอบอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม สร้างความอุดมสมบูรณ์ในดิน นอกจากนี้แอคติโนมัยสีทหลายสกุล เช่น *Stretomyces Micromonospora ,Planotetraspora , Kitasatospora , Actinomadura, Saccharothrix , Microbispora , Microtetraspora , Nonomuraea , Actinoplanes , Dactlyosporangium , Saccharopolyspora , Thermomonospora , Salinispora , Thermoactinomyces , Nocardia , Sphaerisporangium , Amycolatopsis , Kibdelosporangium , Pseudonocardia , Actinosporangium , Steptosporangium , Spirillospora , Planobispora* และ *Planomonospora* สามารถผลิตเมตาโบไลท์ที่สำคัญต่างๆ เช่น สารปฏิชีวนะ (Antibiotic) เอนไซม์ (Enzyme) วิตามิน (Vitamin) และสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ รวมทั้งสารมารถเปลี่ยนแปลงสารให้กลายเป็นสารในรูปแบบอื่นได้ดี โดยเฉพาะสารในกลุ่มสเตียรอยด์ (Berdy, 2005) แอคติโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *Mycobacterium leprae* เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน *Mycobacterium tuberculosis* เป็นสาเหตุของวัณโรค และบางสปีชีส์ของ *Steptomyces* ก่อให้เกิดโรคปอดอักเสบ เป็นต้น แอคติโนมัยสีทบางชนิดก่อโรคในพืช เช่น *Streptomyces scabies* เป็นต้นเหตุของโรคหูดฝรั่ง และบางชนิดก่อโรคในสัตว์ แต่โดยส่วนใหญ่แอคติโนมัยสีทมักไม่เป็นอันตราย (Coyne, 1999) แอคติโนมัยสีทจะพบมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สุดในดินเป็นส่วนใหญ่ แต่อาจจะพบในเนื้อเยื่อพืชด้วย เรียกว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท เราจึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีความสำคัญ ในประเทศไทยพื้นที่เป็นที่ราบลุ่มดินร่วน เหมาะแก่การเพาะปลูกพืชสมุนไพรไทย ซึ่งทำให้เราสนใจที่จะทำการศึกษาเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรไทยทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ยี่หร่า และฟ้าทะลายโจร โดยมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ดังนี้

2.10 พืชสมุนไพรไทย

2.10.1 ยี่หร่า

รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะดอกและใบของยี่หร่า
ที่มา : www.kasetkawna.com

ชื่อสามัญ :Tree basil, Clove basil, Shrubby basil, African basil, Wild basil, Kawawya, Caraway friut, Caraway seed, Kummel, Caraway

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ocimum gratissimum* L. จัดอยู่ในวงศ์กะเพรา (*LAMIACEAE* หรือ *LABIATAE*) สมุนไพรยี่หร่า มีชื่อท้องถิ่นอื่นๆว่ายี่หร่า หรือ กะเพราญวณ (กรุงเทพมหานคร), จันทร์หอม เนียม (เชียงใหม่), จันทร์ขี้ไก่ เนียมต้น (แม่ฮ่องสอน), สะหลีดี (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), หอมป้อม (ภาคเหนือ), โหระพาช้าง กะเพราควาย (ภาคกลาง), หร่า (ภาคใต้) เป็นต้น ยี่หร่าจะมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด ชนิดแรกก็คือ ยี่หร่าชนิดที่มีชื่อเรียกอีกชื่อว่า “เทียนขาว” มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cuminum cyminum* L. และจัดอยู่ในวงศ์ผักชี (APIACEAE) มีถิ่นกำเนิดในแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศอินเดียและประเทศจีน ยี่หร่าชนิดนี้ก็คือผลแห้งที่เรานำมาใช้เป็นเครื่องเทศและยาหอม ชนิดที่สอง ยี่หร่าชนิดที่มีชื่อไทยหลายชื่อ เช่น จันทร์หอม เนียมต้น เนียม กะเพราญวน โหระพาช้าง เป็นต้น ซึ่งชื่อภาษาอังกฤษก็คือ Shrubby basil โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ocimum gratissimum* L. และจัดอยู่ในวงศ์กะเพรา ซึ่งเป็นยี่หร่าแบบกินใบที่เรานิยมนำมาผัดรับประทานกัน

ลักษณะของยี่หร่า (รูปที่ 2.10) ต้นยี่หร่าเป็นไม้พุ่มเตี้ย มีความสูงประมาณ 50-80 เซนติเมตร ลำต้นมีสีน้ำตาลแก่แตกกิ่งก้านสาขา ขนาดเล็กกิ่งก้านไม่ใหญ่ ในช่วงปีแรกและปีที่สองจึงออกดอกออกผล ขยายพันธุ์ด้วย วิธีการเพาะเมล็ดและการปักชำกิ่ง เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนซุยและมีความชื้นปานกลางในสภาพกลางแจ้งใบยี่หร่า เป็นใบเดี่ยวออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ ลักษณะของเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปกลมรี โคนใบสอบ ปลายใบแหลมขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ใบสีเขียวสด ผิวใบสากมือ ใบยี่หร่ามีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีรสร้อน จึงช่วยดับกลิ่นคาวจากอาหารจำพวกเนื้อสัตว์เนื้อปลาได้เป็นอย่าง ดอกยี่หร่า ออกดอกเป็นช่อที่บริเวณปลายยอด ช่อดอกนั้นจัดเป็นแบบ Spike-like raceme ดอกจะบานจากล่างไปหาปลายช่อ โดยแต่ละช่อจะประกอบไปด้วยดอกย่อยขนาดเล็กประมาณ 50-100 ดอก ผลยี่หร่าหรือเมล็ดยี่หร่า มีลักษณะเป็นรูปกลมรี แต่ละผลมีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร เมื่อยังอ่อนจะเป็นสีเขียว แต่พอสุกหรือแก่แล้วจะกลายเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลอ่อน ภายในผลมีเมล็ดขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งผลจะนิยมนำมาตากแห้งหรือนำไปอบแห้ง เพื่อใช้ทำเป็นเครื่องเทศที่ใช้ประกอบอาหารเพื่อช่วยเพิ่มกลิ่นหอมให้อาหารน่ารับประทานมากยิ่งขึ้น และยังช่วยดับกลิ่นคาวได้ดีเหมือนกับใบ

สรรพคุณของยี่หร่า สมุนไพรยี่หร่า ใบของยี่หร่า สามารถช่วยยับยั้งหรือช่วยชะลอการขยายตัวของเซลล์มะเร็งได้ สรรพคุณยี่หร่าช่วยในการบำรุงธาตุในร่างกาย ใบยี่หร่าอุดมไปด้วยวิตามินซีและธาตุแคลเซียม ซึ่งมีสรรพคุณในการช่วยขับเหงื่อซึ่งเป็นของเสียออกจากร่างกาย มีสรรพคุณช่วยแก้อาการคลื่นไส้ ด้วยการใช้ใบนำมาชงเป็นชาดื่มจนกว่าจะหาย ยี่หร่ามีสรรพคุณช่วยแก้โรคเบื่ออาหาร ช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหาร (ต้น, รากแห้ง) ช่วยแก้อาการปวดท้อง เนื่องจากอาหารไม่ย่อย ต้นยี่หร่ามีสรรพคุณช่วยแก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ อาการปวดท้อง (ใบ, ต้น, รากแห้ง) ประโยชน์สมุนไพรยี่หร่าช่วยในการขับลมในลำไส้ (ใบ, ต้น, รากแห้ง) น้ำมันหอมระเหยจากยี่หร่ามีฤทธิ์ช่วยระงับอาการหดเกร็งของไส้ (น้ำมันหอมระเหย)ช่วยฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยการใช้ผลแห้งประมาณ 3-5 กรัมนำมาชงกับน้ำเดือดประมาณ 1 ลิตร ทิ้งไว้ สักระยะแล้วจึงนำมาดื่มวันละ 3-4 ถ้วยตวง ยี่หร่ายังมีฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อมดลูกคลายตัว ซึ่งจะช่วยลดอาการปวดประจำเดือนในสตรีได้

ประโยชน์ของยี่หร่า ประโยชน์ของใบยี่หร่า ใบใช้เป็นเครื่องปรุงหรือเป็นส่วนประกอบในอาหารบางชนิด เช่น แกง ซุป ต้มยำ เป็นต้น และยังช่วยดับกลิ่นคาวของเนื้อสัตว์ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย อาหารไทยบางชนิด นิยมใช้ยี่หร่าในการช่วยปรุงแต่งกลิ่นอาหาร ด้วยการคั่วเมล็ดมาโขลกผสมกับเครื่องแกง ทำเป็นแกงเผ็ดแกงเขียวหวาน แกงกะหรี่ เป็นต้น เมล็ดช่วยในการถนอมอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ด้วยการนำมาป่นหรือตำผสมในเนื้อสัตว์เวลาหมัก เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยนั้นมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ จึงช่วยป้องกันอาหารไม่ให้เกิดการบูดเน่าเสียเร็วขึ้น และยังช่วยป้องกันกลิ่นเหม็นอับของเนื้อสัตว์เวลาหมักก่อนนำไปตากแห้งอีกด้วย น้ำมันยี่หร่า (Caraway oil) นอกจากจะใช้แต่งกลิ่นอาหาร ยังนำมาใช้แต่งกลิ่นสบู่ได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.2 ฟ้าทลายโจร

รูปที่ 2.11 แสดงลักษณะลำต้น ใบ และดอกของฟ้าทะลายโจร
ที่มา : www.kasetkawna.com

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (วงศ์ Acanthaceae)
ชื่ออื่น: ฟ้าทะลาย หญ้ากันงู น้ำลายพังพอน เมฆทะลาย ฟ้าสะท้าน

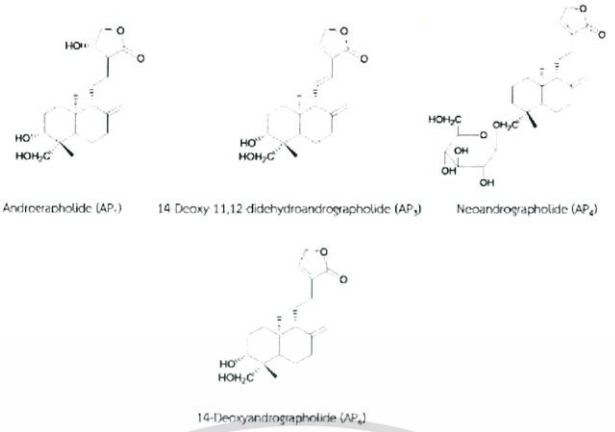
ลักษณะของฟ้าทะลายโจร (รูปที่ 2.11) เป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 30-60 ซม. ลำต้นตั้งตรง กิ่งก้านเป็นสันสี่เหลี่ยม ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปใบหอก กว้าง 1-2.5 ซม. ยาว 4-10 ซม. โคนใบและปลายใบแหลม ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย เนื้อใบสีเขียวเข้ม เป็นมัน ก้านใบยาว 2-8 มม. ดอกออกเป็นช่อใหญ่ที่ปลายกิ่งและซอกใบ ช่อโปร่งยาว 5-30 ซม. ดอกย่อยขนาดเล็ก ดอกสีขาวแกมม่วง มีขน กลีบเลี้ยงโคนติดกันผลเป็นฝัก รูปทรงกระบอก สีเขียวอมน้ำตาล ปลายแหลม เมื่อผลแก่จะแตกดีดเมล็ดออกมามีเมล็ด 8-14 เมล็ด ขนาดเล็ก สีน้ำตาลแดง ใช้เมล็ดขยายพันธุ์ เนื่องจากเมล็ดฟ้าทะลายโจรมีเปลือกหุ้มหนาและแข็ง ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการงอก นอกจากนี้เมล็ดยังมีการพักตัว จึงควรแก้การพักตัวของเมล็ดก่อนนำไปเพาะหรือก่อนการปลูก

แหล่งกระจายพันธุ์ ฟ้าทะลายโจรมีเขตการกระจายพันธุ์และเขตการเพาะปลูกได้ดีในภูมิภาคที่มีอากาศร้อนหรือร้อนชื้น

การเพาะปลูก เป็นพืชที่ชอบอากาศร้อนชื้น สามารถปลูกได้ทุกฤดูกาล แต่ฤดูที่เหมาะสมคือช่วงต้นฤดูฝนชอบดินร่วนซุยที่มีการระบายน้ำดีเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาพที่ร่มและกลางแจ้งถ้าปลูกในพื้นที่ กลางแจ้งจะมีลำต้นเตี้ยและใบหนา ส่วนในที่ร่มลำต้นจะสูงใบใหญ่แต่บาง พื้นที่ปลูกจึงควรเป็นที่โล่งแจ้ง หรือมีแสงรำไรและมีน้ำอุดมสมบูรณ์

ส่วนที่ใช้ประโยชน์ : ส่วนเหนือดิน (ทั้งต้น) สารสำคัญในการออกฤทธิ์ คือ สารกลุ่ม Lactone เช่น สารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide) นีโอแอนโดรกราโฟไลด์ (Neoandrographolide) ดิ-ออกซีแอนโดรกราโฟไลด์ (14-Deoxyandrographolide) และดิออกซีไดดีไฮโดรแอนโดรกราโฟไลด์ (14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide) เป็นต้น ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมี (รูปที่ 2.12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 แสดงสูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่พบในสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

1. *Bacillus subtilis* ATCC6633
2. *Escherichia coli* ATCC25922
3. *Staphylococcus aureus* ATCC25923
4. *Candida albicans* ATCC10231
5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC28753
6. *Micrococcus luteus* ATCC25923
7. Methicillin resistance *Staphylococcus aureus*

3.2 พืชสมุนไพร

1. ยี่หร่า (*Cuminum cyminum*)
2. ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*)

3.3 สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ

1.1 สาร Tween 0.1%
1.2 เอทานอล (Ethanol) 95%
1.3 เอทานอล (Ethanol) 70%
1.4 น้ำกลั่น (Distilled Water)
1.5 สารยับยั้งเชื้อรา (Nystasin)
1.6 Sodium hypochlorite 1%

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

2.1 เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate)
2.2 เมทานอล (MeOH)
2.3 โซเดียมคลอไรด์ (Nacl) 0.85%

3. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

3.1 Gram Positive Lysis Solution (GPLA)
3.2 Lysis Solution (AL)
3.3 Lysis Solution (C1)
3.4 Prewash Solution (PWB)
3.5 Wash Solution Concentrate (WS)
3.6 Elution Buffer (ET) [10 mM Tris-Cl, pH 8.5]
3.7 Proteinase K Solution (20 mg/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 RNase A Solution (20 mg/ml)

3.9 Lysozyme

3.10 RNase A

3.11 RNase T1

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract malt extract agar (ISP2)
2. Starch casein agar
3. Muller's hinton agar
4. Potato dextrose agar (PDA)
5. Trypticase soy agar

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.5 เครื่องแก้ว อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

1. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า (Balance)
3. ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (Laminar air flow)
4. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
5. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
6. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)
7. มีดผ่าตัด (scalpel)
8. จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)
9. ปากคีบ (Forceps)
10. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture bottle)
11. โกร่งบด (Mortar and pestle)
12. เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hot plate and magnetic stirrer)
13. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Menetic bar)
14. เครื่องแก้ว (หลอดทดลอง, บีกเกอร์ ฯลฯ)
15. อุปกรณ์วัดปริมาตร (ปิเปต, ไมโครปิเปต, กระบอกตวง ฯลฯ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ขั้นตอนการดำเนินการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

1) เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรมาจากจังหวัดกำแพงเพชรในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) และยี่หร่า (*Cuminum cyminum*)

2) นำฟ้าทะลายโจรและยี่หร่ามาล้างด้วยน้ำประปาเพื่อชำระคราบดินออกให้หมด

2. การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของตัวอย่างพืชและการบ่มเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

1) ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของตัวอย่างพืชด้วยวิธี Surface Sterilization

2) แบ่งพืชออกเป็น 3 ส่วนคือ ราก, ลำต้นและใบและนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กขนาดความยาว 1 เซนติเมตร กว้าง 1 เซนติเมตร

3) ทำการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด โดยนำชิ้นตัวอย่างมาล้างด้วย Tween20 ที่ความเข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 20-30 วินาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง

4) จากนั้นแช่ลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ95 เป็นเวลา 7 นาที สำหรับใบและลำต้น และ 13 นาที สำหรับราก

5) ฟอกด้วย Sodium hypochlorite 1% เป็นเวลา 7 นาที สำหรับใบและลำต้นและ 13นาที สำหรับราก เวลาสามารถเปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับความเปราะบางของชิ้นส่วนพืชและชนิดพืช

6) ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้งและใช้น้ำสุดท้ายใช้เป็น Control โดยนำไป Spread plate ลงบนอาหาร Starch casein agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ Nystasin ปริมาณ 0.2 ml

7) นำชิ้นพืชตัวอย่างที่ผ่านการ Surface sterilized แล้วนำมาบดด้วยโกร่งให้ละเอียด

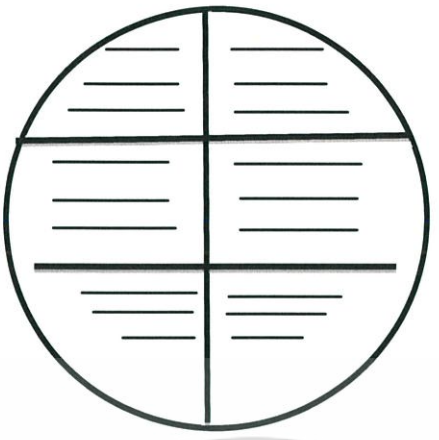
8) นำตัวอย่างพืชที่บดแล้วผสมน้ำกลั่น 0.4 ml แล้วใช้เทคนิค Spread plate ลงบนอาหาร Starch casein agar 0.2 ml

9) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บผลทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 14-30 วัน ภายหลังจากการบ่มนำมาตรวจสอบลักษณะเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 40x เพื่อดูโคโลนีของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

3. การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

1) คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหาร Starch casein agar โดยทำการแบ่งตารางเป็นช่องสี่เหลี่ยมและใช้ Microneedle เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาขีดลงบนอาหาร ISP2 ดังแสดงในรูปที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหาร ISP2

2) เมื่อได้เชื้อแอคติโนมัยสีทแล้วนำมาทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร ISP2 โดยใช้เทคนิค Streak plate บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

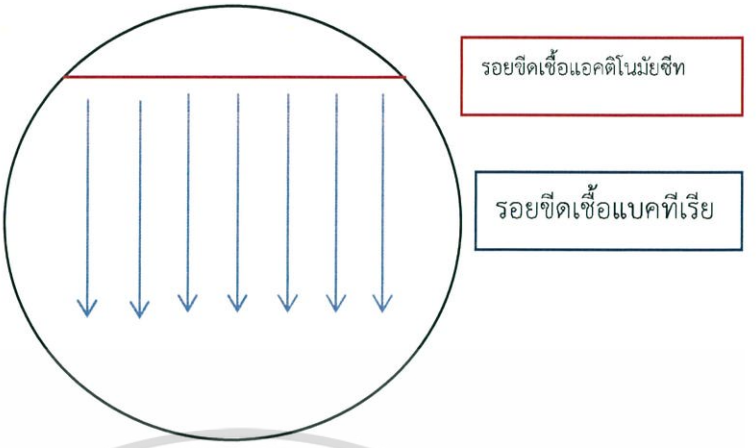
3) เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยใช้ Loop เขี่ยเชื้อแล้วมา Cross streak ลงบนอาหาร ISP2 เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ ดังแสดงในรูปที่ 3.2

