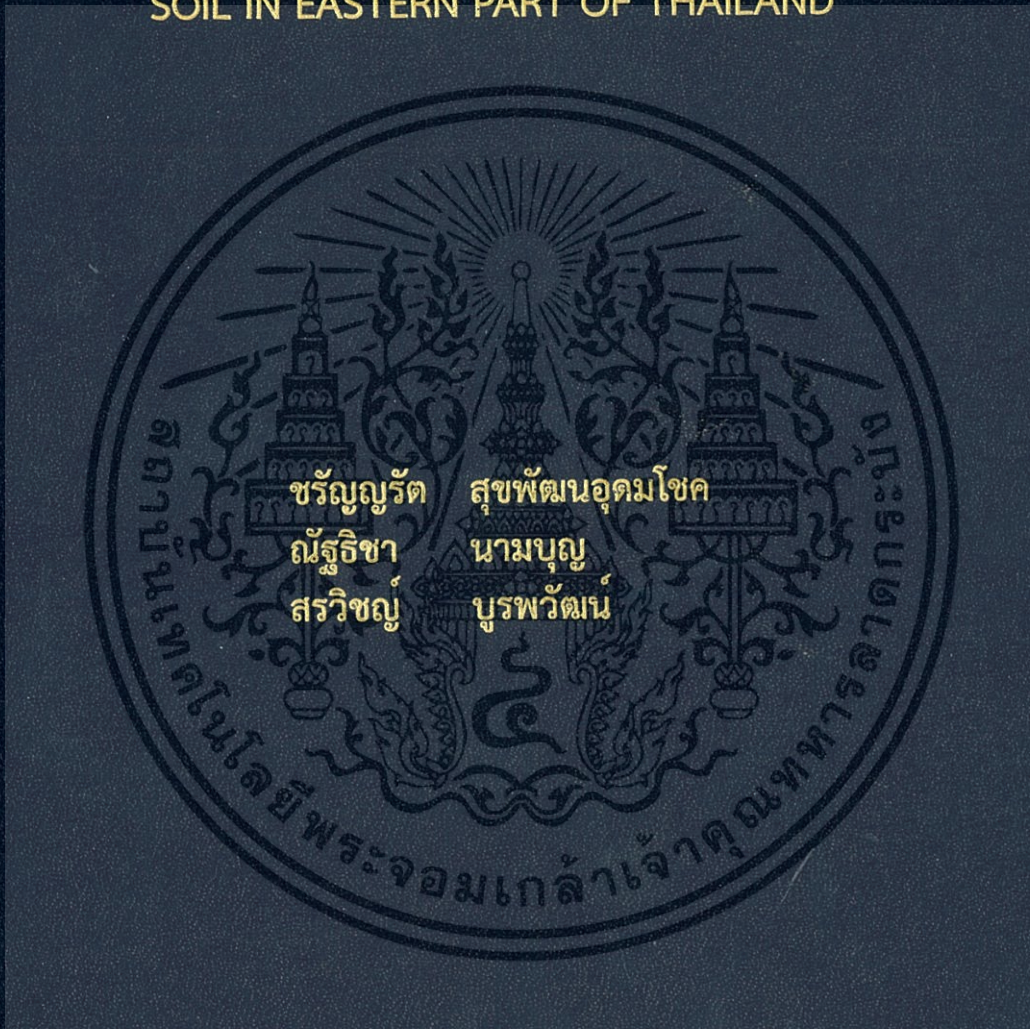


การศึกษาฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท
จากดินป่าชายเลนภาคตะวันออกของประเทศไทย

THE STUDY OF PHOSPHOLIPID AND ANTIMICROBIAL
ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM MANGROVE FOREST
SOIL IN EASTERN PART OF THAILAND



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การศึกษาฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท
จากดินป่าชายเลนภาคตะวันออกของประเทศไทย

THE STUDY OF PHOSPHOLIPID AND ANTIMICROBIAL
ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM MANGROVE FOREST
SOIL IN EASTERN PART OF THAILAND



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE STUDY OF PHOSPHOLIPID AND ANTIMICROBIAL
ACTIVITY OF ACTINOMYCETES FROM MANGROVE FOREST
SOIL IN EASTERN PART OF THAILAND



A SPECIAL PROBLEM SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR
OF SCIENCE IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การศึกษาฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อ
แอกติโนมัยซีทจากดินป่าชายภาคตะวันออกของประเทศไทย

The Study Of Phospholipid And Antimicrobial Activity Of
Actinomycetes From Mangrove Forest Soil In Eastern Part
Of Thailand.

ชื่อนักศึกษา

นางสาวชญญรัตน์ สุขพัฒน์อุดมโชค รหัสนักศึกษา 56050975
นางสาวณัฐธิชา นามบุญ รหัสนักศึกษา 56050989
นายสรวิชญ์ บุรพวัฒน์ รหัสนักศึกษา 56051084

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา
จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ่ ประธานกรรมการ	
ดร.ณัฐฉิ รุ่งจินดามัย กรรมการ	
ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาฟอสโฟลิปิดและฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินป่าชายภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชรัญญรัตน์ สุขพัฒน์อุดมโชค รหัสนักศึกษา 56050975 นางสาวณัฐริชา นามบุญ รหัสนักศึกษา 56050989 นายสรวิชัย บุรพวัฒน์ รหัสนักศึกษา 56051084
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