รูปที่ 3.2 แสดงวิธีการ Cross streak เพื่อแยกเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์

4. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (Primary screen) (Gaeehowham *et al.*, 2009)

จากการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทและเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์เบื้องต้นด้วยวิธี Agar cross-streak method (Waskman, 1940) โดยนำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทมาขีดเป็นเส้นยาวบนอาหาร ISP2 Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งทั้ง 7 ชนิด ดังนี้ เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, เชื้อ *Escherichia coli* ATCC25922, เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923, เชื้อ *Candida albicans* AT10231,g เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC278533, เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC25923, เชื้อ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* มาขีดตั้งฉากกับโคโลนีของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท ดังแสดงในรูปที่ 3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.3 แสดงเทคนิค primary screen

บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการเกิดบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ระหว่างโคโลนีของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทและเชื้อทดสอบโดยทำการสังเกตและเก็บผลทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลาทั้งหมด 3 วันบันทึกค่า Inhibition zone พร้อมทั้งคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดเพื่อนำมาศึกษาขั้นต่อไป

5. สกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Taeehowisan *et al.*, 2009)

เลี้ยงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดบนอาหารเหลว ISP2 ทำการเพาะเลี้ยงในตู้ Incubater shaker อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 14 วันหรือรอจนกว่าจะมีการสร้างสปอร์ เมื่อครบกำหนดทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นนำไปทำการสกัดสารสกัดหยาบโดยนำน้ำหมักไป Partition โดยใช้กรวยแยก (Separatory funnel) ใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate เป็นเวลา 5 นาที (ทำซ้ำ3ครั้ง) และนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ให้เหลือแต่สารสกัดหยาบที่ต้องการ ทำการบันทึกผลโดยชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบ เก็บรักษาสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ในกรณีที่ยังไม่นำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป)

6. การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพโดยวิธี Agar disc diffusion (Lorian, 1980)

1) เตรียมจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA)

2) นำเชื้อทดสอบดังนี้ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278533, *Micrococcus luteus* ATCC25923, Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* ผสมกับ Nacl 0.85% ที่ปราศจากเชื้อเพื่อปรับค่าความขุ่นให้เท่ากับ McFartand standard No. 0.5

3) ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) นำ Disc ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 µl ต่อ 1 แผ่นทดสอบ (disc)

5) ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำ Disc control โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน

6) ตรวจสอบโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณ Inhibition zone ของ disc ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิดพร้อมทั้งคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดเพื่อนำมาศึกษาขั้นต่อไป

7. การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์

7.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท

คัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่สามารถต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดมาศึกษาเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP2 โดยใช้เทคนิค Streak plate ให้ทั่วทั้งจานอาหาร ศึกษาลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (Long working distence) กำลังขยาย 40X

7.2 การศึกษาลักษณะทางการเจริญของแอคติโนมัยสีท

นำเชื้อเอนโดไฟติกเชื้อแอคติโนมัยสีทมาขีดบนอาหาร Yeast extract malt extract agar (ISP2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตการเจริญสีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และสีของรงควัตถุเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS-ISCC color system)

8. การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์

8.1 ศึกษาลำดับกรดนิวคลีอิคของ 16s rRNA

1) การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในขวดรูปชมพู่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ทำการสกัดโดยใช้ HiPurA™ Bacteria Genomic DNA Purification Klt โดยมีขั้นตอนดังนี้ ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นมา 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอน เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสออกและเก็บตัวเซลล์ จากนั้นเติมไลโซไซม์ (Lysozyme) 200 ไมโครลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปใส่เอนไซม์โปรตีเนสเค (Proteinase K) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน กำจัดอาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีนที่ปนเปื้อนมาด้วยการเติมสารละลายเอนไซม์อาร์เอ็นเอ (RNase solution) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Lysis solution (C1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมเอทานอล 95-100% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ย้ายสารทั้งหมดลงใน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนของของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม Prewash ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนของของเหลวทิ้ง เติม Washing buffer solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนของของเหลวทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงให้แห้งอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดึงคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิว (Micro-centrifuge tube) หลอดใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใส่ Elution ลงไปปริมาตร 200 ไมโครลิตรตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอ

2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerasechain reaction ; PCR)

นำดีเอ็นเอที่แยกได้ส่งตรวจหา Sequencing เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์สากล (Universal primer) โดยนำสารที่มีความเข้มข้นและปริมาตร ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
primer : 9F*	10 pmol/µl	4.0 µl
Primer : 1541R*	10 pmol/µl	4.0 µl
dNTP	2.0 mM	10.0 µl
10X *Taq* buffer	10X	10.0 µl
$MgCl_2$	25.0 mM	8.0 µl
Taq DNA Polymerase	5 Unit/µl	0.5 µl
Milli Q water	-	59.5 µl
Template DNA	100-200 ng/µl	4.0 µl
ทั้งหมด		100.0 µl

*primer : 9F (5'- GAG TTT GAT CCT GGC TCA -3')

*primer : 1541R (5'- AAG GAG GTG ATC CAG CC -3')

ตารางที่ 3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycles)

Process	Temperature	Time (minutes)	Cycle
Denaturation step	94 °C	3	1
	94 °C	1	25
Annealing step	50 °C	1	
Extension step	72 °C	2	
	72 °C	3	1
ทั้งหมด : 2 hour 30 minute			

3) การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

ทำการจัดเรียง (Alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่คัดเลือก (Selected sequences) จากฐานข้อมูล Genbank โดยใช้ Alignment software และสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic trees) ด้วยโปรแกรมใน MEGA V.7 Package (www.megasoftware.net/) (Yukpha et al., 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพรตัวอย่าง

การคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากราก ลำต้น และใบ ของพืชสมุนไพรที่เก็บจากจังหวัดกำแพงเพชร ในช่วงเดือน พฤศจิกายน พ.ศ.2559 จำนวนทั้งสิ้น 2 ชนิด ได้แก่ ฟ้าทะลายโจร *(Andrographis paniculata)* และ ยี่หร่า (*Cuminum cyminum*) โดยเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยวิธี Surface sterilization (Mingma *et al*, 2014) และทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร starch casein agar ด้วยวิธีการ spread plate หลังจากนั้นทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และคัดแยกโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายแอคติโนมัยสีทลงบนอาหาร ISP2 พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทได้จำนวนทั้งหมด 89 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1) ซึ่งจำแนกเป็นเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากยี่หร่า (CM) จำนวน 52 ไอโซเลท (58.42%) มาจากส่วนของราก ลำต้น และใบ จำนวน 43, 4 และ 5 ไอโซเลท ตามลำดับ และเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากฟ้าทะลายโจร (AP) จำนวน 37 ไอโซเลท (41.57%) มาจากส่วนของราก และ ลำต้น จำนวน 28 และ 9 ไอโซเลท ตามลำดับ รหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทแสดงดังภาคผนวก ข

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนไอโซเลทของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากพืชสมุนไพรยี่หร่า (*Cuminum cyminum*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*)

พืช	ส่วนของพืช	จำนวนไอโซเลท
ยี่หร่า	ราก (CMR)*	43
	ลำต้น (CMS)*	4
	ใบ (CML)*	5
	รวม	**52**
ฟ้าทะลายโจร	ราก (APR)*	28
	ลำต้น (APS)*	9
	ใบ (APL)*	-
	รวม	**37**

หมายเหตุ : * CMR = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากรากยี่หร่า
CMS = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากลำต้นยี่หร่า
CML = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากใบยี่หร่า
APR = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากรากฟ้าทะลายโจร
APS = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากลำต้นฟ้าทะลายโจร
APL = เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากใบฟ้าทะลายโจร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้น (Primary screen)

หลังจากทำการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้น จากนั้นจึงนำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีททั้งหมด 89 ไอโซเลท มาทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Candida albicans* ATCC10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC28753, *Micrococcus luteus* ATCC25923 และ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* ผลการทดลอง พบว่า จากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจำนวนทั้งหมด 89 ไอโซเลท มีจำนวน 42 ไอโซเลท เท่านั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ และจำนวนที่เหลืออีก 47 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ แสดงดังภาคผนวก ค จากผลการทดลองดังกล่าว จึงนำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทมาจัดกลุ่มโดยดูจากฤทธิ์ทางชีวภาพและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เช่น สีของโคโลนี, สีของเส้นใยอาหาร, สีของเส้นใยอากาศ และลักษณะของสปอร์ (ในหัวข้อที่ 4.3) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นทั้งหมด 10 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1) กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วย 3 ไอโซเลท ได้แก่ CMR-34, CMR-46 และ CMR-50 ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, MRSA และ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้ง เชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด คือ CMR-34 , ยับยั้ง เชื้อ MRSA ได้ดีที่สุด คือ CMR-50 และ ยับยั้ง เชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด คือ CMR-34 กับ CMR-50 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 15 มม. ,20 มม. และ 50 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่1

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
CMR-34	-	15STA	-	-	-	15	50
CMR-46	-	10STA	-	-	-	10	25
CMR-50	-	10STA	-	-	-	20	50

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.1 ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-50 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2) กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วย 3 ไอโซเลท ได้แก่ CMR-13, CMR-75 และ CMR-64 ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *E. coli* และ *M. luteus* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้ง เชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด คือ CMR-13 กับ CMR-64 , ยับยั้ง เชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด คือ CMR-13 และ ยับยั้ง เชื้อ *M. luteus* ได้ดีที่สุด คือ CMR-13 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 80 มม , 50 มม. และ 60 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ รูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่2

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
CMR-13	-	80	-	50	60	-	-
CMR-75	-	50	-	20	50STA	-	-
CMR-64	-	80	-	30	5STA	-	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.2 ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-13 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

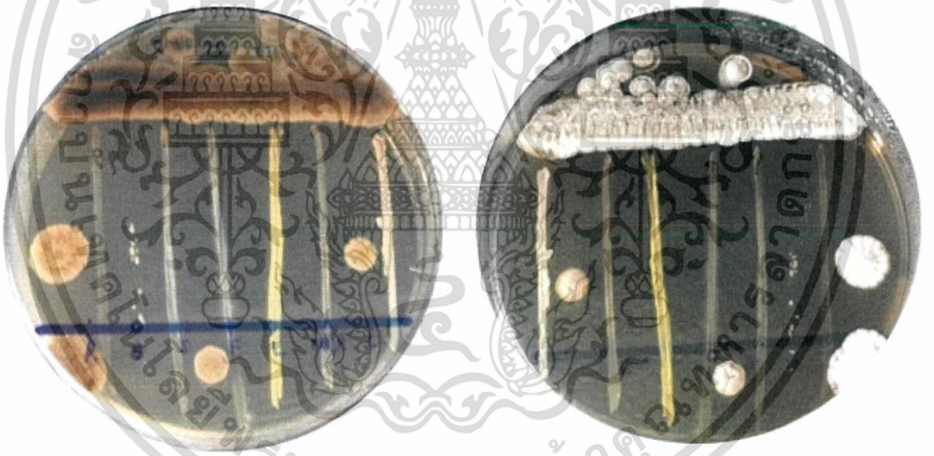
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3) กลุ่มที่ 3 ประกอบไปด้วย 2 ไอโซเลท ได้แก่ CMR-20 และCMR-30 ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด คือ CMR-30 และ ยับยั้ง เชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด คือ CMR-20 กับ CMR-30 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 80 มม และ 50 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ รูป 4.3

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทขั้นต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 3

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
CMR-20	30STA	50	-	-	-	-	-
CMR-30	80STA	50	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า



รูปที่ 4.3 ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-30 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4) กลุ่มที่ 4 ประกอบไปด้วย 5 ไอโซเลท ได้แก่ CMR-17, CMR-65, CMR-90,CML-3 และ CML-4 ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis, S. aureus* และ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้ง เชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด คือ CMR-17, CMR-65 และ CML-3 , ยับยั้ง เชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือ CMR-17 กับ CMR-65 และ ยับยั้ง เชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด คือ CMR-17 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 5 มม. ,15 มม.และ 40 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ รูป 4.4

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 4

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
CMR-17	-	5STA	15	-	-	-	40
CMR-65	-	5STA	15	-	-	-	35
CMR-90	-	2STA	10	-	-	-	30
CML-3	-	5STA	10	-	-	-	30
CML-4	-	2STA	10	-	-	-	30

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.4 ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-17 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.5) กลุ่มที่ 5 ประกอบไปด้วย 3 ไอโซเลท ได้แก่ CMR-42, CMR-54 และ CMR-56 ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis,* และ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้ง เชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด คือ CMR-42 กับ CMR-54 และ ยับยั้ง เชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด คือ CMR-42 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 50 มม. , 60 มม . ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และ รูป 4.5

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 5

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
CMR-42	-	50STA	-	-	-	-	60
CMR-54	-	50STA	-	-	-	-	20
CMR-56	-	30STA	-	-	-	-	50

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.5 ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-42 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.6) กลุ่มที่ 6 ประกอบไปด้วย 6 ไอโซเลท CMR-39, CMR-38, CMR-45, CMR-46, CMR-50 และ CML-2 ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis,* MRSA และ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้ง เชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด คือ CMR-39 กับ CMR-45 , ยับยั้ง เชื้อMRSA ได้ดีที่สุด คือ CMR-39 ,CMR-45 และ CMR-50 และ ยับยั้ง เชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด คือ CMR-45 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 60 มม. ,10 มม. และ 70 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และรูป 4.6

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 6

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
CMR-39	-	60STA	-	-	-	10STA	50
CMR-45	-	60STA	-	-	-	10STA	70
CMR-46	-	30STA	-	-	-	5STA	50
CMR-50	-	50STA	-	-	-	5STA	30
CMR-38	-	20STA	-	-	-	10STA	50
CML-2	-	30STA	-	-	-	5STA	60

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.6 ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-45 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.7) กลุ่มที่ 7 ประกอบไปด้วย 3 ไอโซเลท CMR-62, CMR-69และ CMR-71 ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้ง เชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด คือ CMR-62 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 20 มม. ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และรูป 4.7

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 7

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
CMR-62	-	-	-	-	-	-	20
CMR-69	-	-	-	-	-	-	15
CMR-71	-	-	-	-	-	-	15

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.7 ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-62 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.8) กลุ่มที่ 8 ประกอบไปด้วย 3 ไอโซเลท ได้แก่ CMR-55, CMR-74 และ CMR-86 การทดลองพบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *E.coli* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้ง เชื้อ *E.coli* ได้ดีที่สุด คือ CMR-55 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 5 มม. ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และรูป 4.8

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของยี่หร่ากลุ่มที่ 8

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
CMR-55	-	-	-	5	-	-	-
CMR-74	-	-	-	5	-	-	-
CMR-86	-	-	-	4	-	-	-

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.8 ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท CMR-55 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

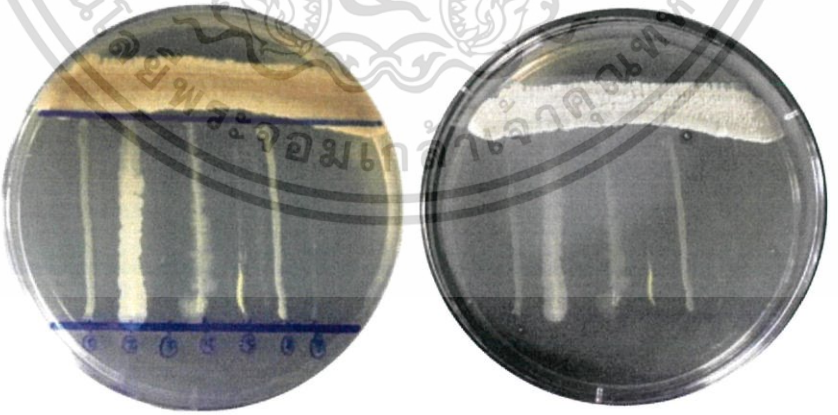
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.9) กลุ่มที่ 9 ประกอบไปด้วย 11 ไอโซเลท ได้แก่ APR-1, APR-2, APR-3, APR-4, APR-5, APR-6, APR-7, APR-8, APR-9, APR-13 และ APR-20 ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 11 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus, M. luteus และ C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้ง เชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือ APR-1, APR-2, APR-3, APR-5, APR-7 และ APR-13 , ยับยั้ง เชื้อ *M. luteus* ได้ดีที่สุด คือ APR-1 *และ* ยับยั้ง เชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด คือ APR-1 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 20 มม. , 18 มม. และ 20 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และรูป 4.9

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของฟ้าทะลายโจร กลุ่มที่ 9

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
APR-1	-	-	20	-	18	-	20
APR-2	-	-	20	-	10	-	5
APR-3	-	-	20	-	10	-	10
APR-4	-	-	18	-	10	-	10
APR-5	-	-	20	-	12	-	10
APR-6	-	-	15	-	15	-	15
APR-7	-	-	15	-	10	-	10
APR-8	-	-	20	-	15	-	10
APR-9	-	-	12	-	10	-	5
APR-13	-	-	20	-	15	-	12
APR-20	-	-	15	-	10	-	5

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า



รูปที่ 4.9ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท APR-1 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.10) กลุ่มที่ 10 ประกอบไปด้วย 3 ไอโซเลท ได้แก่ APR-21, APS-2 และ APS-3 ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ ซึ่งไอโซเลทที่ยับยั้ง เชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด คือ APR-11 โดยวัดจากบริเวณการยับยั้งได้ 5 มม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.11 และรูป 4.10

ตารางที่ 4.11แสดงผลการทดสอบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเบื้องต้นของฟ้าทะลายโจรกลุ่มที่10

รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้ง (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
APR-11	-	-	-	-	-	-	5
APL-2	-	-	-	-	-	-	5
APL-3	-	-	-	-	-	-	2

หมายเหตุ - = ไม่เกิดการยับยั้ง, STA (Static) = สามารถยับยั้งเชื้อแต่ไม่ฆ่า

รูปที่ 4.10 ฤทธิ์เบื้องต้นของไอโซเลท APR-11 ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการแสดงฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีททั้งหมด 42 ไอโซเลท สรุปได้ว่า สามารถยับยั้ง เชื้อ *P. aeruginosa* ได้ทั้งหมด 1 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 3 , ยับยั้ง เชื้อ *B. subtilis* ได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 , ยับยั้ง เชื้อ *S. aureus* ได้ทั้งหมด 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 4 และ 9 , ยับยั้ง เชื้อ *E. coli* ได้ทั้งหมด 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 2 และ 8 , ยับยั้ง เชื้อ *M. luteus* ได้ทั้งหมด 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 2 และ 9 , ยับยั้ง เชื้อ MRSA ได้ทั้งหมด 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 และ 6 และ ยับยั้ง เชื้อ *C. albicans* ได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1, 4, 5, 6, 7, 9 และ 10 ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

กลุ่ม	รหัสเชื้อ	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
1	CMR-34 CMR-46 CMR-50	-	+	-	-	-	+	+
2	CMR-13 CMR-75 CMR-64	-	+	-	+	+	-	-
3	CMR-2 CMR-30	+	+	-	-	-	-	-
4	CMR-17 CMR-65 CMR-9, CML-3	-	+	+	-	-	-	+
5	CMR-42 CMR-54 CMR-56	-	+	-	-	-	-	+
6	CMR-39 CMR-38 CMR-45 CMR-46 CMR-50 CML-2	-	+	-	-	-	+	+
7	CMR-62 CMR-69 CMR-70	-	-	-	-	-	-	+
8	CMR-55 CMR-74 CMR-86	-	-	-	+	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท (ต่อ)

กลุ่ม	รหัสเชื้อ	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
9	APR-1,APR-2 APR-3,APR-4 APR-5, APR-6 APR-7,APR-8 APR-9,APR-13 APR-20	-	-	+	-	+	-	+
10	APR-11,APL-2 APL-3	-	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ + เกิดการยับยั้ง
- ไม่เกิดการยับยั้ง

4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น(Phenotype characterization)

จากการจัดกลุ่มตามฤทธิ์การทดสอบเบื้องต้นได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม โดยจะคัดเลือกไอโซเลทที่มีฤทธิ์การยับยั้งเบื้องต้นที่ดีที่สุดมากลุ่มละ 1 ไอโซเลท ได้แก่ นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เริ่มจากนำมาเลี้ยงบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (Long working distence) กำลังขยาย 40X โดยจะทำการเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System, Mundie 1995) แสดงดังภาคผนวก ค

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีททั้ง 10 กลุ่ม มีดังนี้

กลุ่มที่ 1 : CMR-50

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอากาศสี Olive gray , เส้นใยอาหารสี Moderate olive และ สร้างสปอร์แบบบิดเป็นเกลียว แสดงดังรูปที่ 4.3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.11 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-50 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 : CMR-13

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอากาศสี Pale yellow green เส้นใยอาหารสี Strong reddish brown และ สร้างสปอร์แบบขดเป็นเกลียวคล้ายก้นหอยและแตกแขนงออกเป็นช่อ แสดงดังรูปที่ 4.3.2

รูปที่ 4.12 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-13 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 : CMR-30

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอากาศสี Light grayish reddish brown เส้นใยอาหารสี Strong reddish brown สร้างสปอร์แบบสายสั้นๆรวมเป็นกระจุก แสดงดังรูปที่ 4.3.3

รูปที่ 4.13 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-30 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 : CMR-17

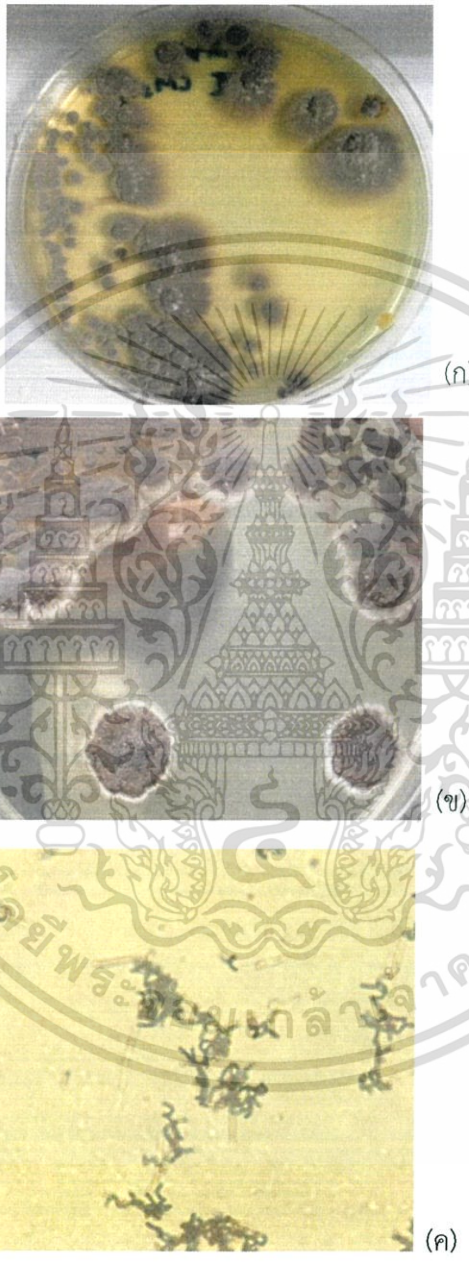
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish white เส้นใยอาหารสี Moderate yellow สร้างสปอร์แบบคล้ายลวดหนาม แสดงดังรูปที่ 4.3.4

รูปที่ 4.14 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR-17 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 : CMR-42

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลมผิวขรุขระ สร้างเส้นใยอากาศสี Dark olive brown เส้นใยอาหารสี Light greenish yellow สร้างสปอร์แบบคล้ายนิ้วมือ แสดงดังรูปที่ 4.3.5



รูปที่ 4.15 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR - 42 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 : CMR-45

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอากาศสี Grayish yellow เส้นใยอาหารสี Strong yellowish brown สร้างสปอร์แบบสายสั้นๆ แสดงดังรูปที่ 4.3.6

รูปที่ 4.16 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR - 45 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 7 : CMR-62

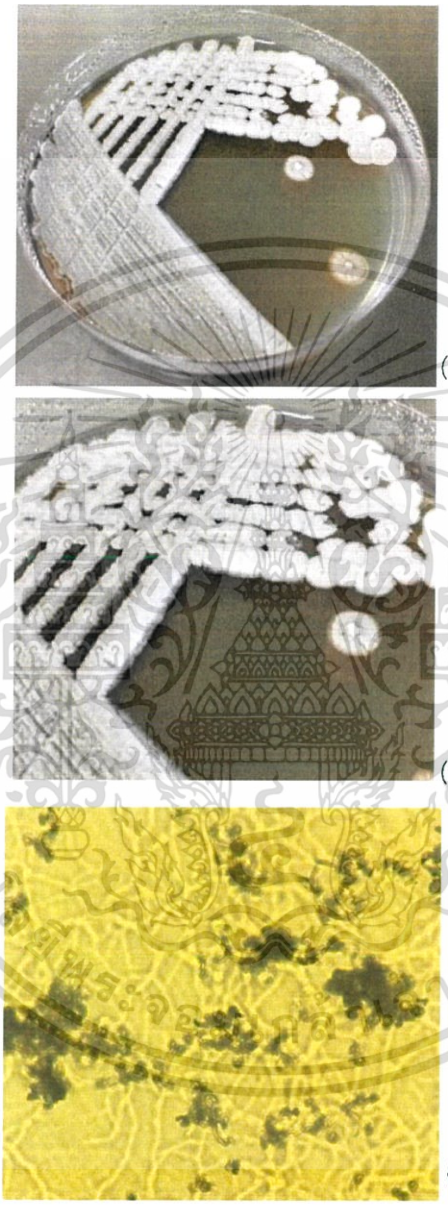
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลมแบน สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish white เส้นใยอาหารสี Brilliant orange สร้างสปอร์แบบเป็นกระจุกรอบเส้นใยคล้ายสวดหนาม แสดงดังรูปที่ 4.3.7

รูปที่ 4.17 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR - 62 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 8 : CMR-55

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอากาศสี Yellowish gray เส้นใยอาหารสี Brownish orange สร้างสปอร์แบบสายสั้นๆรวมตัวกันเป็นกระจุก แสดงดังรูปที่ 4.3.8



รูปที่ 4.18 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMR - 55 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 9 : APR-1

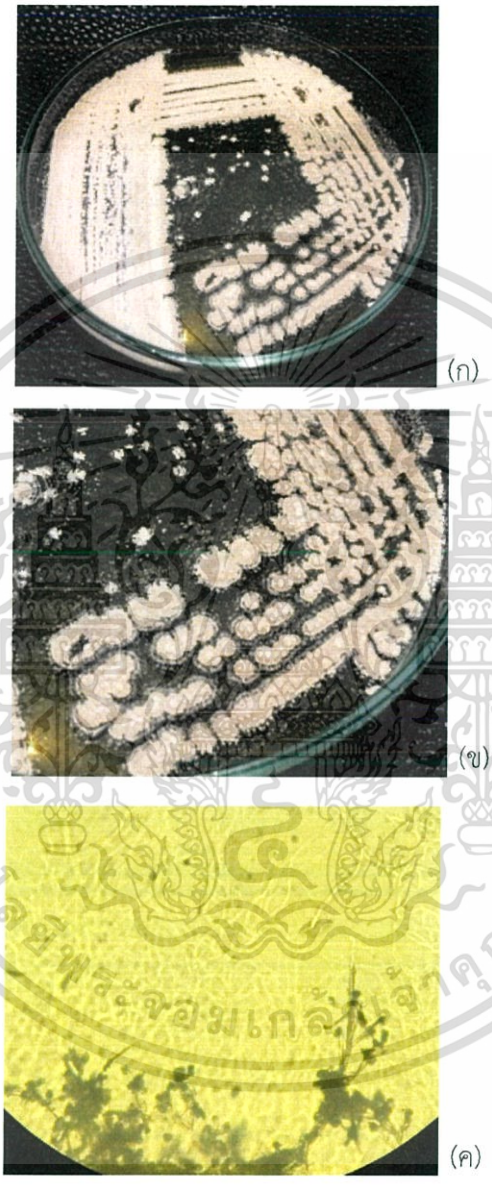
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม สร้างเส้นใยอากาศสี Grayish brown เส้นใยอาหารสี Brownish orange สร้างสปอร์เป็นกระจุกของสปอร์มีลักษณะคล้ายนิ้วมือ (finger-like sporangium) แสดงดังรูปที่ 4.3.9

รูปที่ 4.19 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท APR-1 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 10 : APR-11

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ลักษณะโคโลนีรูปร่างวงรีแบน สร้างเส้นใยอากาศสี Light brown เส้นใยอาหารสี Deep orange สร้างสปอร์เป็นแบบสายสั้นๆเรียงตัวสลับไปมาบนเส้นใยอากาศทำให้ดูคล้ายใบไม้ แสดงดังรูปที่ 4.3.10



รูปที่ 4.20 แสดงเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท APR-11 (ก. สีของโคโลนี ข. ลักษณะโคโลนี ค. สปอร์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

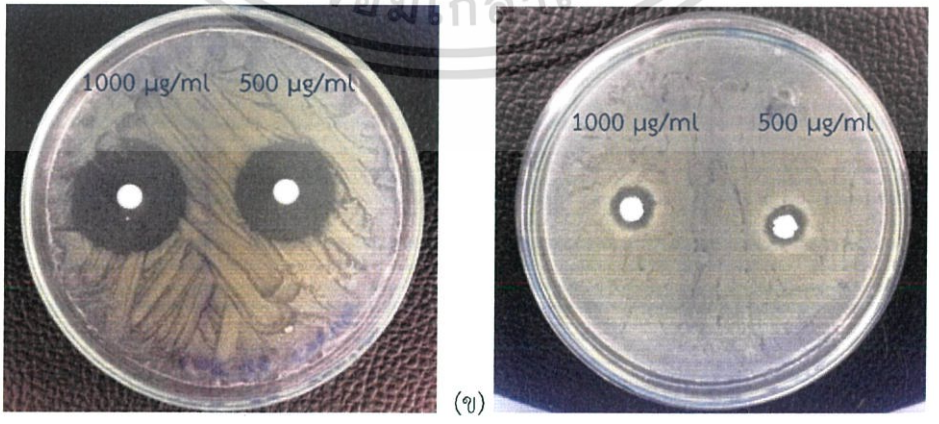
4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทด้วยวิธี Agar disc diffusion

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อทดสอบจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC2592, *Candida albicans* ATCC10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC28753, *Micrococcus luteus* ATCC25923 และ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* โดยหลังจากทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นและจัดกลุ่มของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทได้เป็น 10 กลุ่ม โดยมีตัวแทนของแต่ละกลุ่ม คือ CMR-50, CMR-13, CMR-20, CMR-17, CMR-42, CMR-45, CMR-62, CMR-55, APR-1 และ APR-11 จากนั้นจึงนำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทข้างต้นมาสกัดสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate และทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Agar disc diffusion จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากรากของยี่หร่า ไอโซเลทที่ CMR-17 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC6633 และ *Candida albicans* ATCC10231 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 500 และ 125 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13 และ รูปที่ 4.21)

ตารางที่ 4.13 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบยี่หร่าไอโซเลท CMR-17

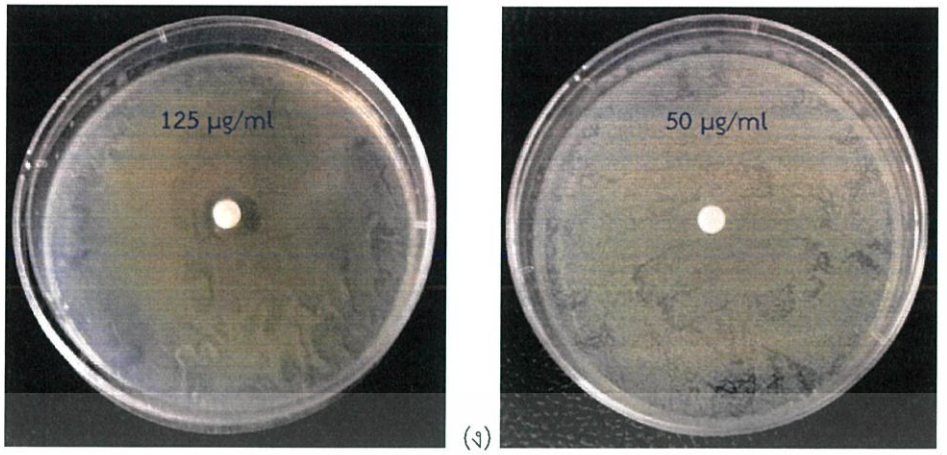
ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	บริเวณการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
1000	-	11	-	-	-	-	28
500	-	9	-	-	-	-	24
125	-	-	-	-	-	-	9
50	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดการยับยั้ง



(ก) (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบไอโซเลทที่ CMR-17 ที่ความเข้มข้น 1000 และ 500 µg/ml (ก) เชื้อ *C. albicans* (ข) เชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 125 และ 50 µg/ml (ค) และ (ง) เชื้อ *C. albicans*

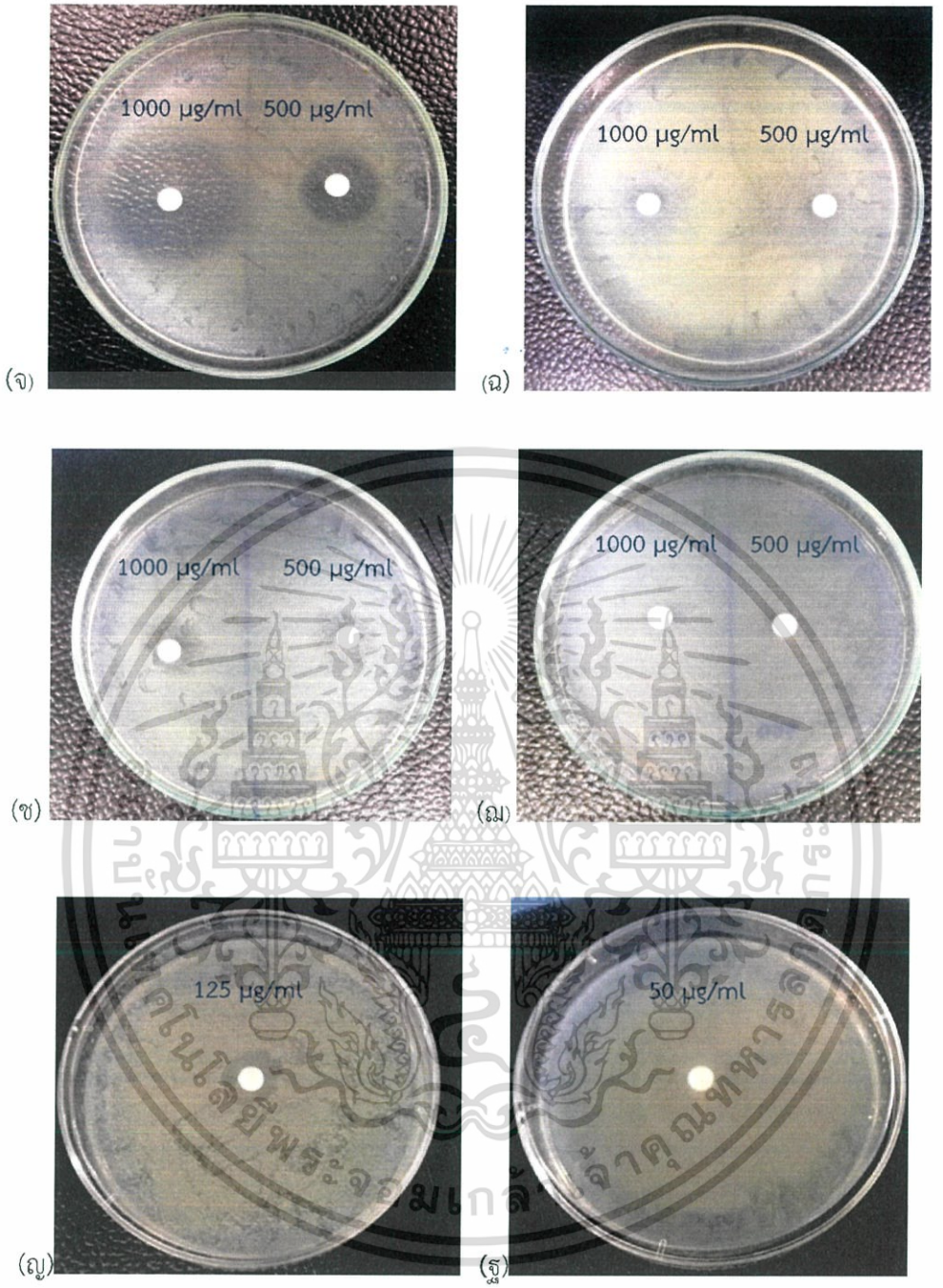
ส่วนสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากรากของฟ้าทะลายโจร ไอโซเลทที่ APR-1 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ATCC10231 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 1000 µg/ml , เชื้อ *Micrococcus luteus* ATCC25923 และเชื้อ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 500 µg/ml และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC2592 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 125 µg/ml (ตารางที่ 4.14 และ รูปที่ 4.22)

ตารางที่ 4.14 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบฟ้าทะลายโจรไอโซเลท APR-1

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	บริเวณการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ (มม.)						
	P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
1000	-	-	33	-	17	19.4	9
500	-	-	21	-	13	19	-
125	-	-	9	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดฟ้าทะลายโจรไอโซเลท APR-1 ที่ความเข้มข้น 1000 และ 500 µg/ml (จ) เชื้อ *S. aureus*, (ฉ) เชื้อ *M. luteus*, (ช) เชื้อ MRSA และ (ฌ) เชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 125 และ 50 µg/ml (ญ) และ (ฐ) เชื้อ *S. aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบต่อเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด สรุปได้ว่าจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจำนวน 10 ไอโซเลท จาก 10 กลุ่ม แสดงดังภาคผนวก จ มีเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเพียง 2 ไอโซเลท เท่านั้น ที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ ไอโซเลทที่ CMR-17 (ตัวแทนกลุ่มที่ 4) และ ไอโซเลทที่ APR-1 (ตัวแทนกลุ่มที่ 9) ที่ได้กล่าวข้างต้น และดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.15 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบโดยวิธี Agar disc diffusion