บทคัดย่อ

แอกติโนมัยซีท 55 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากป่าชายเลนทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร, จังหวัดชลบุรี และจังหวัดฉะเชิงเทรา แอกติโนมัยซีททุกสายพันธุ์จะถูกนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ ซึ่งสามารถจัดแบ่งได้เป็น 12 กลุ่มตามสีของเส้นใยอากาศตามระบบสี NBs/IBCC color system จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 1248, *Escherichia coli* TISTR 074, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Candida albicans* TISTR 5239 พบว่ามีแอกติโนมัยซีท 13 สายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ จากนั้นทำการคัดเลือกแอกติโนมัยซีท 6 สายพันธุ์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น มาทำการศึกษากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์จากน้ำหมักและตัวเซลล์ที่สกัดโดยใช้เอทิลอะซิเตตและเมทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้วิธี Disc diffusion method พบว่าโซนยับยั้งการเจริญที่เกิดขึ้นจากสารสกัดจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ *S.aureus* 23.35 mm, *B.subtilis* 23.35 mm, *C.albicans* 12.6 mm, *M.luteus* 18.15 mm, *P.aeruginosa* 10.4 mm และ *E.coli* 7.85 mm จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแอกติโนมัยซีท 6 สายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกสามารถเป็นแหล่งที่ผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี การศึกษาฟอสโฟลิปิดจะวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ในการศึกษาวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิด ได้แก่ phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ที่มักพบในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทระหว่าง mid log phase ของการเจริญบนอาหารแข็ง Starch casein agar (SCA) และไม่พบ phosphatidylglycerol (PG) เนื่องจากว่าฟอสโฟลิปิดชนิดนี้ถูกเปลี่ยนไปเป็นฟอสโฟลิปิดชนิด cardiolipin (CL) ตามทฤษฎีการสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : แอคติโนมัยซีท, กิจกรรมการต้านจุลชีพ, ฟอสโฟลิปิด, Thin layer chromatography,
Disc - diffusion method



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The Study Of Phospholipid And Antimicrobial Activity Of Actinomycetes From Mangrove Forest Soil In Eastern Part Of Thailand.		
Students	Miss Charanyarut Sukphattanaudomchoke Student ID 56050975		
	Miss Natticha	Namboon	Student ID 56050989
	Mr. Sorawit	Buraphawat	Student ID 56051084
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology Program)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2016		
Advisor	Dr. Khanungkan Klanbut		

Abstract

A total of 55 actinomycete strains were isolated from mangrove forest soils in Eastern part of Thailand, Samut Sakhon, Chonburi and Chachoengsao Province. All isolates were studied Morphological and Biochemical characterization and classified into 12 groups by using colours of aerial mycelium using NBs/IBCC color system. Their ability to produce antimicrobial activity were studied against *Bacillus subtilis* TISTR 1248, *Escherichia coli* TISTR 074, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 and *Candida albicans* TISTR 5239. 13 actinomycetes strains could be inhibited tested microorganisms, 6 isolates from them gave the highest antimicrobial activity during primary screening. Antimicrobial study of this six selected isolates were carried out by disc diffusion method from crude extractions and cellular extractions by using ethylacetate and methanol as solvents respectively. Zone of inhibition could be observed in ethylacetate extract with 50 mg/ml concentration were inhibited *S.aureus* 23.35 mm, *B.subtilis* 23.35 mm, *C.albicans* 12.6 mm, *M.luteus* 18.15 mm, *P.aeruginosa* 10.4 mm and *E.coli* 7.85 mm. In conclusion we found that this study demonstrate that six selected isolates are good sources of antimicrobial substance. Finally phospholipids study were analysed by Thin layer chromatography (TLC); phosphatidylethanolamine (PE) and cardiolipin (CL) spots were expressed as present in actinomycetes cell wall

duing mid log phase of growth but phosphatidylglycerol (PG) was absent due to it could be the intermediate substance of cardiolipin (CL) in phospholipid biosynthesis expression in gene.

Keywords : Actinomycete, Antimicrobial, Phospholipid, Thin layer chromatography, Disc - diffusion method



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากหลายๆฝ่ายที่ได้ให้ความกรุณาทั้งด้านความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนการอำนวยความสะดวกในการให้ยืมอุปกรณ์ต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยเป็นอย่างยิ่ง ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้ทำวิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ได้ชี้แนะแนวทางให้คำแนะนำตลอดการทำงานวิจัย เอาใจใส่นักศึกษาตลอดการดำเนินงาน รวมถึงการตรวจทานแก้ไขรูปเล่ม ทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จิตติ ท้าวไผ่ ประธานกรรมการ และ ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย กรรมการที่ให้ข้อเสนอแนะ ตลอดจนชี้แนะข้อผิดพลาดในการทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.มาลินี ชัยศุกกิจสินธุ์ ภาควิชาเคมี ที่ได้ให้ความรู้ในเรื่องการสกัดสาร และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ในทุกแขนง

ขอขอบพระคุณพี่น้องวิทยุวิทยุเก่า ตึกจุฬารามณ์วิทยาลัย และอาคารพระจอมเกล้า ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเปิดสารและอุปกรณ์ต่างๆตลอดการทำงานวิจัย และคำชี้แนะในการเลี้ยงเชื้อ

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา เจ๊ก อาต๋วง อาแต่ และครอบครัวที่ได้อบรมสั่งสอนรวมถึงสนับสนุนทั้งกำลังกาย กำลังทรัพย์ การเดินทาง และเป็นกำลังใจแก่ผู้ทำงานวิจัย และขอบคุณเพื่อนๆ ที่ให้ยืมอุปกรณ์ในการทำโครงการพิเศษ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณศูนย์อนุรักษ์ป่าชายเลนบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร, ป่าชายเลนตำบลคลองสอง จังหวัดฉะเชิงเทรา และศูนย์วิจัยป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี ที่อำนวยความสะดวกในการเข้าไปเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาทำงานวิจัย