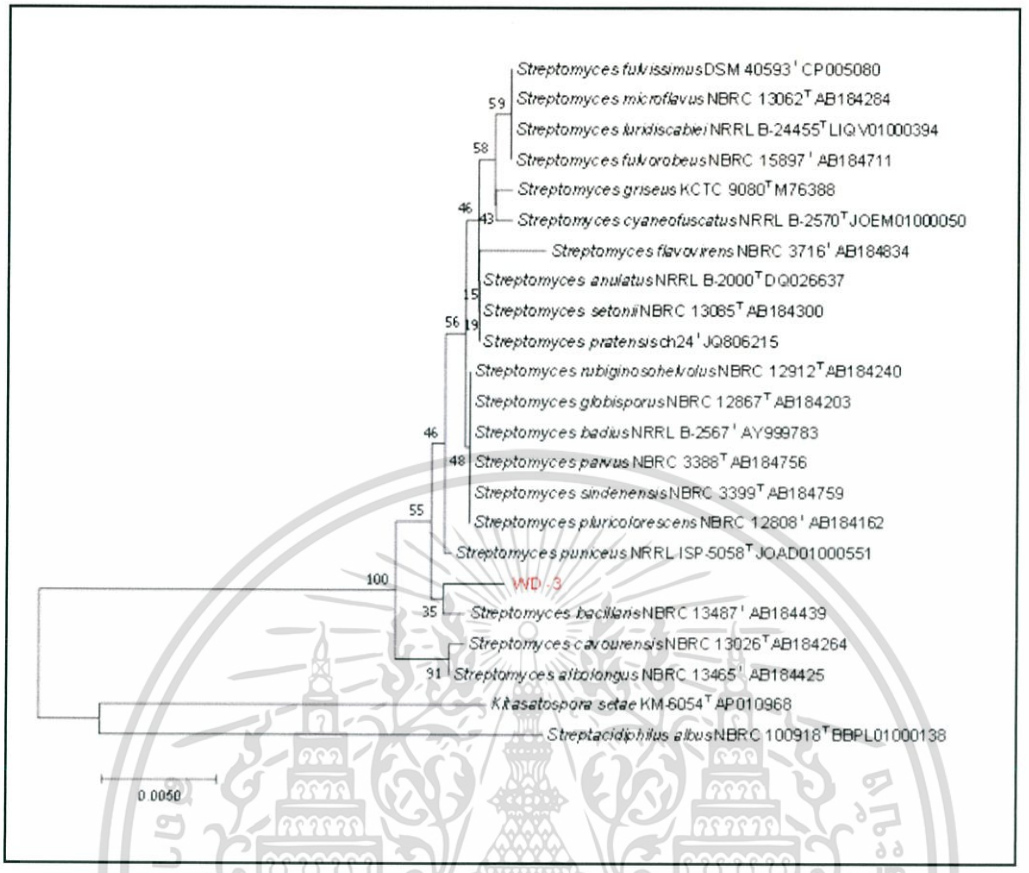
กลุ่ม	รหัสเชื้อ	บริเวณการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ (มม)						
		P. aeruginosa	*B. subtilis*	*S. aureus*	*E. coli*	*M. luteus*	MRSA	*C. albicans*
1	CMR-50	-	-	-	-	-	-	-
2	CMR-13	-	-	-	-	-	-	-
3	CMR-30	-	-	-	-	-	-	-
4	CMR-17	-	+	-	-	-	-	+
5	CMR-42	-	-	-	-	-	-	-
6	CMR-45	-	-	-	-	-	-	-
7	CMR-62	-	-	-	-	-	-	-
8	CMR-55	-	-	-	-	-	-	-
9	APR-1	-	+	+	-	+	+	+
10	APR-11	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: + คือ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ, - คือ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

4.5 การศึกษาลักษณะทาง Genotype ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทโดยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16s rRNA

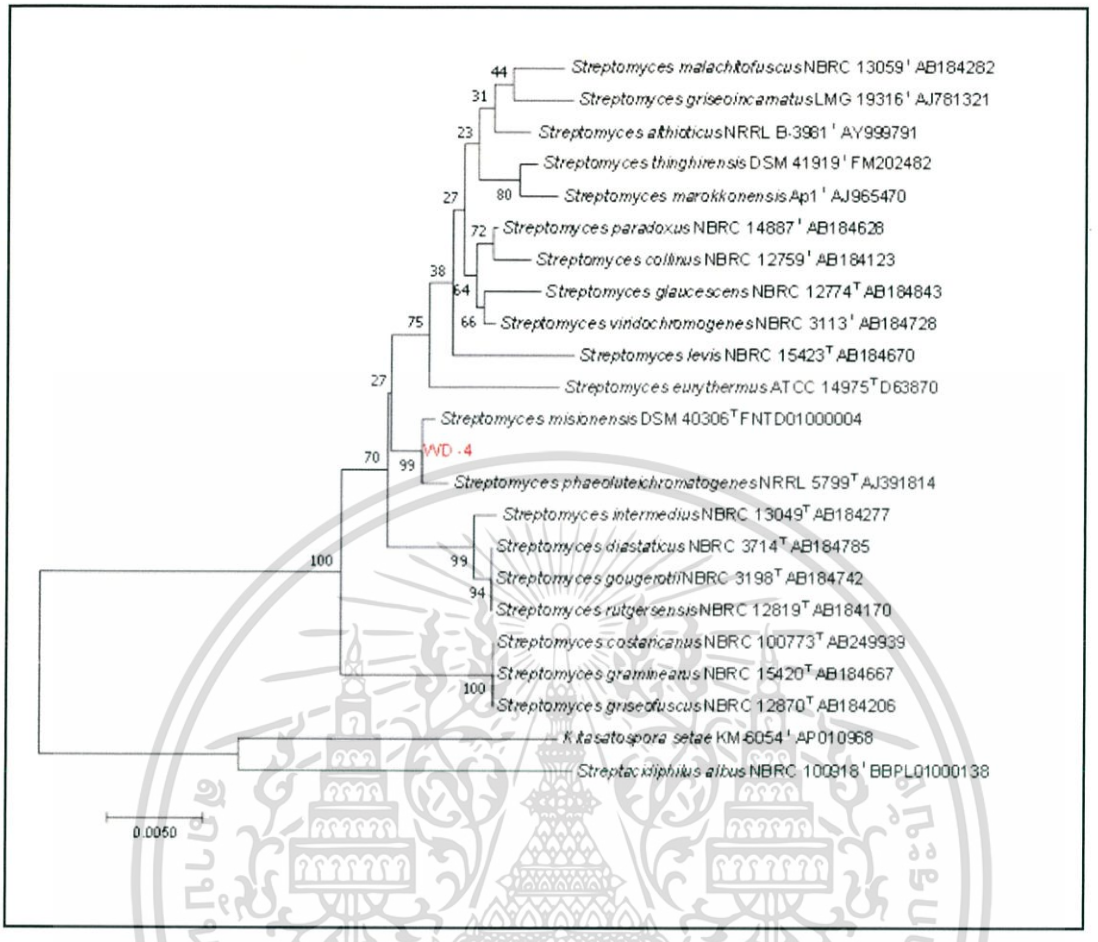
ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุถึงสกุลและชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากพืชสมุนไพรยี่หร่าและฟ้าทะลายโจร ซึ่งเลือกเฉพาะที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อทดสอบในหัวข้อ 4.4 ในการทดลองนี้ได้ทำการสกัดดีเอนเอของเชื้อแอคติโดนมัยสีทไอโซเลทที่ CMR-17 และไอโซเลทที่ APR-1 ด้วย Himedia kit จากนั้นจึงทำ PCR และหาลำดับเบสของยีนส์ 16s rRNA ทำการบลาสต์ และจัดกลุ่มวิวัฒนาการ Phylogenetic tree ผลการทดลองพบว่า เชื้อไอโซเลทที่ APR-1 (WD-3) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyses bacillaris* เท่ากับ 99.65% (รูปที่ 4.25) และพบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่ CMR-17 (WD-4) มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับ *Streptomyses misionensis* เท่ากับ 99.93% (รูปที่ 4.26)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 Phylogenetic tree แสดงสายวิวัฒนาการของไอโซเลท APR-1 (WD-3) โดยใช้ลำเบสของยีน 16S rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.24 Phylogenetic tree แสดงสายวิวัฒนาการของไอโซเลท APR-1 (WD-3) โดยใช้ลำเบสของยีน 16S rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานวิจัยนี้ เนื่องจากต้องการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ และเหง้า ของยี่หร่า และฟ้าทะลายโจร จึงได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนพืชด้วยวิธี Surface Sterilized โดยใช้ 1% Sodium hypochlorite ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Disinfectant (ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์) โดยไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืช ถ้าใช้ในระยะเวลาที่เหมาะสมต่อชิ้นส่วนนั้นๆ (สมชาย, 2552)

จากนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทโดยวิธี Agar disc diffusion พบว่า ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น และ ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบนั้นไม่สัมพันธ์กัน เนื่องจากทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทใช้สาร Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย ซึ่ง Ethyl acetate นั้นเป็นสารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นขั้วกลางที่มีประสิทธิภาพในการดึงสารสำคัญส่วนใหญ่ออกจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีท เมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติเป็นขั้วต่ำและขั้วสูง สอดคล้องกับการรายงานของ ธีรวุฒิ (2558) ซึ่งพบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Ethyl acetate มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ เชื้อ *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย Hexane และ Dichloromethane ที่มีขั้วต่ำกว่า

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากยี่หร่าไอโซเลทที่ CMR-17 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC6633 และ *C. albicans* ATCC10231 ได้ ส่วนสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากฟ้าทะลายโจรไอโซเลทที่ APR-1 สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC10231, เชื้อ *M. luteus* ATCC25923, เชื้อ MRSA และเชื้อ *S. aureus* ATCC2592 ได้ จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกแต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ (*E. coli* ATCC25922 และ เชื้อ *P. aeruginosa* ATCC278533) ซึ่งสาเหตุที่เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องมาจากความแตกต่างทางองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทสร้างขึ้น มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ที่มีผลต่อการสร้าง Peptidoglycan เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์สารตั้งต้นของ Peptidoglycan และยับยั้ง Transpeptidation เป็นต้น ทั้งนี้ชั้นของ Peptidoglycan ดังกล่าวเป็นโครงสร้างส่วนใหญ่ที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของ Peptidoglycan ที่บางกว่าและมีผนังเซลล์ชั้นนอกที่เป็น Lipopolysaccharide จึงทำให้เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า (Boudjella *et al.*, 2006)

ในการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทนั้น จากผลการทดลองพบว่า เชื้อไอโซเลทที่ CMR-17 และ ไอโซเลทที่ APR-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces misionensis* และ *Streptomyces bacillaris* ตามลำดับ ซึ่งสกุล *Streptomyces* ถือเป็นสกุลของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากสมุนไพรส่วนใหญ่ (สุจรรยา, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปงานวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากพืชสมุนไพร 2 ชนิดได้แก่ ยี่หร่าและฟ้าทะลายโจร ในครั้งนี้ พบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจำนวน 89 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากยี่หร่าและฟ้าทะลายโจรจำนวน 52 และ 37 ไอโซเลท ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นกับเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Candida albicans* ATCC10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC278533, *Micrococcus luteus* ATCC25923 และ Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) พบว่า มีเพียง 47 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น จากนั้นได้ทำการจัดกลุ่มเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีททั้ง 47 ไอโซเลท โดยดูจากฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นและลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้จำนวนทั้งหมด 10 กลุ่ม ซึ่งมีตัวแทนกลุ่มได้แก่ CMR-50, CMR-13, CMR-20, CMR-17, CMR-42, CMR-45, CMR-62, CMR-55, APR-1 และ APR-11

จากนั้นจึงนำทั้ง 10 ไอโซเลทมาสกัดสารสกัดหยาบ และนำมาทดสอบกับเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากไอโซเลทที่ CMR-17 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC6633 และ *C. albicans* ATCC10231 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 500 µg/ml และ 125 µg/ml ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากไอโซเลทที่ APR-1 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC10231 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 1000 µg/ml, เชื้อ *M.luteus* ATCC25923 และเชื้อ MRSA ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 500 µg/ml และเชื้อ *S. aureus* ATCC2592 ที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 125 µg/ml

จากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโดนมัยสีทไอโซเลทที่ CMR-17 และ ไอโซเลทที่ APR-1 พบว่า เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่ CMR-17 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyses misionensis* เท่ากับ 99.93% ส่วนเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่ APR-1 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyses bacillaris* เท่ากับ 99.65%

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเพียง 10 ไอโซเลท ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มจากเชื้อที่มีฤทธิ์เบื้องต้นทั้งหมด 42 ไอโซเลท และพบเพียงแค่ 2 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังนั้น ยังเหลืออีกจำนวนทั้งสิ้น 32 ไอโซเลท ที่ควรจะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบด้วย Ethyl acetate, สัณฐานวิทยา และอนุกรมวิธาน เพื่อดูถึงฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบต่อเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด และสามารถบ่งชี้ถึงความหลากหลายของสกุลและชนิดของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่พบในยี่หร่าและฟ้าทะลายโจรต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิตติ ท่าไว. 2557. “บทที่ 1 การแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย.” หน้า 4-14. ใน เอกสารประกอบการเรียนวิชาปฏิบัติการแบคทีเรียและรา. กรุงเทพมหานคร : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณัฐกฤตา สุวรรณทีป. 2555. “ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยสารสกัดชบา.” รายงานการวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.

พินิจ กล่ำคลองตัน. “การแพร่กระจายเชื้อ Pseudomonas aeruginosa. ในสถานพยาบาล : กรณีศึกษาโรงพยาบาลนภาลัย จังหวัดสมุทรสงคราม” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ภิญญามนตร์ สีขาว. 2557. “การยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus และ Micrococcus-luteus ของสารสกัดใบสาบเสือในสบู่เหลว.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

วสุ ปฐมอารีย์. 2553 “การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทจากถ้ำและความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของสแตฟฟิโลคอคคัสออเรียสดื้อยา.” สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์ และคณะ. 2555. “การติดตามสถานการณ์ของเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ที่ไวต่อ vancomycin และ chlorhexidine ลดลงในโรงพยาบาลศรีนครินทร์.” วารสารเทคนิคการแพทย์และกายบำบัด. 24(1)

วาสนา กิตติกนกรัตน์. 2546 “การศึกษาสูตรและอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ Bacillus subtilis TISTR 001.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. อิสรา จันทร์วิทยานุชิต และคณะ. 2548. “*Staphylococcus aureus*.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาวิชาการพยาบาลด้านการควบคุมการติดเชื้อ, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.

สุรชัย รัตนสุข. 2557 “ประสิทธิภาพของสมุนไพรพื้นบ้านในการยับยั้งการเจริญของ Canida albicans.” วารสารวิทยาศาตร์และเทคโนโลยี (สวทช.). 1(2) : 34-35.

อาภากร ศิลป์ประเสริฐ. 2554 “ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus*.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acharya, T. 2016. ***Candida albicans*: pathogenesis, diseases and laboratory diagnosis**. [Online]. Available : http://microbeonline.com/candida-albicans pathogenesis-diagnosis.

Adegboye, M.F.and Babalola, O.O.2013. "Isolation, characterizationand antibacterial activity of *Streptomycetes* from rhizosphere soils in North WestProvince,South Africa."Asia Life Sci.9: 403-421.

Al-Dhabi, N.A. Esmail, A.G. Duraipandiyan, V. Arasu, M.V.and Salem-Bekhit, M.M. 2016. "Isolation, identification and screening of antimicrobialthermophilic *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharbanhot spring, Saudi Arabia." Extremophiles. 20 :79–90.

Alexander, M. 1977. **Introduction to soil microbiology**. 2nd. ed. John Wile and Sons, New York.

Arai, T. 1975. **Culture media for Actinomycetes.** The Society for Actinomycetes. Japan :Asakura Publishing.

Arunachalam Ruckmani, Ishwinder Kaur, Peter Schumann, Hans-Peter Klenk and Shanmugam Mayilraj. 2011. "Calidifontibacter indicus gen. nov., sp. nov., a member of the family Dermacoccaceae isolated from a hot spring, and emended description of the family Dermacoccaceae." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology : 2419–2424

Atlas, R. M. 1995. **Handbook of Media For Environmental Microbiology**. Florida : CRC Press.

Azman, A.S. Othman, I. Velu, S.S. Chan, K.G. Lee, L.H. 2015. "Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity."Front. Microbiol. 6:856.

Bardone, M.R. Paternoster, M. and Coronelli, C. 1978. "Teichomycins, new antibiotics from Actinoplane steichomyceticus nov. sp." J. Antibiotics. 31 : 170–177.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bowen, T. Stackebrandt, E. Dorsch, M. and Embley, T.M. 1989. "The phylogeny of *Amycolata autotrophica, Kibdelosporangium aridum* and *Saccharothrix australiensis*."J. Gen. *Microbiol*. 1352529-2536.

Butler, M.S. 2004. "The role of natural products chemistry in drug discovery." J. *Nat. Prod*. 67 : 2141-2153.

Chaudhary, N.and Prabhu, S. 2016. "Thermophilic Actinomycetes from Hot Water Spring Capable of Producing Enzymes of Industrial Importance." *International Journal of Research Studies in Bioscience.* (IJRSB) 4(6) : 29-35.

Ciabatti, R.and Cavalleri, B. 1989."Ramoplanin (A/16686): a newglycodepsipeptide antibiotic from *Actinoplanes*."*Progr. Ind. Microbiol*.27: 205–219.

Coronelli, C. Pagani, H. Bardone, M.R. and Lancini, G.C. 1974. "Purpuromycin, a new antibiotic isolated from Actinoplane sianthinogenes n. sp." J. Antibiotics. 27 : 161–168.

Couch, J. N. 1954. "The genus Actinoplanes and its relatives."*Trans. N. Y. Acad. Sci.* 16:315–318.

Couch, J.N. 1963. "Some new genera and species of the *Actinoplanaceae*."*J. Elisha. Mitchell. Sci. Soc*. 79 : 53-70.

Couch, J.N., and Bland,C.E. 1974. The Actinoplanaceae. In: R.E. Buchanan and N.E. Gibbons(Eds.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Williams and Wilkins.Baltimore, MD. 706–723.

Embley, T.M. Smida, J. and Stackebrandt, E. 1988. "The phylogeny of mycolateless wallchemotype IV actinomycetes and description of *Pseudonocardiaceae fam.*nov."Syst. Appl. Microbiol. 11: 44-52.

Empadinhas, N. Mendes, V. Simo˜es, C. Santos, M.S. Mingote, A. Lamosa, P. Santos, H. and Costa, M.S. 2007. "Organic solutes in Rubrobacter xylanophilus: the first example of di-myo-inositol-phosphate in a thermophile." *Extremophiles* 11(5) : 667–673.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ettinger, L. Corbaz, R. and Hutter, R. 1958. "Zur Systematik der Actinomyceten.4. EineArteinteilung der Gattung Streptomyces waseman et Henrici." *Arch. Mikrobiol*. 31 :326-358.

Fandi, K. Al-Muaikel, N. and Al-Momani, F. 2014. "Antimicrobial activities of some thermophiles isolated from Jordan hot springs." *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS).* 2(1) : 57-60.

Fergus, C.L. 1967."Resistance of spores of some thermophilic actinomycetes to high temperature." Mycopathologia et mycologia applicate. 32(3) : 205-208.

Hayakawa M. 2008. "Studies on the isolation anddistribution of rare Actinomycetes in soil." *Actinomycetologica*.22: 12–19.

Hayakawa, M. and Nonomura, H. 1987. "Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes." *Journal of Fermentation Technology.* 65(5) : 501-509.

Hayakawa, M. Iino, H. Takeuchi, S. and Yamazaki, T. 1997."Applicationof a method incorporating treatment with chloramine-T for theselective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil."*J. Ferm. Bioeng*. 84: 599–602

Hayakawa, M. Momose, Y. Kajiura, T. Yamazaki, T. Tamura, T. Hatano, K.and Nonomura, H. 1995. "Aselective isolation method for *Actinomaduraviridis* in soil."*J. Ferment. Bioeng*. 79(3): 287-289.

Hayakawa, M. Momose, Y. Yamazaki, T.and Nonomura, H. 1996. "A method for the selective isolation of Microtetrasporaglauca and related four-spored actinomycetes from soil."*J. Appl. Bacteriol*.80: 375–386.

Hayakawa, M. Otoguro, M. Takeuchi, T. Yamazaki, T. and Iimura, Y. 2000. "Application of a method incorporatingdifferential centrifugation for selective isolation of motileactinomycetes in soil and plant litter."*Ant. Leeuwenhoek* 78 : 171–185.

Hayakawa, M. Sadakata, T. Kajiura, T.and Nonomura, H.1991a. "New methods for the highly selectiveisolation of *Micromonospora* and *Microbisporafrom* soil."J. Ferment. *Bioeng.* 72: 320–326.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hayakawa, M. Tamura, T. Iino, H. and Nonomura, H. 1991b. "New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangiumand Dactylosporangium* from soil."*J. Ferment. Bioeng*. 72 : 327–333.

Henssen, A. 1957. "Beitrge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten." *Arch. Microbiol*.26:373–414.

Holt, J.G. Krieg, N.R. Sneath, P.H.A. Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. **Bergey's Manual ofDeterminative Bacteriology**. 9th ed., Baltimore, MD, USA : Williams and Wilkins

Iinuma, S. Yokota, A. Hasegawas, T. and Kanamura, T. 1994. "Actinocorallia gen. nov., a newgenus of the order *Actinomycetales*." *Int. J. Syst. Bacteriol*. 44:235–245.

Jadoon, M.A. Ahmad, T. Ur Rehman, M.M. Khan, A. and Majid, A. 2014. "Isolation and Identification of Thermophillic Actinomycetes fromHot Water Springs from Azad Jammu and Kashmir Pakistan forthe Production of Thermophillic Amylase." *World Applied Sciences Journal*. 30 (3): 350-354.

Kenneth Todar. 2017. *Pseudomonas aeruginosa*. [Online]. Available : http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html (สืบค้นวันที่ 9 มิถุนายน 2560)

Khanna, M. Solanki, R. and Lal, R. 2011. "Selective Isolation of Rare Actinomycetes ProducingNovel Antimicrobial Compounds." *International Journal of Advanced Biotechnology and Research ISSN* 0976-2612. 2(3) : 357-375.

Kishore, P. 2011. "Isolation, characterization and identification of *Actinobacteria* of Mangrove ecosystem, Bhitarkanika,Odisha." Project of Master of science in life science. National Institute of TechnologyRourkela, Odisha.

Klanbut, K. 2013. "The role of phospholipids in the growth and development of *Streptomyces*." A thesis for the degree of Doctor of philosophy. University of Strathclyde

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract malt extract agar (ISP2)

Yeast extract	4.0 กรัม
Malt extract	10.0 กรัม
Glucose	4.0 กรัม
Agar	20.0 กรัม
pH	7.0

นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Starch Casein Agar

Sodium caseinate	1.0 กรัม
Soluble starch	10.0 กรัม
K_2HPO_4	0.5 กรัม
Agar	15.0 กรัม
Distilled Water	1 กรัม

pH 7.0-7.5

นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที Nystatin (ละลายใน 100% DMSO ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร) 100.0 mg

3. Muller's hinton agar

Beef extract power	2 กรัม
Acid Digest of Casein	17.5 กรัม
Soluble starch Agar	1.5 กรัม
Distilled water	15 กรัม
pH	7.3+-0.1

ชั่ง MHA 38กรัม ลงในน้ำ 1 ลิตรและเติมเกลือ Nacl 15 กรัม ต้มให้ละลายแล้วใส่ในขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15นาที

4. Potato dextrose agar (PDA)

PDA	39 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Trypticase soy agar (TSA)

Trytone	15 กรัม
Soytone	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

รหัสเชื้อแอคติโนมัยสีท

พืช/ส่วนของพืช	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ยี่หร่า (*Cuminum cyminum*)	CM	
Root	CMR	CMR-34, CMR-46, CMR-50, CMR13, CMR-75, CMR-64, CMR-2, CMR-30, CMR-17, CMR-65, CMR-90, CMR42, CMR-54, CMR-56, CMR-34, CMR-45, CMR-38, CMR-96, CMR-50, CMR-62, CMR-69, CMR-71, CMR-55, CMR-74, CMR-86, CMR-1, CMR-11, CMR-19, CMR-22, CMR-51, CMR-53, CMR-72, CMR-77, CMR-63, CMR-4, CMR-44, CMR-16, CMR-31, CMR-66, CMR-25, CMR-70, CMR-8, CMR-5, และ CMR-1
Stem	CMS	CMS-1, CMS-2, CMS-3 และ CMS-4
Leave	CML	CML-1, CML-2, CML-3 และ CML-4
ฟ้าทลายโจร (*Andrographis paniculata*)	AP	
Root	APR	APR-1, APR-2, APR-3, APR-4, APR-5, APR-6, APR-7, APR-8, APR-9, APR-10, APR-11, APR-13, APR-14, APR-15, APR-16, APR-17, APR-18, APR-19, APR-20, APR-21, APR-22, APR-23, APR-24, APR-25, APR-26, APR-37 และ APR-26
Stem	APS	APS-1, APS-2, APS-3, APS-4, APS-5, APS-6, APS-7, APS-8 และ APS-9
Leave	APL	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

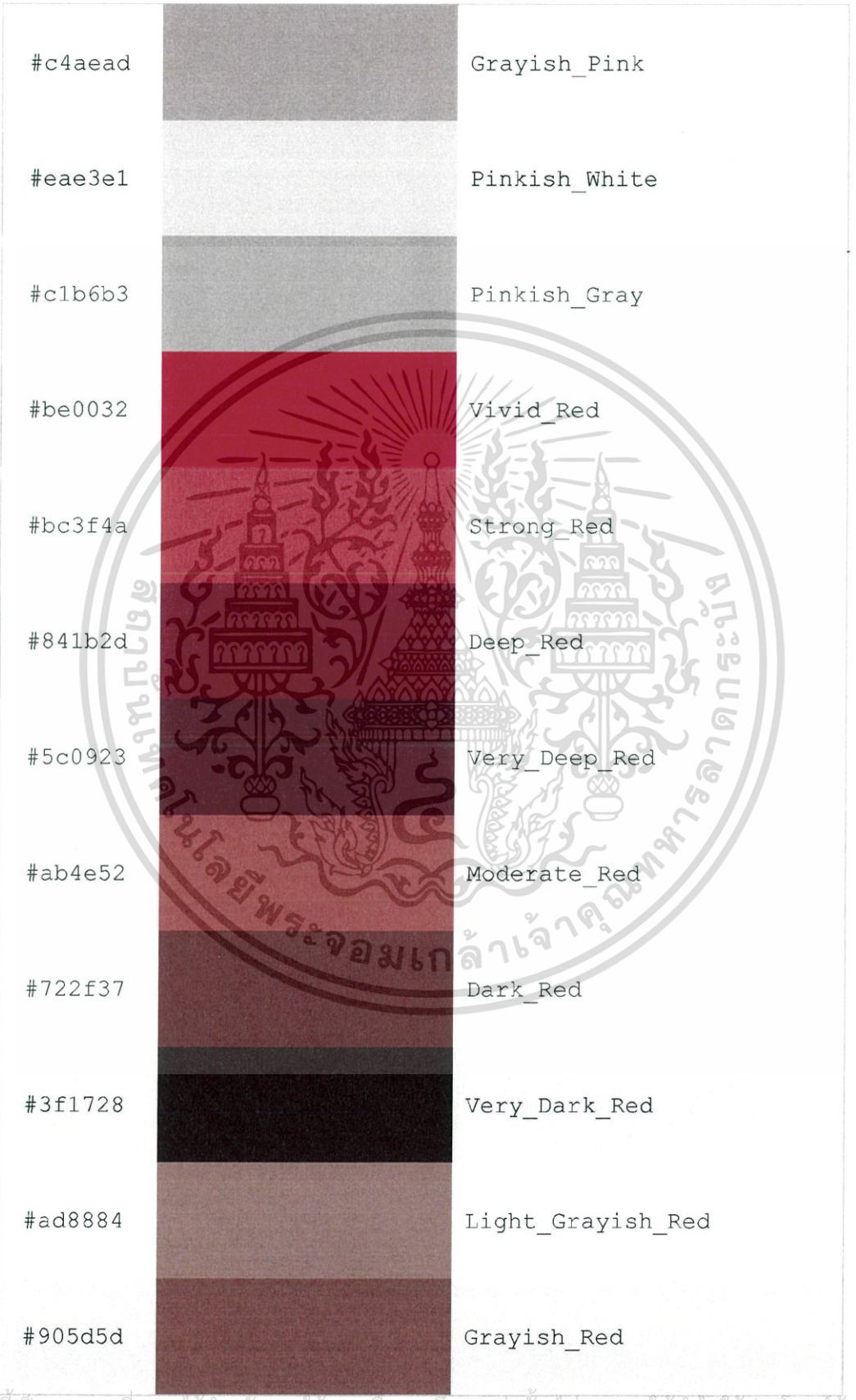
กระดาษสีมาตรฐาน

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System)

Hex	Color	Name
#ffb5ba		Vivid_Pink
#ea9399		Strong_Pink
#e4717a		Deep_Pink
#f9ccca		Light_Pink
#dea5a4		Moderate_Pink
#c08081		Dark_Pink
#ead8d7		Pale_Pink

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

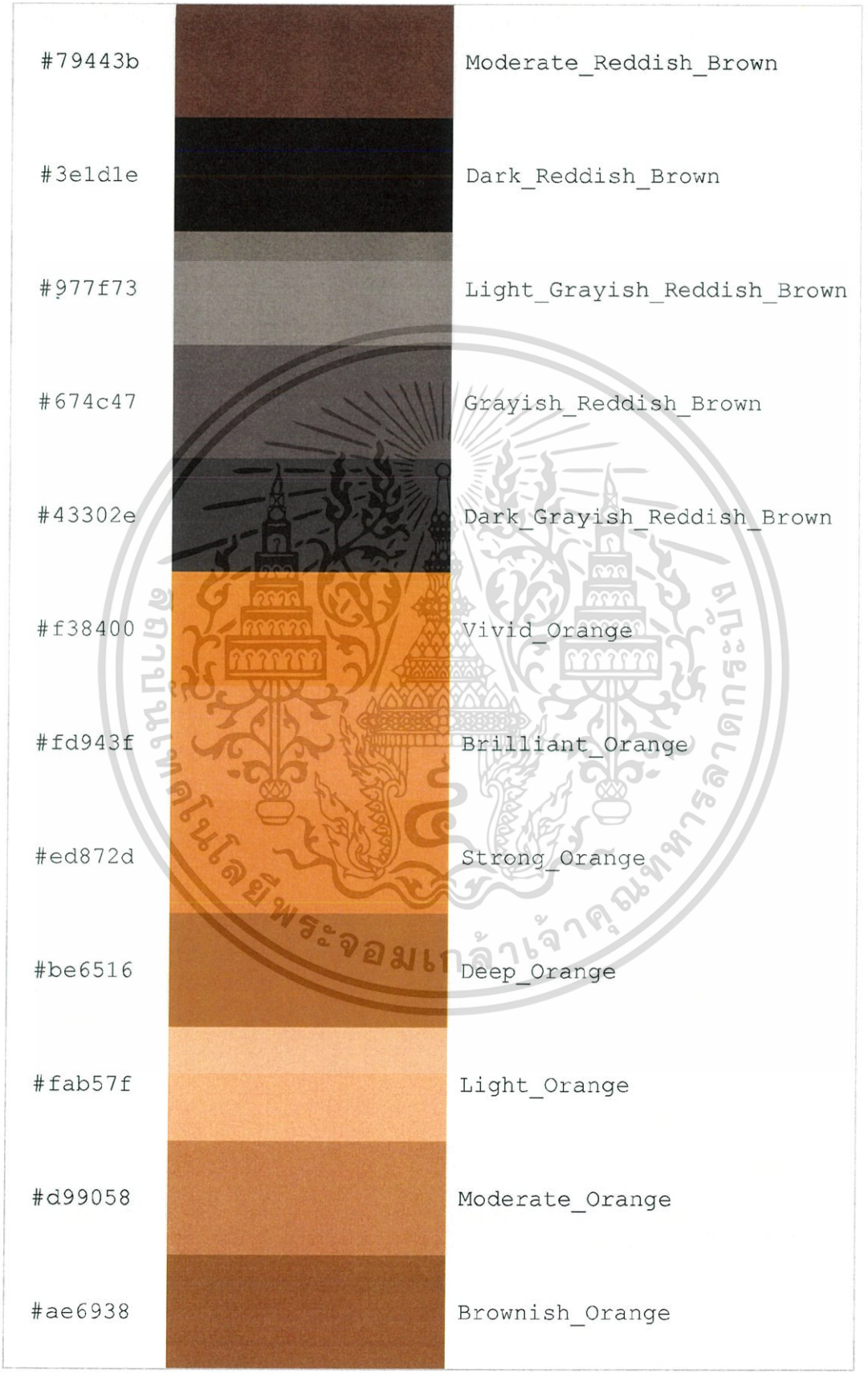
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#ecd5c5		Pale_Yellowish_Pink
#c7ada3		Grayish_Yellowish_Pink
#c2ac99		Brownish_Pink
#e25822		Vivid_Reddish_Orange
#d9603b		Strong_Reddish_Orange
#aa381e		Deep_Reddish_Orange
#cb6d51		Moderate_Reddish_Orange
#9e4732		Dark_Reddish_Orange
#b4745e		Grayish_Reddish_Orange
#882d17		Strong_Reddish_Brown
#56070c		Deep_Reddish_Brown
#a87c6d		Light_Reddish_Brown

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

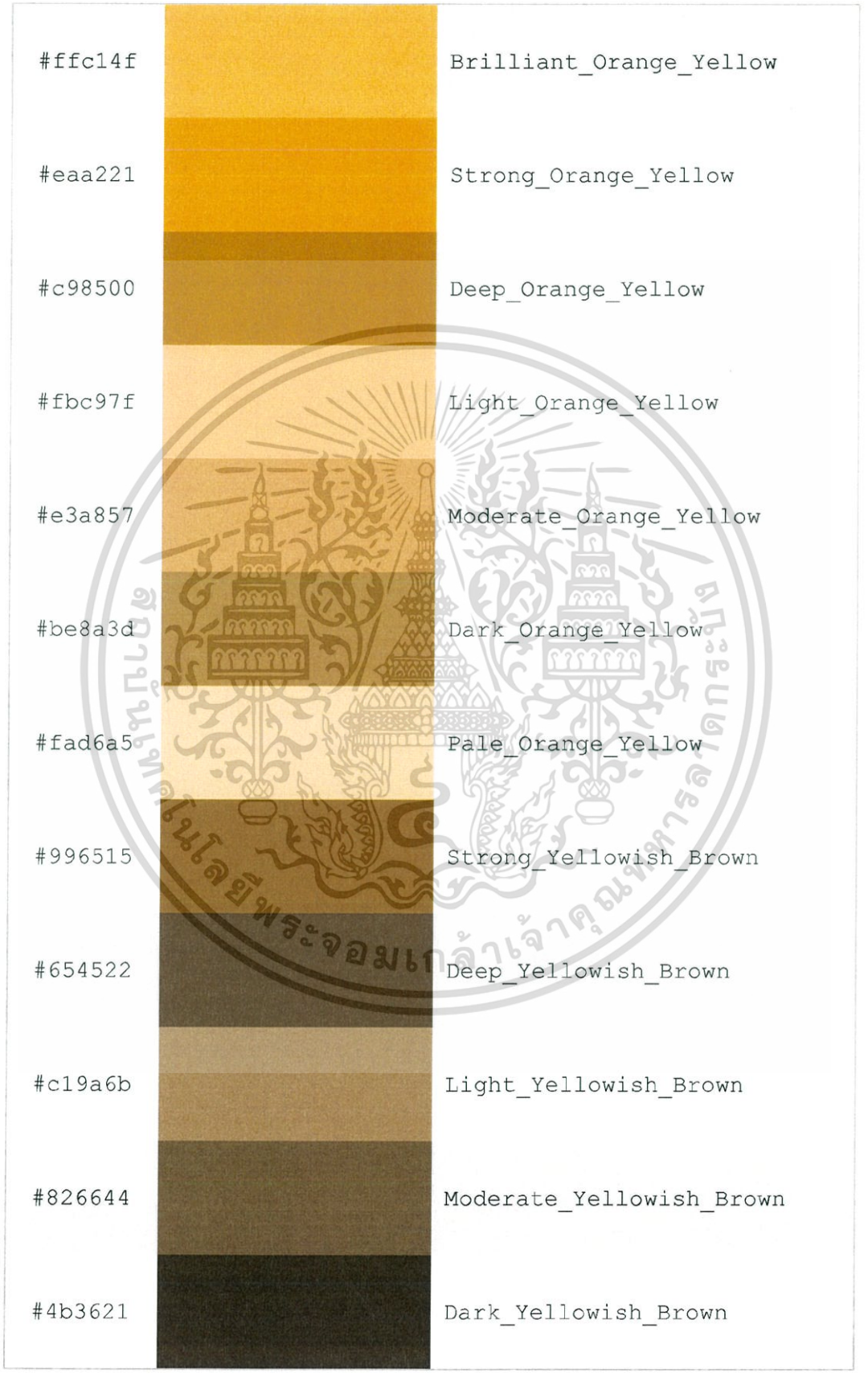


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#ae9b82		Light_Grayish_Yellowish_Brown
#7e6d5a		Grayish_Yellowish_Brown
#483c32		Dark_Grayish_Yellowish_Brown
#f3c300		Vivid_Yellow
#fada5e		Brilliant_Yellow
#d4af37		Strong_Yellow
#af8d13		Deep_Yellow
#f8de7e		Light_Yellow
#c9ae5d		Moderate_Yellow
#ab9144		Dark_Yellow
#f3e5ab		Pale_Yellow
#c2b280		Grayish_Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

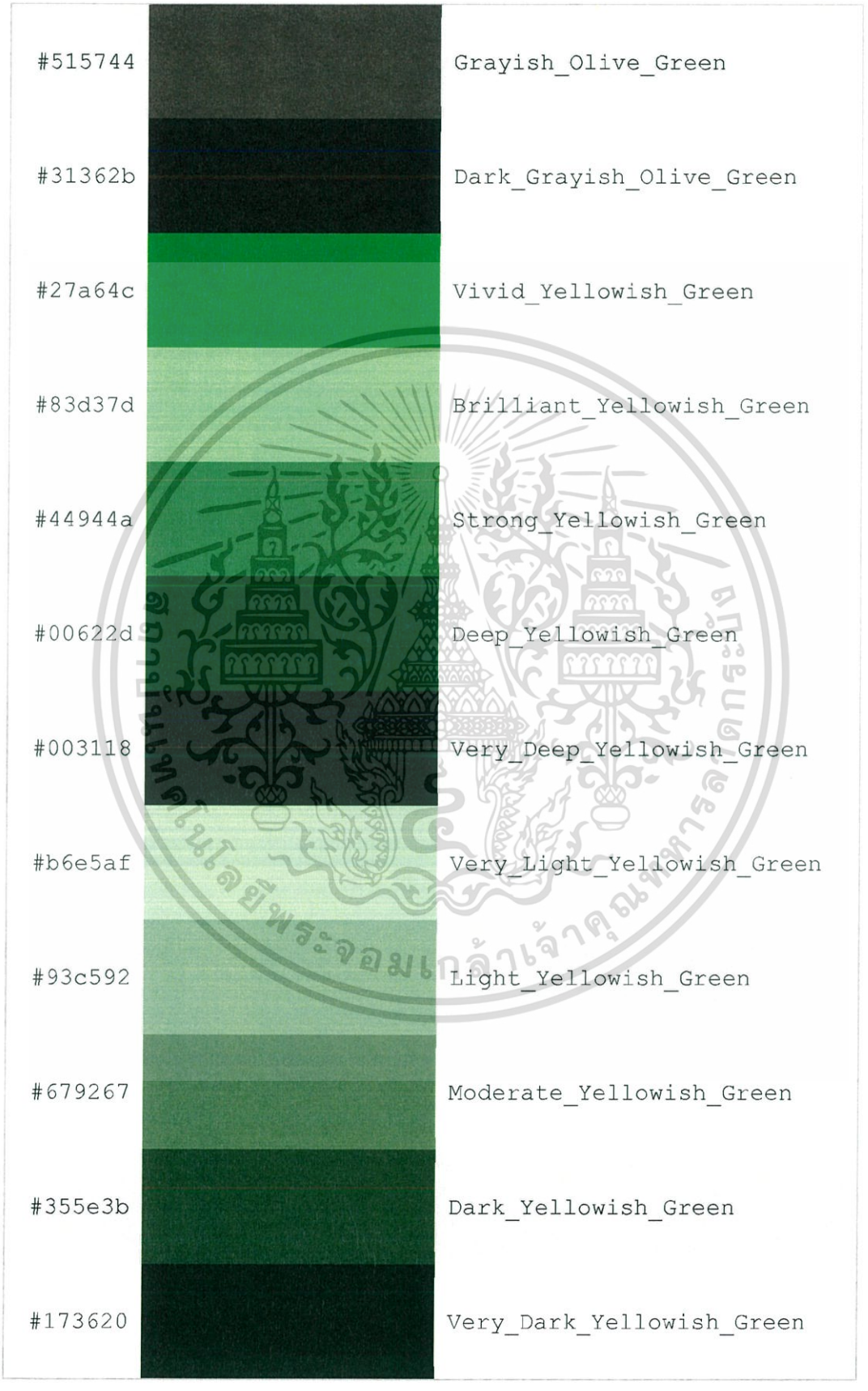
กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