ผู้ทำการวิจัยขอมอบความดีทั้งปวงให้แก่ทุกท่าน

ชญญรัตน์ สุขพัฒน์อุดมโชค

ณัฐธิชา นามบุญ

สรวิชญ์ บุรพวัฒน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 แอคติโนมัยซีท	4
2.2 วงจรชีวิตของแอคติโนมัยซีท	6
2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท	7
2.3.1 เส้นใยอาหาร	7
2.3.2 เส้นใยอากาศ	7
2.3.3 เส้นสายสปอร์	8
2.3.4 สปอร์	9
2.4 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท	10
2.5 ความสามารถในการสร้างสารสารทุติยภูมิของเชื้อแอคติโนมัยซีท	14
2.6 การออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะและกลไกการดื้อยาของจุลชีพ	17
2.7 ประโยชน์ของแอคติโนมัยซีท	20
2.8 แหล่งที่อยู่อาศัยของแอคติโนมัยซีท	23
2.8.1 Terrestrial Environment	23
2.8.2 Aqatic Enviroment	24
2.9 ป่าชายเลน	25
2.9.1 ป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร	26
2.9.2 ป่าชายเลนตำบลบางเสม็ด จังหวัดชลบุรี	28
2.9.3 ป่าชายเลนตำบลคลองสอง จังหวัดฉะเชิงเทรา	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.10 ฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัซซีทและแบคทีเรียทั่วไป	32
2.11 ชนิดของฟอสโฟลิปิด	35
2.11.1 Phosphatidic acid	36
2.11.2 Phosphatidylcholine	36
2.11.3 Phosphatidylethanolamine	37
2.11.4 Phosphatidylserine	37
2.11.5 Phosphatidylinositol	38
2.11.6 Cardiolipin	38
2.12 โครมาโตกราฟี	39
2.12.1 Thin Layer Chromatography (TLC)	40
2.13 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเทคนิค Agar disc diffusion	45
2.13.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ Agar disc diffusion	46
2.13.1.1 <i>Bacillus subtilis</i>	46
2.13.1.2 <i>Escherichia coli</i>	47
2.13.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
2.13.1.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	49
2.13.1.5 <i>Micrococcus luteus</i>	50
2.13.1.6 <i>Candida albicans</i>	51
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	52
3.1 เครื่องมือ	52
3.2 อุปกรณ์	53
3.3 สารเคมี	54
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป	56
3.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	56
3.6 ฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน	56
3.7 ตัวอย่างดิน	57
3.8 การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัซซีท	57
3.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ	59
3.10 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.11 การทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเทคนิค Agar disc diffusion	60
3.12 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอสคิโนมัยซีท ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography	62
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	64
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีท	64
4.2 ผลการหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง	66
4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ เชื้อแอสคิโนมัยซีท	68
4.4 ผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อทดสอบ	129
4.5 ผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอสคิโนมัยซีทโดยใช้ เทคนิค Thin layer chromatography	141
4.6 รวมผลการทดลองของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 6 ไอโซเลต ที่ได้รับการคัดเลือก	149
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	168
5.1 สรุปผลการวิจัย	168
5.2 ข้อเสนอแนะ	171
เอกสารอ้างอิง	172
ภาคผนวก	183
ภาคผนวก ก	184
ภาคผนวก ข	190
ภาคผนวก ค	198
ภาคผนวก ง	201
ภาคผนวก จ	208
ภาคผนวก ฉ	230
ประวัติผู้วิจัย	

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงองค์ประกอบโครโมโซมของแอกติโนมัยซีท	4
2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนแบคทีเรีย	14
2.3 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ	15
2.4 แสดงชนิดของ Phospholipid ที่พบในแอกติโนมัยซีท	33
4.1 แสดงหมายเลขไอโซเลตของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ทำการคัดแยกได้	64
4.2 ผลการหาสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน	66
4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท	69
4.4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท	79
4.5 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของแอกติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ	130
4.6 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักในชั้นของเอทืออะซีเตต โดยเทคนิค agar disc diffusion	135
4.7 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวเซลล์ในชั้นของเอทืออะซีเตต โดยเทคนิค agar disc diffusion	137
4.8 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีทที่ถูกคัดเลือก 6 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography	143
4.9 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีทที่ถูกคัดเลือก 6 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography	148
จ แสดงกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system)	208

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การจัดเรียง Phylogenetic tree ของแอกติโนไมซีทบางสกุล	5
2.2 วงจรชีวิตของแอกติโนไมซีท	6
2.3 ลักษณะของการสร้างเส้นใยของแอกติโนไมซีทบนผิวหน้าอาหาร	7
2.4 ลักษณะของการจัดเรียงตัวของเส้นสายสปอร์	8
2.5 ลักษณะของการจัดเรียงตัวของสปอร์เส้นสายยาวของ <i>Streptomyces</i>	9
2.6 ลักษณะของสปอร์ที่แตกต่างกัน	10
2.7 การจัดจำแนกหมวดหมู่ของแอกติโนไมซีทตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	11
2.8 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพโดยอาศัยการจัดจำแนก ด้วยตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ	17
2.9 การผลิตเอนไซม์ของแอกติโนไมซีท	21
2.10 โครงสร้างออกซิน หรือ Indole acetic acid (IAA)	23
2.11 ห่วงโซ่อาหารที่ซับซ้อน	25
2.12 ป่าชายเลนบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร	26
2.13 ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่ป่าชายเลนบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร	27
2.14 ป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี	28
2.15 ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่ป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี	29
2.16 โลมาอิรวดีที่พบที่ปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา	30
2.17 โครงสร้างทั่วไปของ phospholipid	32
2.18 โครงสร้างของ phosphoglyceride	35
2.19 โครงสร้างของ sphingolipid	35
2.20 โครงสร้างของ phosphatidic	36
2.21 โครงสร้างของ phosphatidylcholine	36
2.22 โครงสร้างของ Phosphatidylethanolamine	37
2.23 โครงสร้างของ Phosphatidylserine	37
2.24 โครงสร้างของ Phosphatidylinositol	38
2.25 โครงสร้างของ cardiolipin	38
2.26 การวัดระยะก่อนที่จะหยดสารและการหยดสารลงบน Chromatoplate	41
2.27 การวาง chromatoplate ใน TLC tank	42
2.28 แสดงตัวอย่างของโครมาโทแกรม เมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน	43
2.29 การหาค่า R_f ของสารที่แยกได้	44