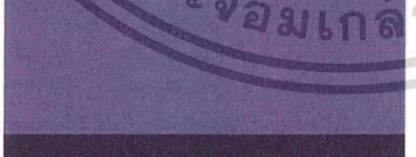
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#36454f		Dark_Grayish_Blue
#202830		Blackish_Blue
#e9e9ed		Bluish_White
#b4bcc0		Light_Bluish_Gray
#81878b		Bluish_Gray
#51585e		Dark_Bluish_Gray
#202428		Bluish_Black
#30267a		Vivid_Purplish_Blue
#6c79b8		Brilliant_Purplish_Blue
#545aa7		Strong_Purplish_Blue
#272458		Deep_Purplish_Blue
#b3bce2		Very_Light_Purplish_Blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#8791bf		Light_Purplish_Blue
#4e5180		Moderate_Purplish_Blue
#252440		Dark_Purplish_Blue
#c0c8e1		Very_Pale_Purplish_Blue
#8c92ac		Pale_Purplish_Blue
#4c516d		Grayish_Purplish_Blue
#9065ca		Vivid_Violet
#7e73b8		Brilliant_Violet
#604e97		Strong_Violet
#32174d		Deep_Violet
#dcd0ff		Very_Light_Violet
#8c82b6		Light_Violet

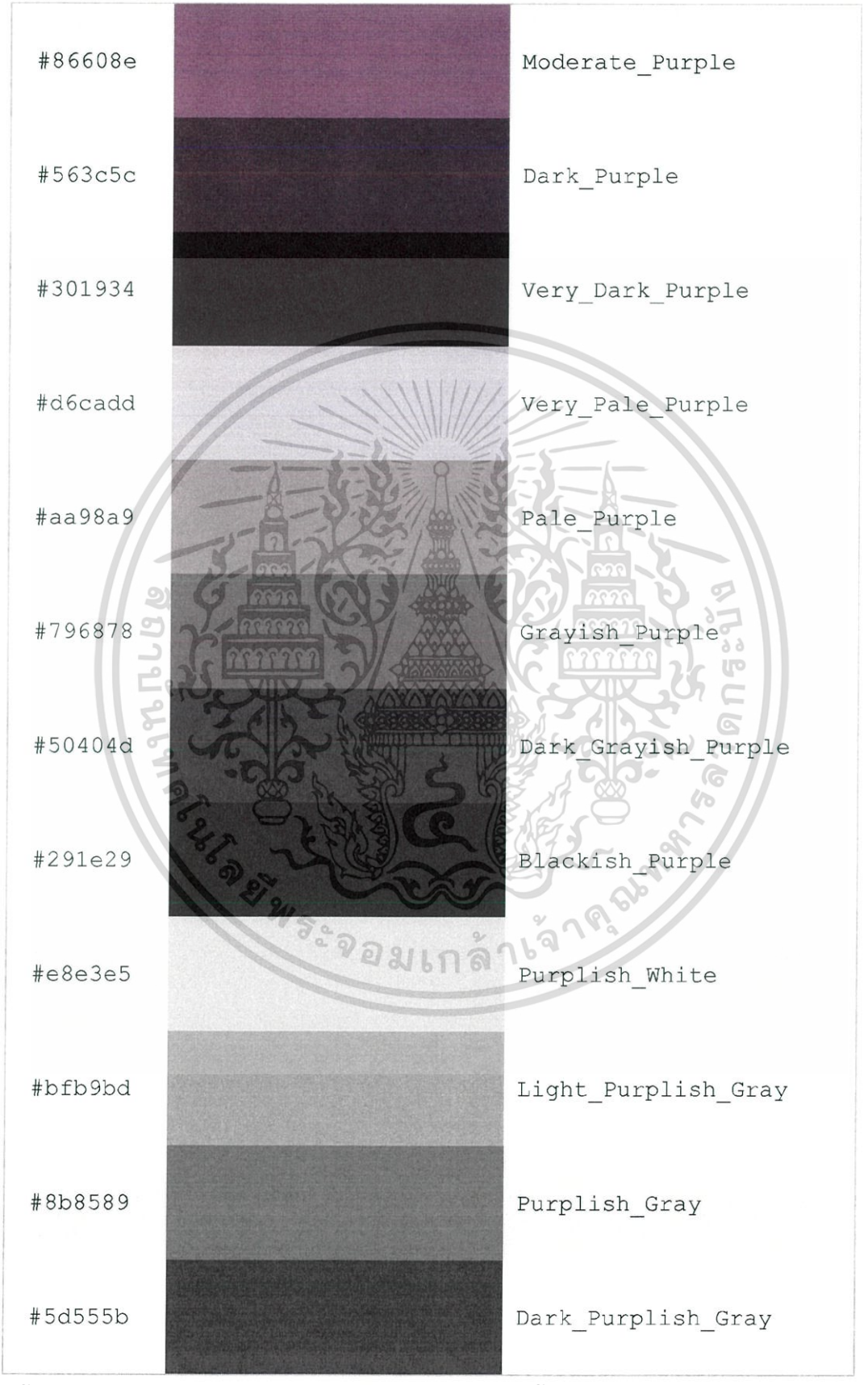
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#604e81		Moderate_Violet
#2f2140		Dark_Violet
#c4c3dd		Very_Pale_Violet
#9690ab		Pale_Violet
#554c69		Grayish_Violet
#9a4eae		Vivid_Purple
#d399e6		Brilliant_Purple
#875692		Strong_Purple
#602f6b		Deep_Purple
#401a4c		Very_Deep_Purple
#d5badb		Very_Light_Purple
#b695c0		Light_Purple

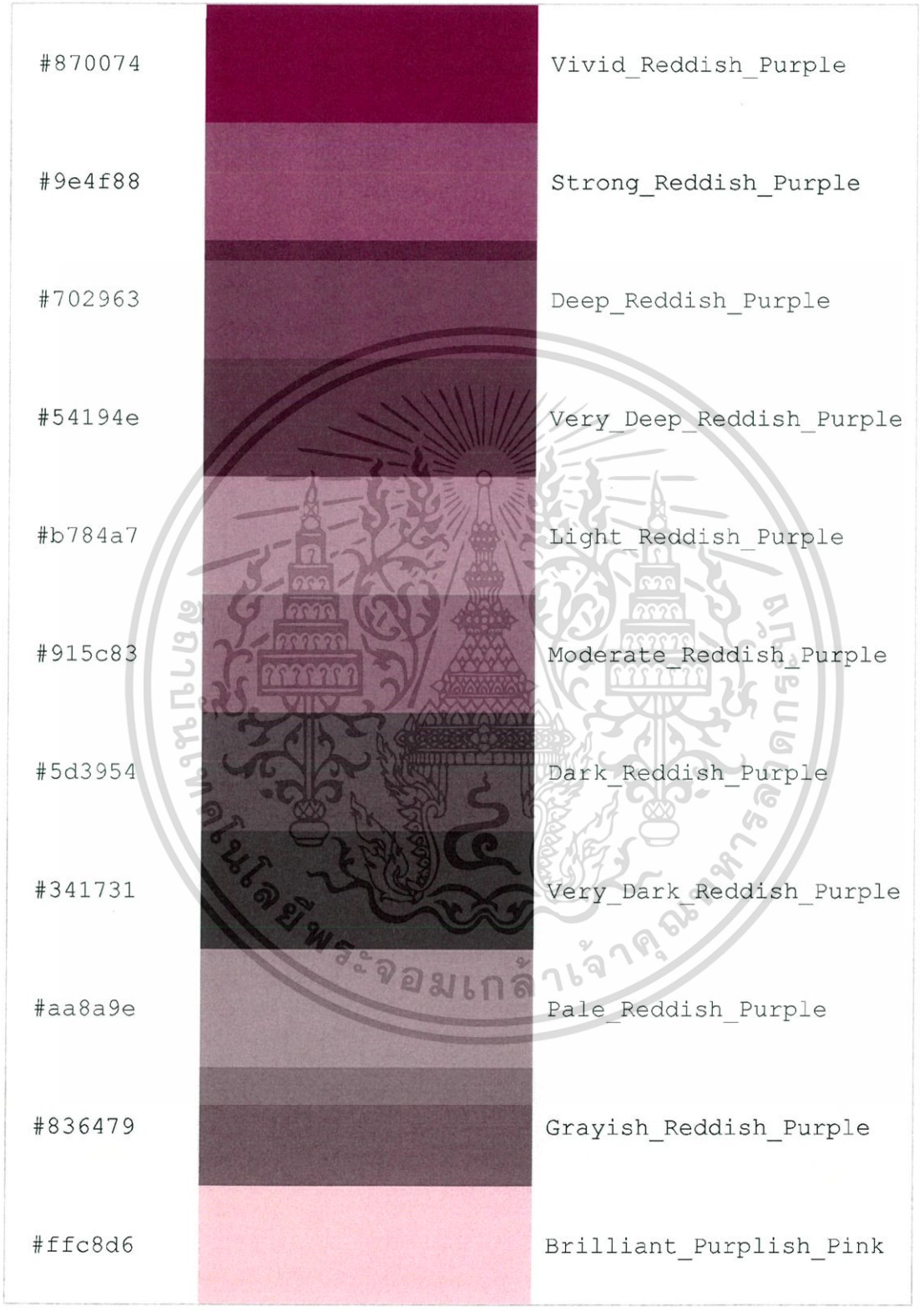
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)



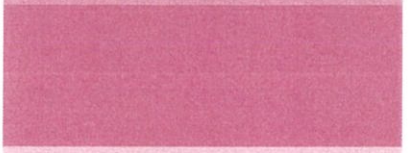
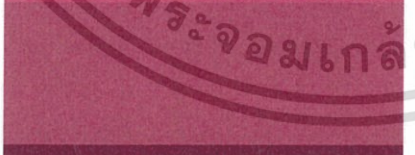
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)



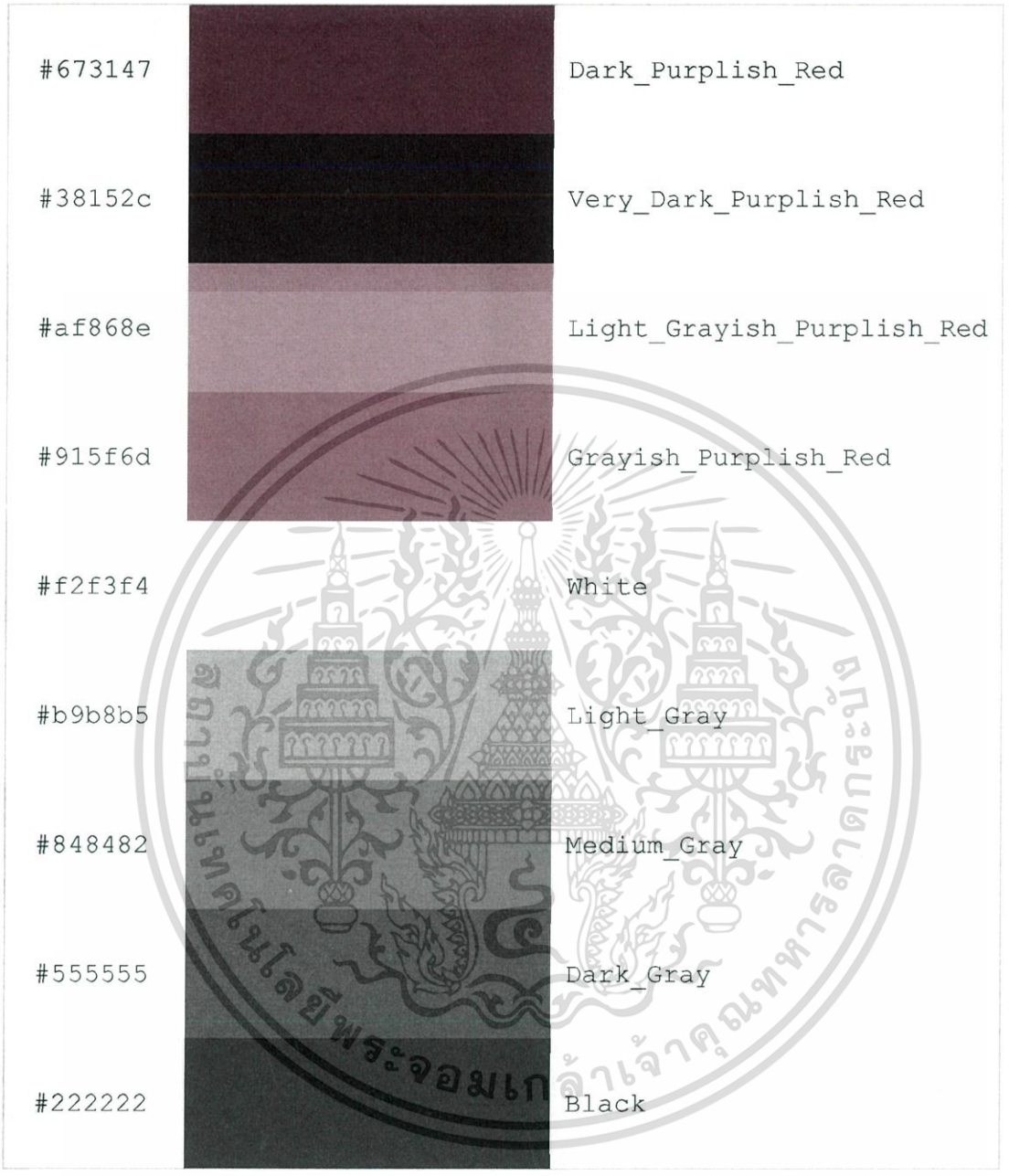
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)

#e68fac		Strong_Purplish_Pink
#de6fa1		Deep_Purplish_Pink
#efbbcc		Light_Purplish_Pink
#d597ae		Moderate_Purplish_Pink
#c17e91		Dark_Purplish_Pink
#e8ccd7		Pale_Purplish_Pink
#c3a6b1		Grayish_Purplish_Pink
#ce4676		Vivid_Purplish_Red
#b3446c		Strong_Purplish_Red
#78184a		Deep_Purplish_Red
#54133b		Very_Deep_Purplish_Red
#a8516e		Moderate_Purplish_Red

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดาษสีมาตรฐาน (the NBS/IBCC color System) (ต่อ)



ที่มา: NBS / ISCC สีระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ลักษณะโคโลนี รูปร่างเซลล์ และคุณสมบัติบางประการ ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

ตารางผนวก ง1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทของยี่หร่า

รหัสเชื้อ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	ลักษณะสปอร์
CMR-34	Moderate olive	Olive gray	แบบเกลียว
CMR-46	Moderate olive	Olive gray	แบบเกลียว
CMR-50	Moderate olive	Olive gray	แบบเกลียว
CMR-13	Strong reddish brown	Pale yellow green	แบบเกลียวคล้ายก้นหอย
CMR-64	Strong reddish brown	Pale yellow green	แบบเกลียวคล้ายก้นหอย
CMR-75	Strong reddish brown	Pale yellow green	แบบเกลียวคล้ายก้นหอย
CMR-20	Strong reddish brown	Light grayish reddish brown	แบบสายสั้นเป็นกระจุก
CMR-30	Strong reddish brown	Light grayish reddish brown	แบบสายสั้นเป็นกระจุก
CMR-17	Moderate yellow	Yellowish white	แบบคล้ายลวดหนาม
CMR-65	Moderate yellow	Yellowish white	แบบคล้ายลวดหนาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	ลักษณะสปอร์
CMR-90	Moderate yellow	Yellowish white	แบบคล้ายลวดหนาม
CML-3	Moderate yellow	Yellowish white	แบบคล้ายลวดหนาม
CML-4	Moderate yellow	Yellowish white	แบบคล้ายลวดหนาม
CMR-42	Light greenish yellow	Dark olive brown	แบบคล้ายนิ้วมือ
CMR-54	Light greenish yellow	Dark olive brown	แบคล้ายนิ้วมือ
CMR-56	Light greenish yellow	Dark olive brown	แบบคล้ายนิ้วมือ
CMR-38	Strong yellowish brown	Grayish yellow	แบบสายสั้นๆ
CMR-39	Strong yellowish brown	Grayish yellow	แบบสายสั้นๆ
CMR-45	Strong yellowish brown	Grayish yellow	แบบสายสั้นๆ
CMR-46	Strong yellowish brown	Grayish yellow	แบบสายสั้นๆ
CMR-50	Strong yellowish brown	Grayish yellow	แบบสายสั้นๆ
CML-2	Strong yellowish brown	Grayish yellow	แบบสายสั้นๆ
CMR-62	Brilliant orange	Yellowish white	แบบคล้ายลวดหนาม
CMR-69	Brilliant orange	Yellowish white	แบบคล้ายลวดหนาม
CMR-70	Brilliant orange	Yellowish white	แบบคล้ายลวดหนาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทของยี่หร่า (ต่อ)

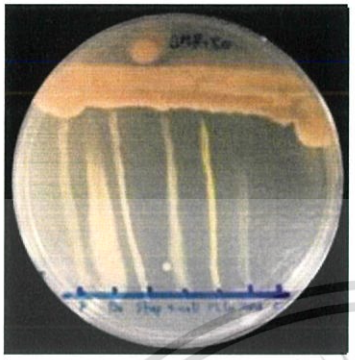
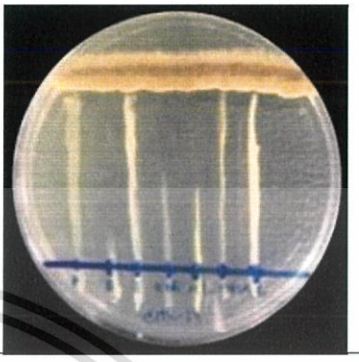
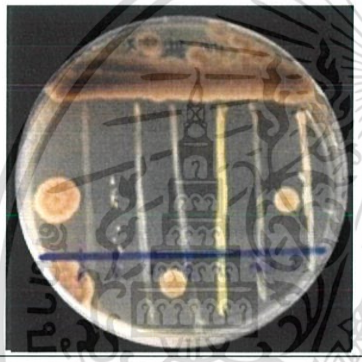
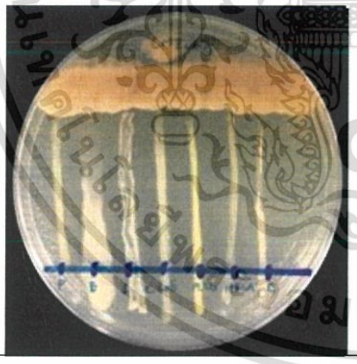
รหัสเชื้อ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	ลักษณะสปอร์
CMR-74	Brownish orange	Yellowish gray	แบบสั้นเป็นกระจุก
CMR-86	Brownish orange	Yellowish gray	แบบสั้นเป็นกระจุก
CMR-64	Brownish orange	Grayish brown	แบบคล้ายนิ้วมือ
CMR-75	Brownish orange	Grayish brown	แบบคล้ายนิ้วมือ
CMR-55	Brownish orange	Yellowish gray	แบบสั้นเป็นกระจุก

ตารางผนวก ง2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทของฟ้าทะลายโจร

รหัสเชื้อ	สีเส้นใยอาหาร	สีเส้นใยอากาศ	ลักษณะสปอร์
APR-1	Deep orange	Light brown	แบบคล้ายนิ้วมือ
APR-21	Deep orange	Light brown	แบบคล้ายนิ้วมือ
APS-2	Deep orange	Light brown	แบบคล้ายนิ้วมือ
APS-3	Deep orange	Light brown	แบบคล้ายนิ้วมือ

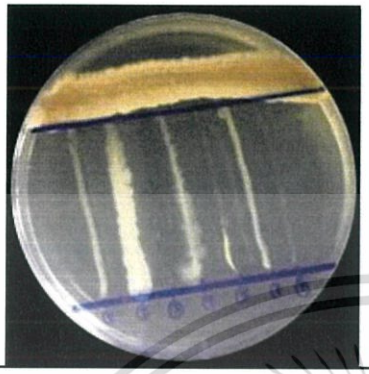
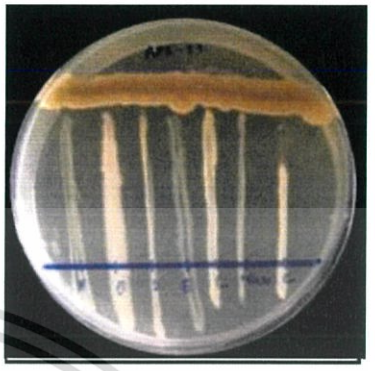
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMR-50		CMR-13	
CMR-20		CMR-17	
CMR-42		CMR-45	

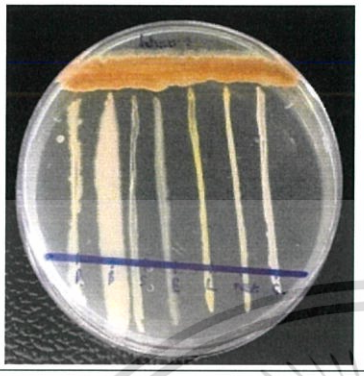
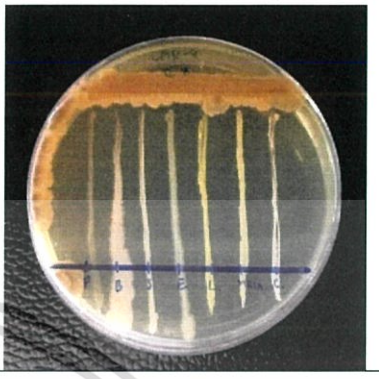
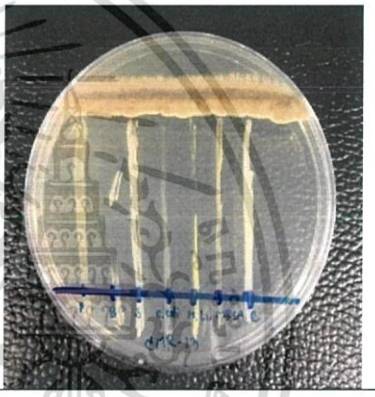
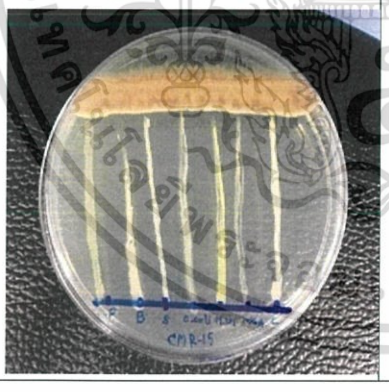
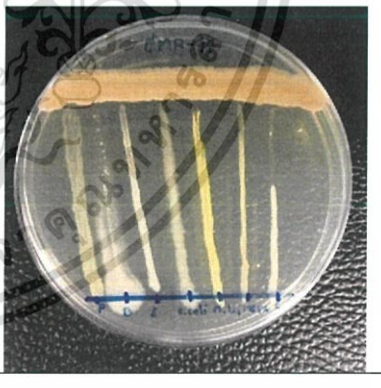
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
APR-1		APR-11	
CMR-1		CMR-2	
CMR-4		CMR-5	

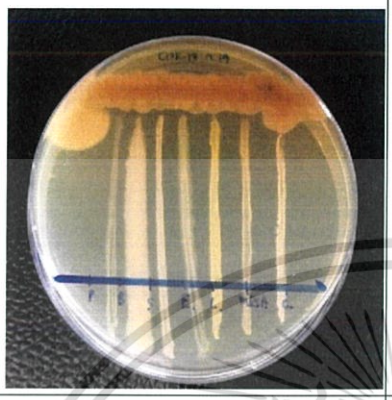
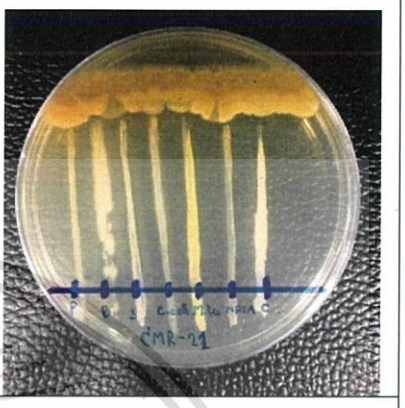
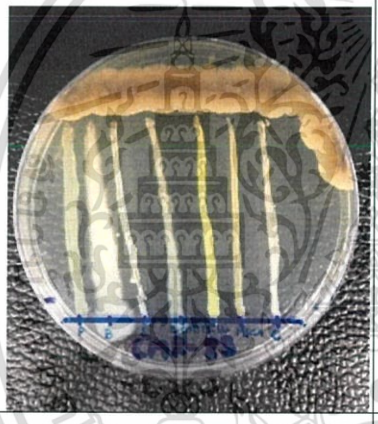
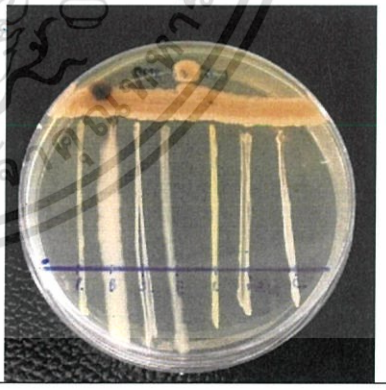
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMR-6		CMR-8	
CMR-11		CMR-13	
CMR-16		CMR-17	

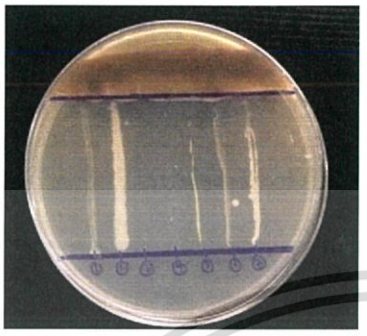
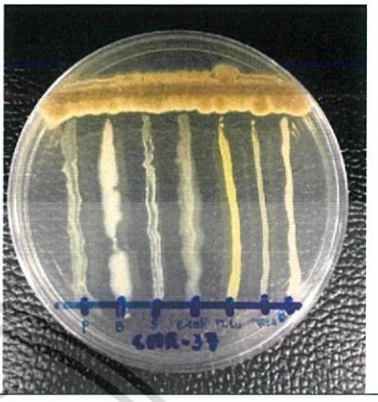
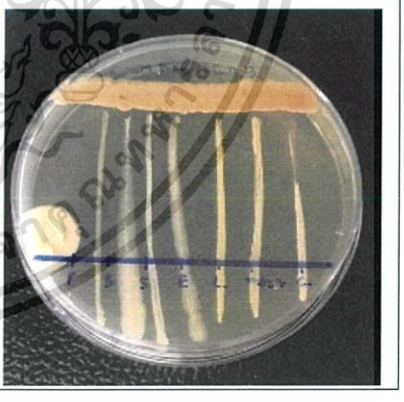
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMR-19		CMR-22	
CMR-25		CMR-30	
CMR-31		CMR-33	

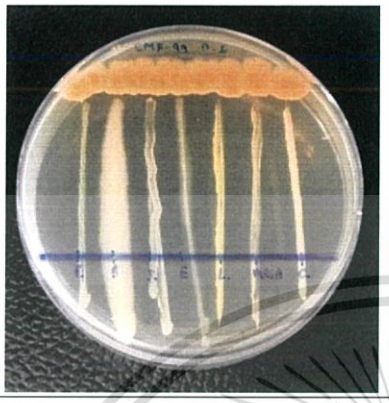
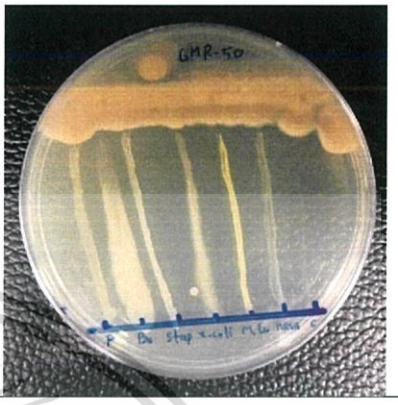
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMR-34		CMR-38	
CMR-42		CMR-44	
CMR-45		CMR-46	

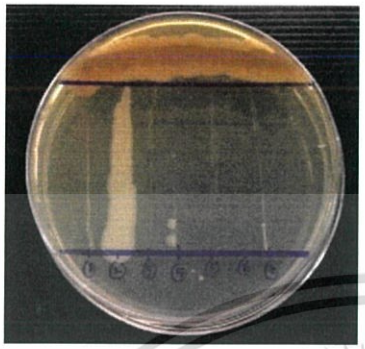
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMR-49		CMR-50	
CMR-51		CMR-53	
CMR-54		CMR-55	

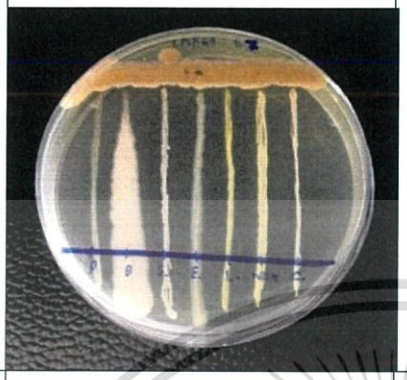
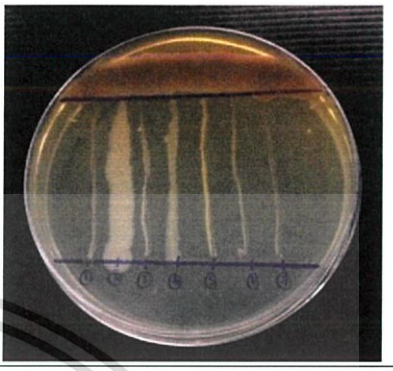
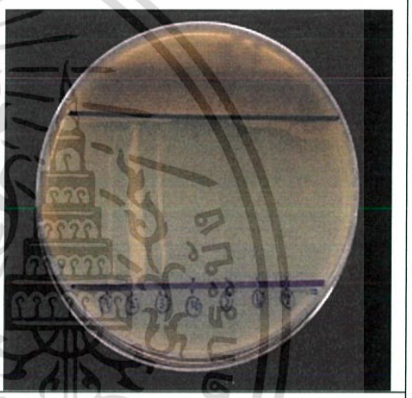
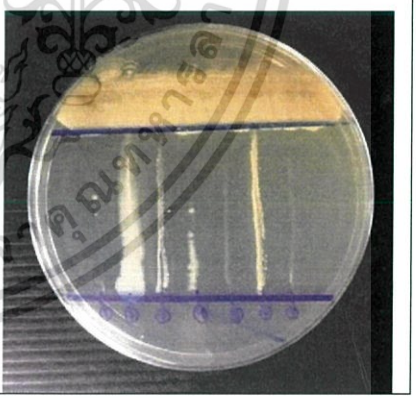
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMR-56		CMR-62	
CMR-63		CMR-64	
CMR-65		CMR-66	

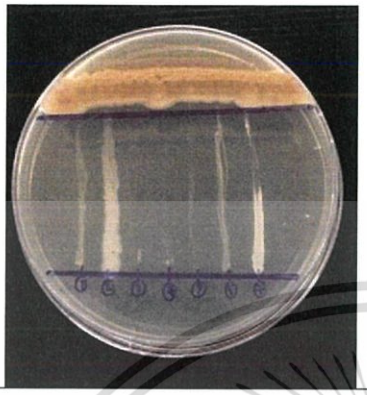
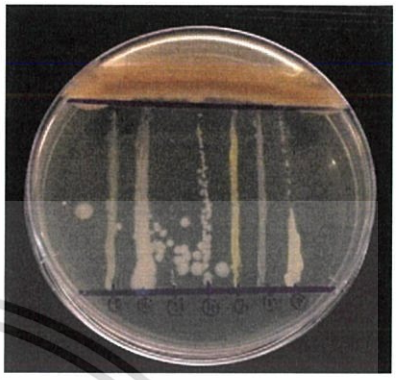
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMR-69		CMR-70	
CMR-71		CMR-72	
CMR-74		CMR-75	

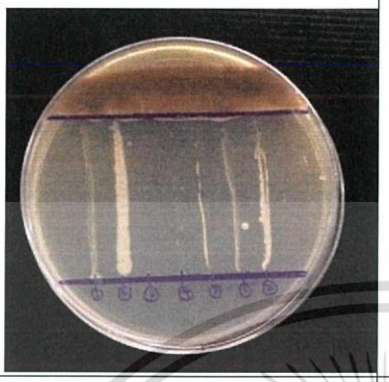
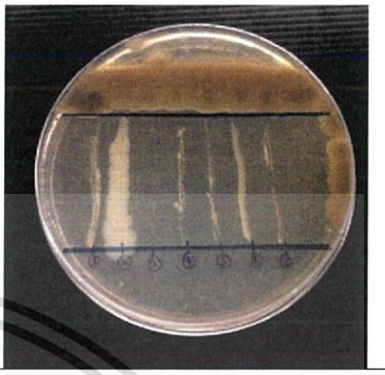
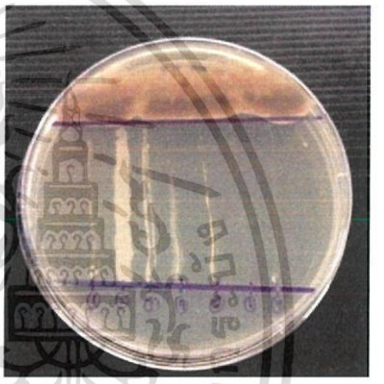
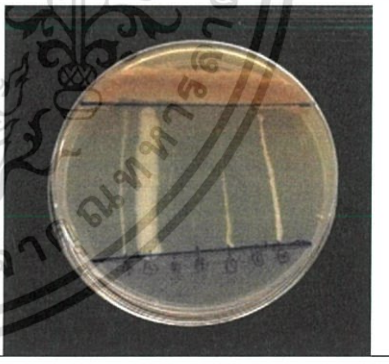
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMR-77		CMR-86	
CMR-90		CMR-96	
CMS-1		CMS-2	

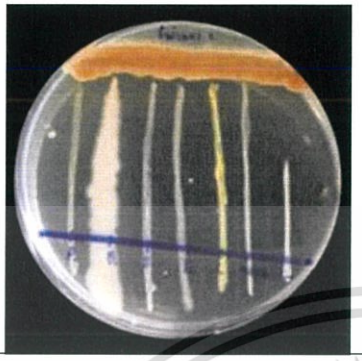
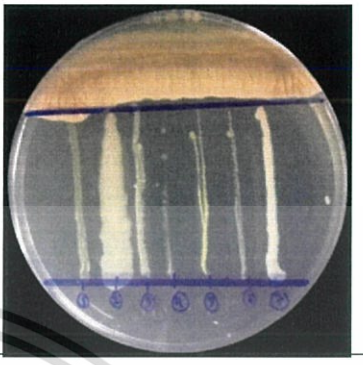
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMS-3		CMS-4	
CML-1		CML-2	
CML-3		CML-4	

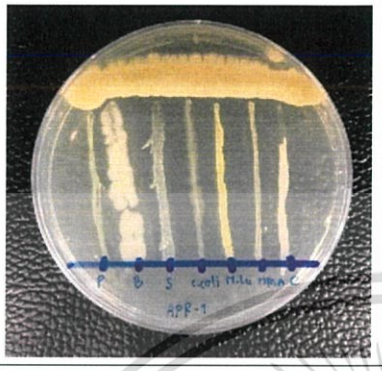
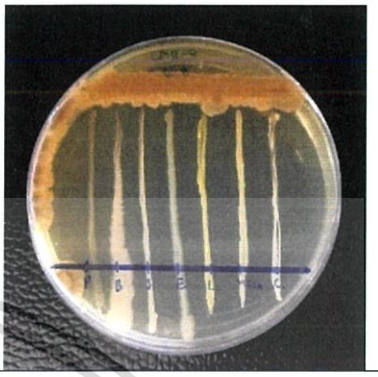
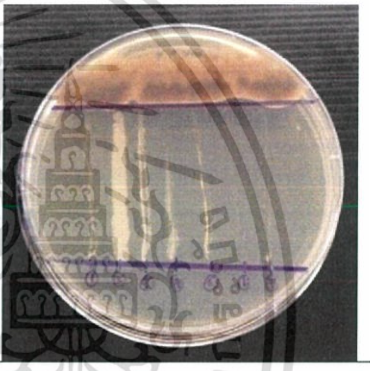
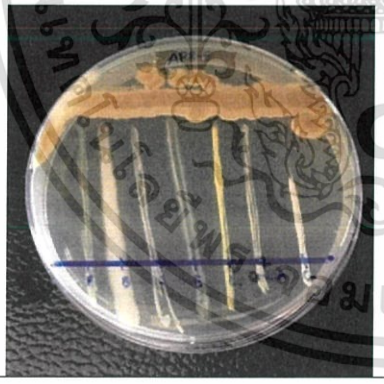
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง3 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของยี่หร่า (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
CMR-62		CMR-55	

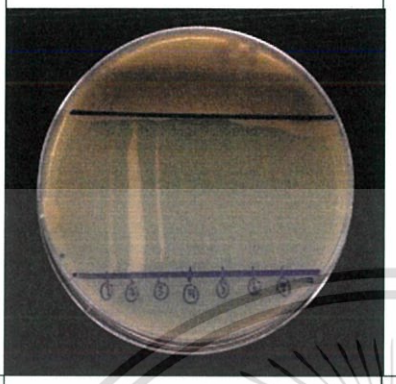
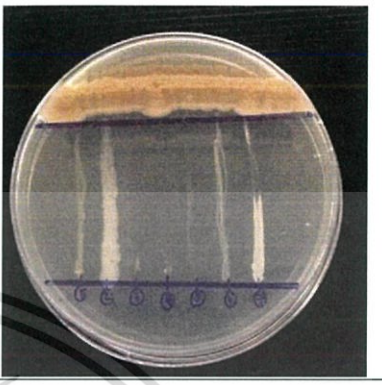
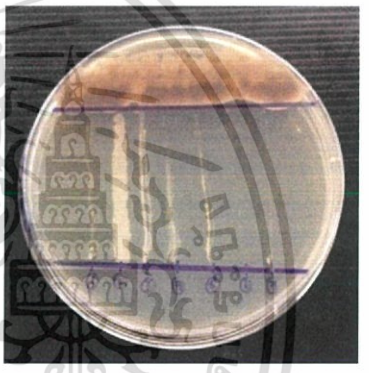
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง4 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของฟ้าทะลายโจร