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.30 การทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะโดยวิธี Agar disc diffusion	45
2.31 ลักษณะของเซลล์และเอนโดสปอร์ <i>Bacillus subtilis</i>	46
2.32 ลักษณะของเซลล์ของ <i>Escherichia coli</i>	47
2.33 ลักษณะของเซลล์ของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
2.34 ลักษณะของเซลล์ของ <i>Staphylococcus aureus</i>	49
2.35 ลักษณะของเซลล์ของ <i>Micrococcus luteus</i>	50
2.36 ลักษณะของเซลล์ของ <i>Candida albicans</i>	51
3.1 แสดงวิธีการทำ Agar cross streak	60
4.1 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 1	81
4.2 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN01	82
4.3 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN03	82
4.4 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN08	83
4.5 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN12	84
4.6 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN19	85
4.7 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN20	85
4.8 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN22	86
4.9 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN23	87
4.10 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN24	88
4.11 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN26	88
4.12 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN30	89
4.13 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN32	90
4.14 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN36	91
4.15 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN38	91
4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN44	92
4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN45	93
4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN50	93
4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN52	94
4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN58	95
4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 2	95
4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN02	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN05	97
4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN21	97
4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN54	98
4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 3	99
4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN04	99
4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN34	100
4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 4	101
4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN25	101
4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN28	102
4.32 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 5	103
4.33 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN06	104
4.34 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN10	104
4.35 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN15	105
4.36 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN17	106
4.37 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN29	107
4.38 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN37	107
4.39 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN39	108
4.40 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN40	109
4.41 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 6	110
4.42 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN07	110
4.43 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN59	111
4.44 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 7	112
4.45 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN09	112
4.46 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN13	113
4.47 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN16	114
4.48 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN55	115
4.49 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN56	116
4.50 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN57	116
4.51 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติมัยซีทไอโซเลต GWN60	117
4.52 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 8	118

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.53 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN31	118
4.54 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN33	119
4.55 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 9	120
4.56 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN14	120
4.57 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN18	121
4.58 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN47	122
4.59 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN48	123
4.60 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN49	123
4.61 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN53	124
4.62 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 10	125
4.63 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN41	125
4.64 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 11	126
4.65 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN42	127
4.66 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 12	127
4.67 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติมิยซีทไอโซเลต GWN46	128
4.68 โครงสร้างเปปติโดไกลแคนในแบคทีเรีย	139
4.69 แสดงโครงสร้างของชั้นเปปติโดไกลแคนของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม	140
4.70 แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโตกราฟีเทียบกับสาร standard ผลจากการทำ thin layer chromatography	142
4.71 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องและวิถีในการสังเคราะห์คาร์ดิโอลิปินในแบคทีเรีย	144
4.72 ระยะเวลาพา (Rf) ของสารละลายฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน	145
4.73 แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโตกราฟีเทียบกับสาร standard ผลจากการทำ thin layer chromatography	147
4.74 แสดงลักษณะทางสัญญาณวิทยาของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต GWN03	150
4.75 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	151
4.76 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN03	151
4.77 แสดงลักษณะทางสัญญาณวิทยาของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต GWN04	153
4.78 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	154

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.79 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN04	154
4.80 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN06	156
4.81 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	157
4.82 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN06	157
4.83 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN16	159
4.84 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	160
4.85 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN16	160
4.86 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN48	162
4.87 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	163
4.88 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN48	163
4.89 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN55	165
4.90 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น	166
4.91 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN55	166

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สถานการณ์ทั่วโลกเพราะเชื้อดื้อยาถือว่าเป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่มีอันตรายรุนแรง ถึงขั้นทำให้เสียชีวิต ประเทศไทยใช้ยาปฏิชีวนะมีมูลค่ามากกว่าปีละ 10,000 ล้านบาท ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ.2543-2554) และพบเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้น ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาในประเทศไทย คือ การใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปจนความจำเป็นและไม่เหมาะสม ขาดมาตรการควบคุม (พงษ์พิสุทธิ์, 2555) จึงจำเป็นต้องหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ จากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน เช่น ปาชายเลน น้ำพุร้อน นาเกลือ เป็นต้น

ปาชายเลนเป็น ระบบนิเวศปาชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีความซับซ้อน มีหน้าที่เป็นปราการเชื่อมต่อระหว่างระบบนิเวศบนบกและนิเวศทางทะเล ทำให้ปาชายเลนในประเทศไทยมีสภาพแตกต่างกัน ทั้งในด้านพืชพรรณ ลักษณะทางกายภาพของพื้นที่ (ภุริภัทร, 2548) เนื่องจากระบบนิเวศนั้นมีความหลากหลายทางชีวภาพมาก จึงมีชีวิตจึงจำเป็นที่จะต้องปรับให้เข้ากับแหล่งที่อยู่อาศัย เพื่อที่จะให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ จึงเป็นสถานที่ที่น่าสนใจศึกษาจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน ได้แก่ แอคติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเส้นสายคล้ายรา พบมากในดิน มีปริมาณเบสกวานีนและไซโตซีนสูงในดีเอ็นเอ แอกติโนมัยซีทเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ เช่น ยาปฏิชีวนะ, สารต้านการก่อมะเร็ง และเอนไซม์ได้ (Arasu M., 2012) มากกว่า 80% ของยาปฏิชีวนะจากทั่วโลกนั้นสร้างมาจากแอกติโนมัยซีทจีนัส *Streptomyces* (Shah et al., 2016) โดยจีนัส *Streptomyces* เป็นกลุ่มเชื้อที่มีลักษณะเป็นเส้นสายที่สำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความหลากหลายในสิ่งแวดล้อมและมีหน้าที่ที่สำคัญในระบบหมุนเวียนธาตุอาหาร (Holtmann et al., 2016)

Streptomyces เป็นแบคทีเรียที่สร้างเส้นสายคล้ายรา โดยเรียกเส้นใยว่า mycelium เชื้อจะสร้างเส้นใยอากาศที่เรียกว่า aerial mycelium และสร้างเส้นใยที่เจริญลงไปใต้อาหารเรียกว่า substrate mycelium และเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นจะสร้างสปอร์ที่เรียกว่า conidia ในช่วงของการสร้างเส้นใยอากาศจะเป็นช่วงที่เชื้อสร้างสารทุติยภูมิ เชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ เช่น Streptomycin จาก *Streptomyces griseus* (Hara and Peppu, 1981)

เยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำงานของเซลล์ห่อหุ้มเซลล์ให้คงรูปร่างอยู่ได้ โดยทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์ เป็นตัวกลางในการถ่ายเทข้อมูลจากภายนอกเซลล์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน แอกติโนมัยซีทจึงต้องมีกลไกในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมบริเวณปาชายเลนเพื่อรักษาการทำงานของเซลล์และรับมือกับสภาพแวดล้อม เนื่องจากบริเวณปาชายเลน

เป็นบริเวณที่มีปัจจัยหลายอย่าง เช่น น้ำขึ้นน้ำลง ความเข้มข้นของเกลือ เป็นต้น แอคติโนมัยซีทจึงสร้าง ฟอสโฟลิปิดที่จะช่วยให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและสิ่งแวดล้อม (Calderón, 2015) นอกจากนี้ฟอสโฟลิปิดยังมีหน้าที่ที่สำคัญที่ช่วยในการแตกแขนงของเส้นใยของ แอคติโนมัยซีท เช่น คาร์ดิโอลิปีน (Cardiolipin)

การสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิดที่ช่วยในการแตกแขนงเส้นใยของ แอคติโนมัยซีทพบว่าเชื้อ *S. coelicolor* สามารถสังเคราะห์ cardiolipin มากที่สุด และฟอสโฟลิปิดชนิดนี้เป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการสร้างเส้นใยในอากาศหรือ aerial mycelium (Calderón, 2015) ฟอสโฟลิปิดชนิดนี้จึงมีความ น่าสนใจ เนื่องจากถ้าเชื้อมีการแตกแขนงของเส้นใยมากขึ้น การสร้างสารทุติยภูมิก็จะมากขึ้นเช่นกัน

จากความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้กล่าวไปข้างต้น ทำให้เกิดความสนใจในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้ โดยทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดที่สามารถ ผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จากดินป่าชายเลนทางภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย ได้แก่ ป่าชาย เลนตำบลบางหญ้าแพรกจังหวัดสมุทรสาคร, ป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี และป่าชายเลนตำบล คลองสอง จังหวัดฉะเชิงเทรา และทำการสกัดฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography โดยจะมุ่งเน้นศึกษาฟอสโฟลิปิดที่พบในบริเวณผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีท (Klanbut, 2013) จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเทคนิค Agar disc diffusion (Ballav et al., 2014) ซึ่งอาจทำให้สามารถค้นพบแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ต่อยอดในการผลิตยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทำการศึกษาคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลนภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย ได้แก่ ป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรกจังหวัดสมุทรสาคร, ป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี และป่าชายเลนตำบลคลองสอง จังหวัดฉะเชิงเทรา
2. เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่ทำการคัดแยก
3. เพื่อทำการสกัดสารทุติยภูมิ และทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยซีทได้
4. เพื่อทำการสกัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆของแอคติโนมัยซีทโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท จากดินป่าชายเลนภาคตะวันออกของไทย เพื่อการศึกษาฟอสโฟลิปิดและการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพ โดยทำการคัดแยกเชื้อด้วยอาหาร Starch casein agar (SCA) ที่ได้ทำการเติม Nystatin (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่ออาหาร 100 ไมโครลิตร และเลี้ยงเชื้อที่บริสุทธิ์ในหลอดอาหารเลี้ยง ISP2 ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งทางชีวภาพจากน้ำหมักของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท ด้วยวิธี Agar disc diffusion และทำการสกัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ จากนั้นทำการศึกษาและวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท จากแหล่งดินป่าชายเลนภาคตะวันออกของไทยได้
2. สามารถจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทได้
3. สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถทำการคัดแยกได้
4. สามารถทำการสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยซีท เพื่อการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้
5. สามารถทำการสกัดสกัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ ของแอคติโนมัยซีทได้
6. งานวิจัยครั้งนี้อาจค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคบางชนิด และสามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปผลิตยาปฏิชีวนะในอนาคตได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมายซีท

แอคติโนมายซีท จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะคล้ายรา เนื่องจากว่าสามารถแตกแขนงเส้นใยได้ แต่ลักษณะที่ทำให้แอคติโนมายซีทแตกต่างจากรา คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และมีขนาดเส้นใยที่เล็กกว่ารา มีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ที่ 0.5 – 1.0 ไมโครเมตร แอคติโนมายซีทจัดอยู่ในโดเมนแบคทีเรียไฟลัม *Actinobacteria* มีจุดเด่นคือ มีปริมาณเบสกวานีน (G) และ ไฮโตซีน (C) สูง (Sharma, 2014) ตารางที่ 2.1 การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียในปัจจุบันจะใช้ข้อมูลของ 16s rRNA gene เพื่อนำมาวิเคราะห์สายต้นไม้แห่งวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) และลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย ซึ่งจะทำให้สามารถแบ่งกลุ่ม *Actinobacteria* ได้ดังนี้ (กิงจันทร์, 2555)

1. Unicellular *Actinobacteria* จัดเป็นแอคติโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เช่น *Micrococcus*, *Rothia*, *Sphaerobacter*, *Cryptobacteria*, *Arthrobacter* และ *Cellulomonas*
2. *Sporoactinomycetes* เป็นแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ เช่น *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Gordonia* และ *Tsukamurella*