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
APR-1		APR-2	
APR-3		APR-4	
APR-5		APR-6	

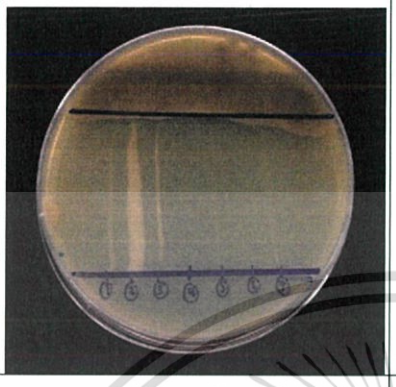
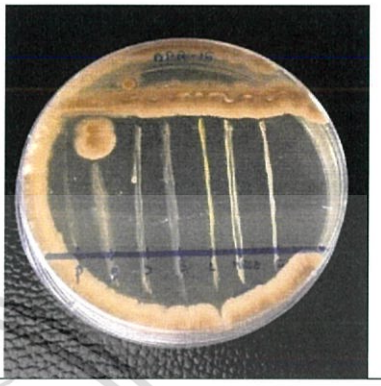
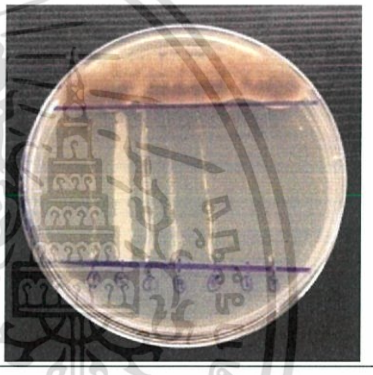
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง4 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของฟ้าทะลายโจร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
APR-7		APR-8	
APR-9		APR-10	
APR-11		APR-13	

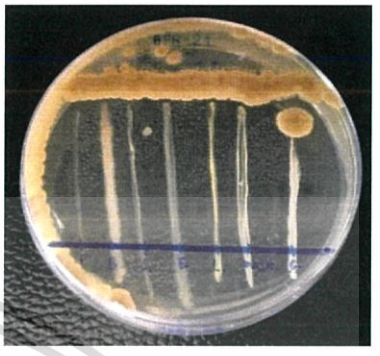
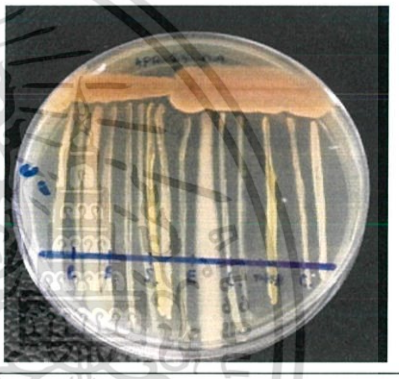
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง4 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของฟ้าทะลายโจร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
APR-14		APR-15	
APR-16		APR-17	
APR-18		APR-19	

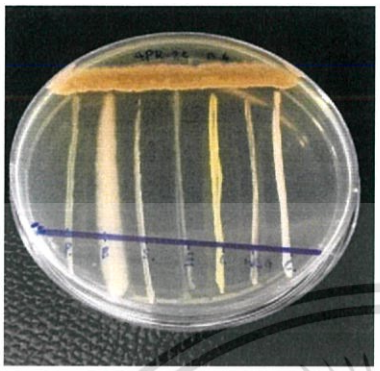
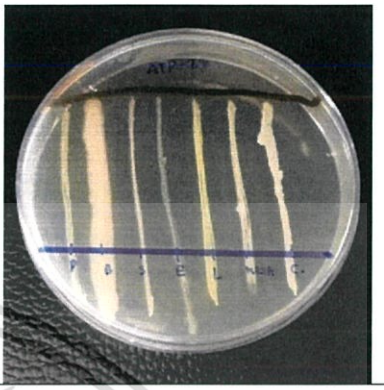
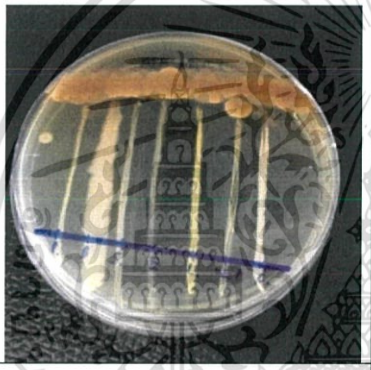
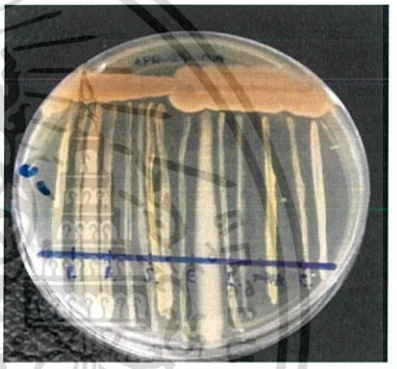
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง4 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของฟ้าทะลายโจร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
APR-20		APR-21	
APR-22		APR-23	
APR-24		APR-25	

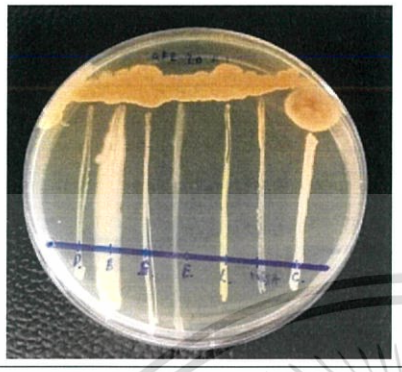
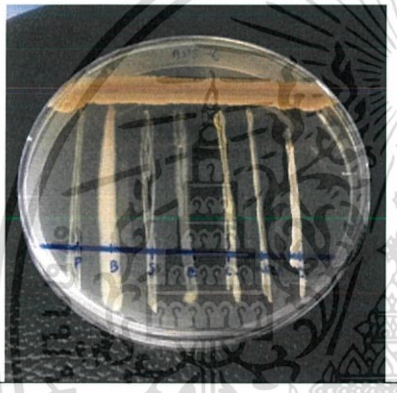
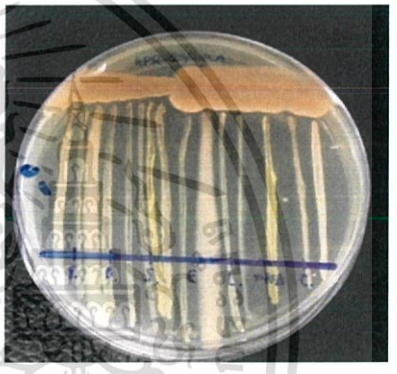
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง4 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของฟ้าทะลายโจร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
APR-26		APR-27	
APR-37		APS-1	
APS-2		APS-3	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ง4 แสดงผลการยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 ตัวของฟ้าทะลายโจร (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง	รหัสเชื้อ	ผลการทดลอง
APS-4		APS-5	
APS-6		APS-7	
APS-8		APS-9	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตารางที่ จ1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-42

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-42	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

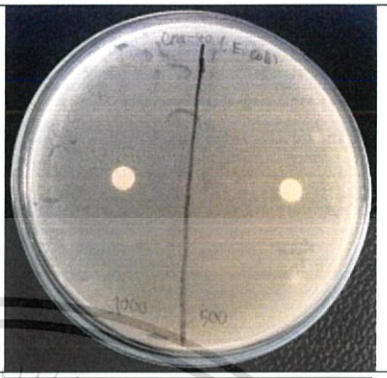
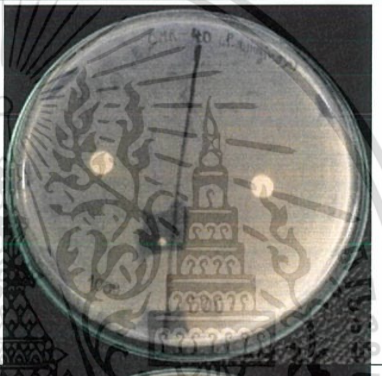
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-42 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-42	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

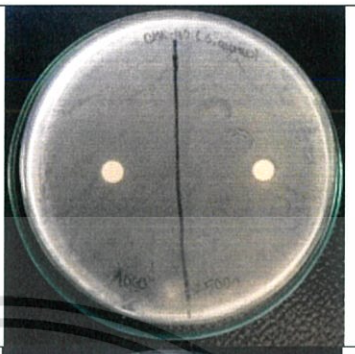
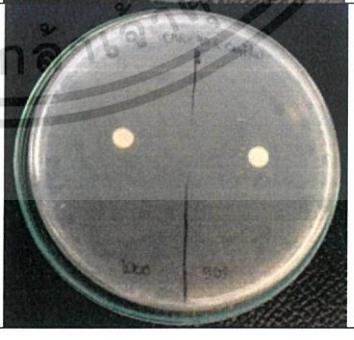
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-40

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-40	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

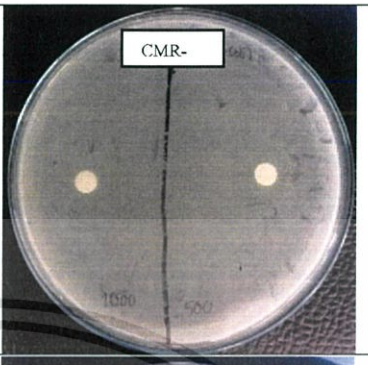
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-40 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-40	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

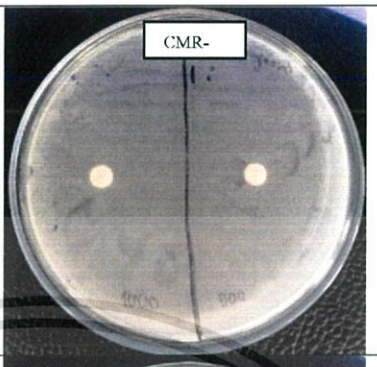
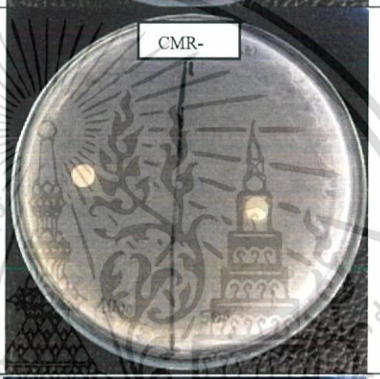
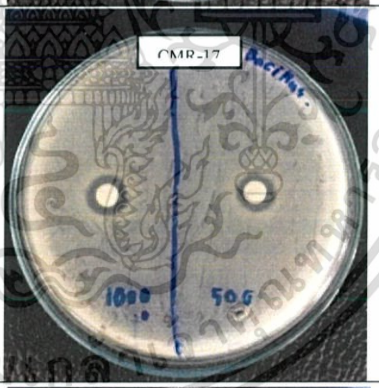
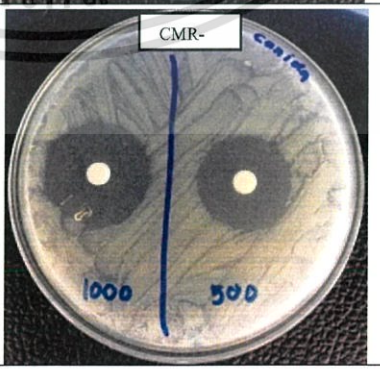
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-17

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-17	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

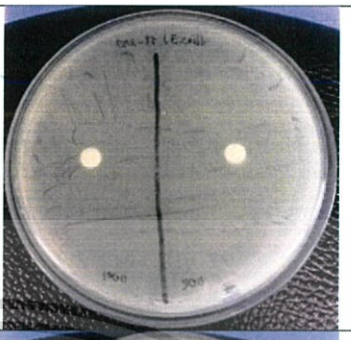
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-17 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-17	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

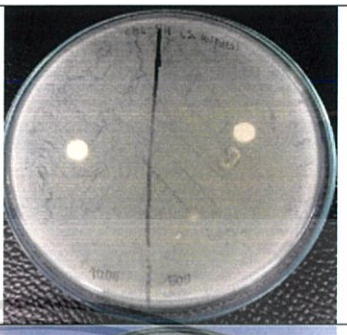
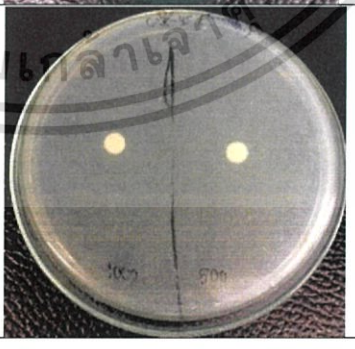
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-45

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-45	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

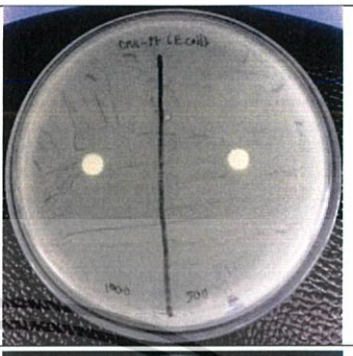
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-45 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-45	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

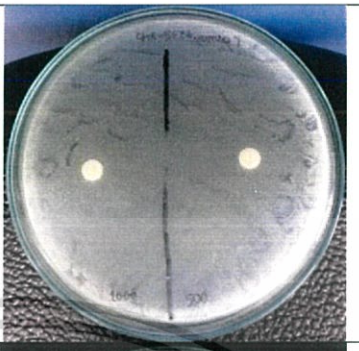
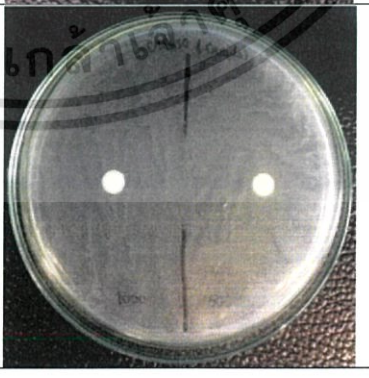
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-50

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-50	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

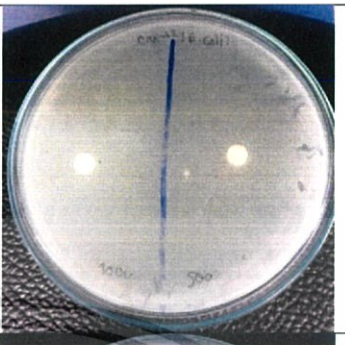
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-50 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-50	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

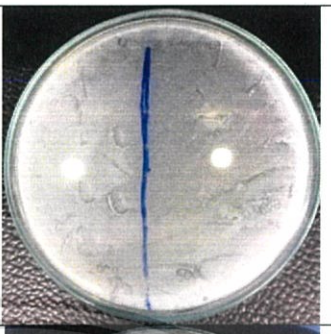
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-62

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-62	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

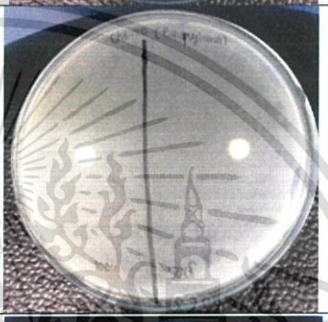
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-62 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-62	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

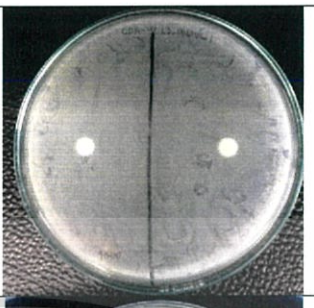
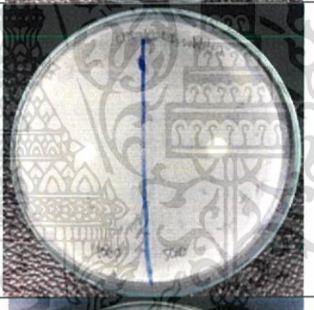
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-20

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-20	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-20 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-20	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-30

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-30	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

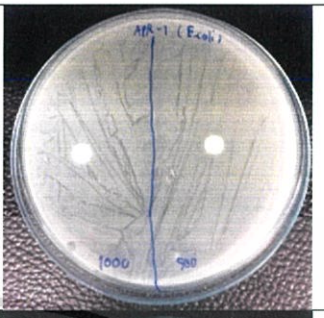
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบยี่หร่า CMR-30 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-30	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

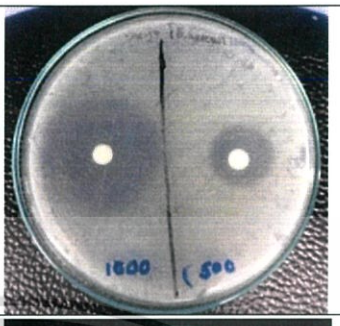
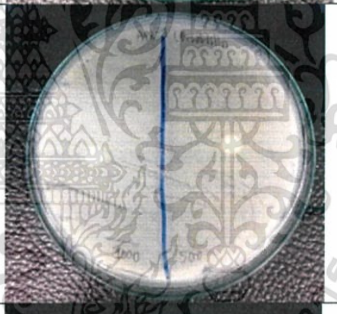
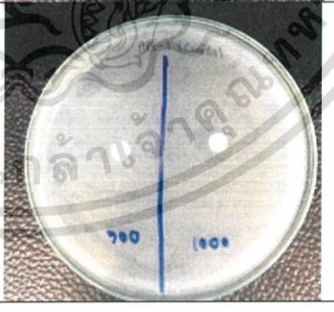
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบฟ้าทลายโจร APR-1

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
APR-1	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

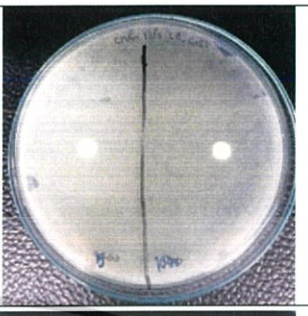
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบฟ้าทลายโจร APR-1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
CMR-30	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

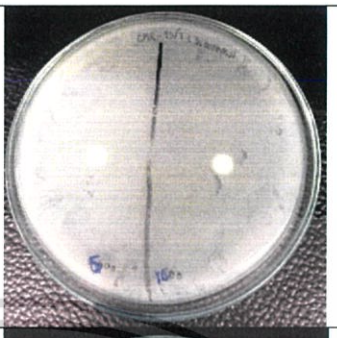
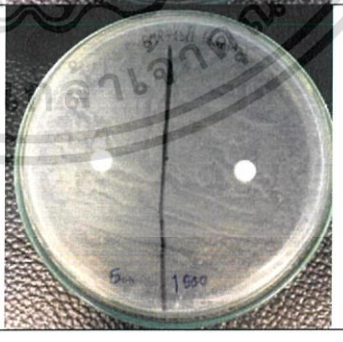
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบฟ้าทลายโจร APR-11

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
APR-11	*E. coli*	
	P. aeruginosa	
	M. luteus	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบฟ้าทลายโจร APR-11 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น 1000 µg/ml และ 500 µg/ml
APR-11	*S. aureus*	
	MRSA	
	B. subtilis	
	C. albicans	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้