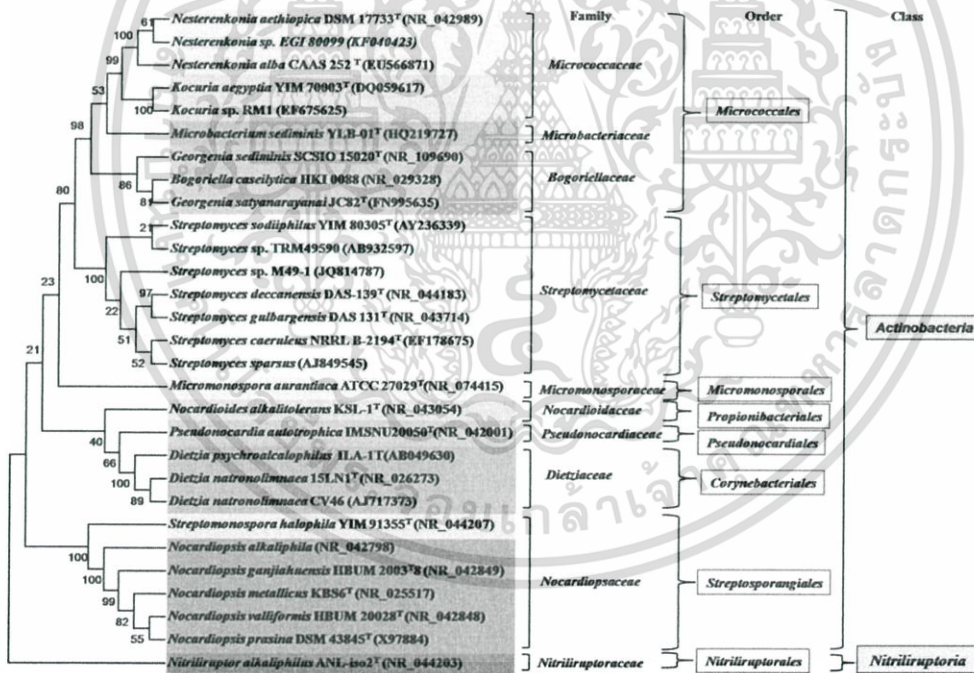
ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบโครโมโซมของแอคติโนมายซีท (Bentley et al., 2002)

Component of chromosome	
Total size	Property
Terminal inverted repeat	8,667,507 bp
G + C content	21,653 bp
Coding sequences	7,825
....of which pseudogenes	55
Coding density	88.9%
Average gene length	991 bp
Ribosomal RNAs	6 x (16S – 23S – 5S)
Transfer RNAs	63
Other stable RNAs	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทกลุ่มที่พบมากที่สุดเป็นกลุ่มที่สร้างเส้นสาย และพบได้ในระบบนิเวศที่หลากหลาย เช่น ดิน ทะเล ภูเขา และป่าชายเลน แอกติโนมัยซีทที่มีความสำคัญในการเป็นผู้ช่วยย่อยสลายองค์ประกอบจำพวกพอลิเมอร์ที่อยู่ในซากพืชซากสัตว์ (Martin, 1961) นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากว่าแอกติโนมัยซีทนั้นจะสร้างเอนไซม์ Amylase ออกมานอกเซลล์เพื่อทำการย่อยแป้ง (α - amylase) หรือแม้แต่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมกระดาษ เพราะแอกติโนมัยซีทสามารถผลิตเอนไซม์ที่สำคัญต่างๆได้ เช่น Cellulase ซึ่งจัดเป็น hydrolytic enzyme ที่สำคัญที่จะไปทำลายพันธะ glucosidic bond และแอกติโนมัยซีทยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ Lipase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกใช้ในอุตสาหกรรมซักล้าง เป็นต้น (รัตนารณ และจันทร์จรัส, 2558)

ความสำคัญของแอกติโนมัยซีทอีกประการหนึ่งคือ แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่สร้างสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ซึ่งกลุ่มหลักๆ ได้แก่ *Streptomyces* และ *Micromonospora* โดยประมาณ 80% ของยาปฏิชีวนะได้มาจากเชื้อในกลุ่มนี้ และใช้มากในอุตสาหกรรมการผลิตยา (Das, 1996)



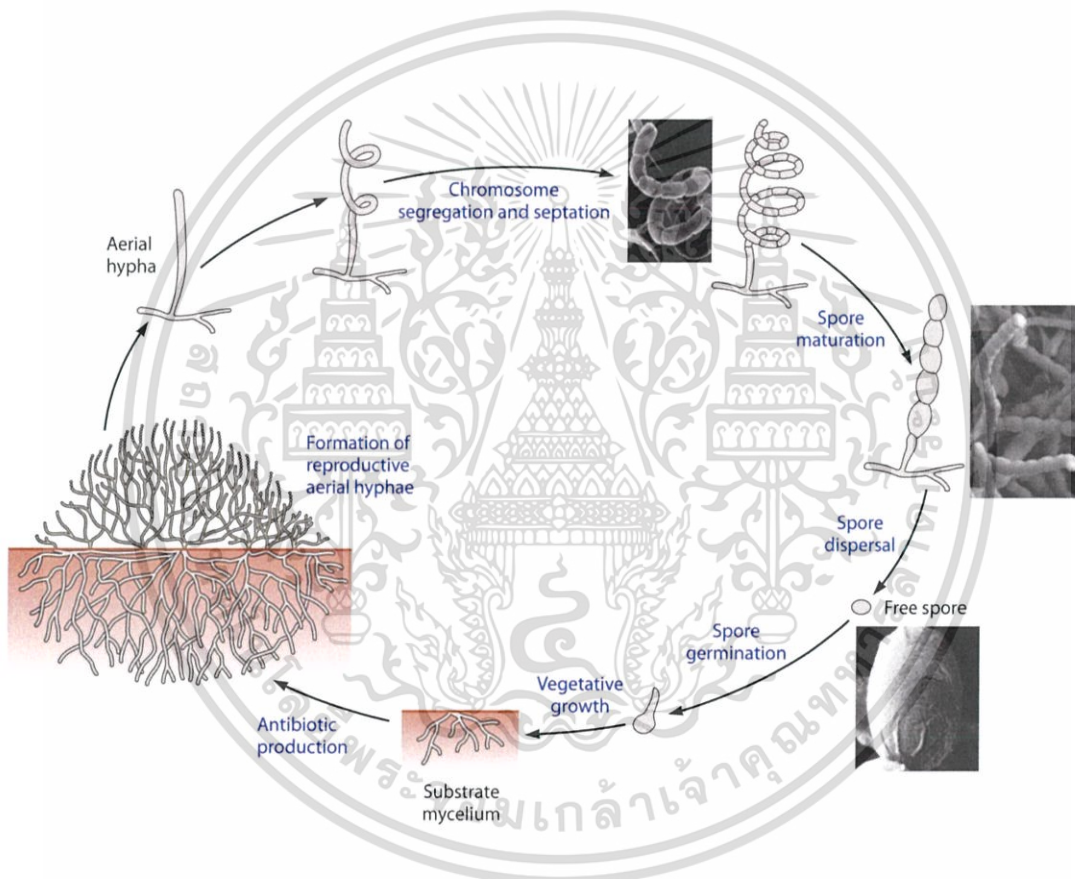
รูปที่ 2.1 การจัดเรียง Phylogenetic tree ของแอกติโนมัยซีทบางสกุล

ที่มา http://www.frontiersin.org/files/Articles/156396/fmicb-06-01014-HTML/image_m/fmicb-06-01014-g002.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วงจรชีวิตของแอสโคดีโนมัยซีท

วงจรชีวิตของแอสโคดีโนมัยซีทจะมีช่วงชีวิตหนึ่งที่จะสร้างสปอร์ การเจริญและการสืบพันธุ์จึงจะเริ่มจากสปอร์ที่อยู่ในระยะพักตัว เมื่อพบกับสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญ ซึ่งประกอบไปด้วยสารอาหาร แร่ธาตุ สปอร์ที่อยู่ในระยะพักตัวจะเริ่มงอกและเจริญไปเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ภายในระยะเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเส้นใยอาหารเจริญเต็มที่จึงจะสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) มีลักษณะเป็นเส้นสาย แล้วเกิดการคอดของเส้นใยเป็นสปอร์เดี่ยวในระยะพัก ซึ่งเมื่อเจอสภาวะที่เหมาะสมจะงอกเพื่อเจริญไปเป็นเส้นใยต่อไป (Albert and Mcquown, 1995) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วงจรชีวิตของแอสโคดีโนมัยซีท

ที่มา <http://mibr.asm.org/content/80/1/1/F4.expansion.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแอสโคไมซีต

แอสโคไมซีตแต่ละชนิดจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต่างกัน ซึ่งจะจำแนกได้จากเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ดังภาพที่ 2.3 การจัดเรียงตัวของสปอร์ ลักษณะของสปอร์ ก็ถือเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความสำคัญในการนำมาจัดจำแนกแอสโคไมซีต

2.3.1 เส้นใยอาหาร

เส้นใยอาหาร หรือ vegetative mycelium เป็นเส้นใยที่จะเจริญที่ผิวหน้าของอาหารหรือเจริญลงไปใ้อาหาร หน้าที่หลักของเส้นใยชนิดนี้คือการดูดซึมสารอาหารต่างๆเพื่อใช้ในการเจริญของแอสโคไมซีต (Widermullt, 1970) ดังรูปที่ 2.3



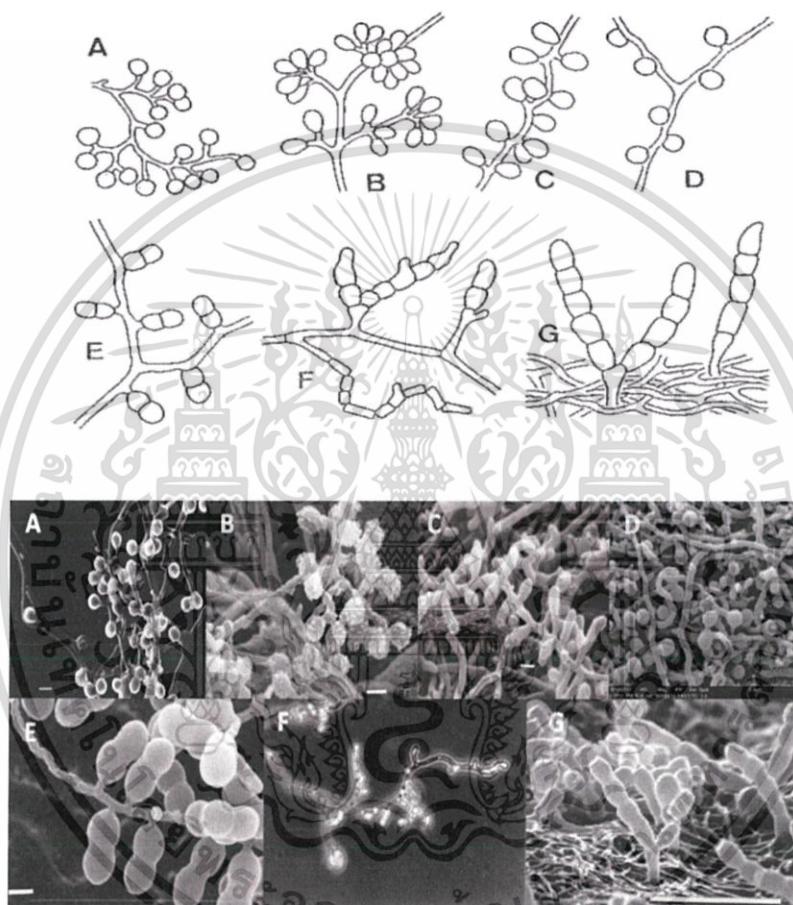
รูปที่ 2.3 ลักษณะของการสร้างเส้นใยของแอสโคไมซีตบนผิวหน้าอาหาร
(ก) เส้นใยอาหาร (ข) เส้นใยอากาศ (Widermullt, 1970)

2.3.2 เส้นใยอากาศ

เส้นใยอากาศ เป็นเส้นใยที่จะถูกสร้างขึ้นหลังจากเส้นใยอาหาร ในบางครั้งจะทำให้สังเกตเห็นความแตกต่างได้ไม่ชัดเจน วิธีที่จะทำให้สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ดีที่สุดคือการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค slide culture ซึ่งเส้นใยจะเกาะติดอยู่บน cover slip เมื่อนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะสามารถจัดจำแนกได้อย่างชัดเจนเห็นเส้นสายของสปอร์ (Harris, 1986)

2.3.3 เส้นสายสปอร์

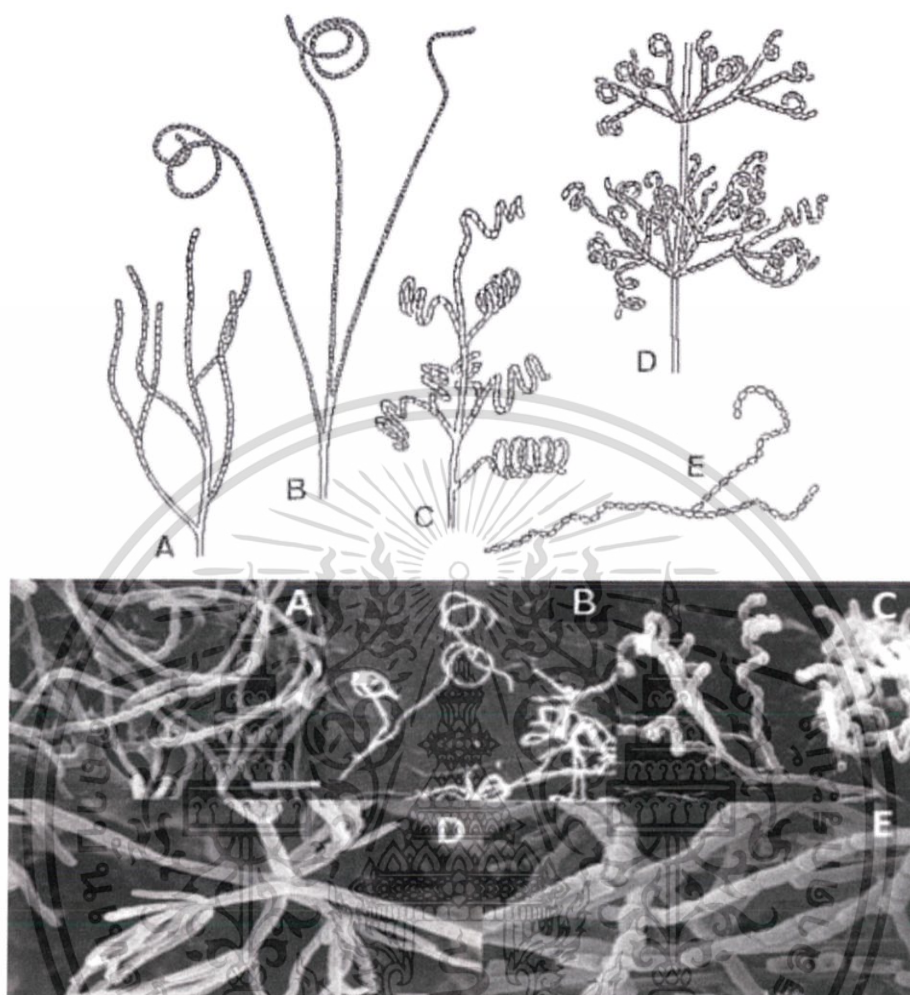
เส้นสายของสปอร์จะถูกจัดจำแนกจากความยาวของสายสปอร์ แอคติโนมัยซีทแต่ละชนิดก็จะมีเส้นสายของสปอร์และรูปร่างสปอร์ที่แตกต่างกัน มีจำนวนสปอร์ที่ต่างกันไป บางชนิดมีจำนวนสปอร์เพียง 1-2 สปอร์ บางชนิดมีเส้นสายของสปอร์ที่เกิดจากการเรียงต่อกันจนเป็นเส้นสายยาว (ยูวตี, 2546) ดังรูป 2.4 และ 2.5



รูปที่ 2.4 ลักษณะของการจัดเรียงตัวของเส้นสายสปอร์

การจัดเรียงสปอร์แบบ Monosporus ของ (A) *Micromonospora*, (B) *Thermomonospora*, (C) *Saccharomonospora* และ (D) *Thermoactinomyces* การจัดเรียงสปอร์แบบ Disporous ของ (E) *Microbispora* และการจัดเรียงสปอร์แบบ Oligosporous ของ (F) *Nocardia brevicatena* และ (G) *Catellatospora* (Li et al., 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

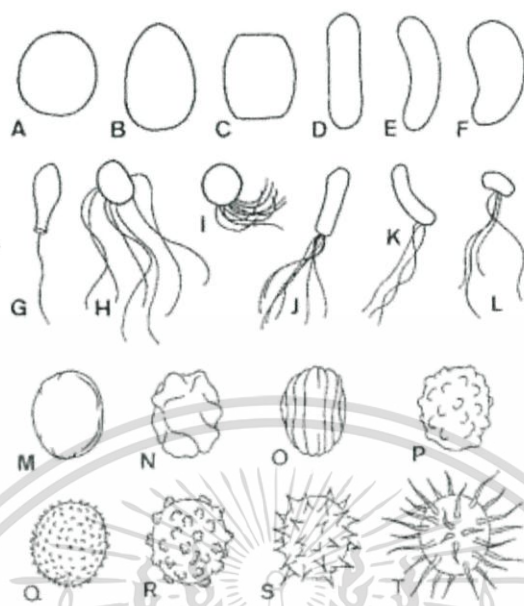


รูปที่ 2.5 ลักษณะของการจัดเรียงตัวของสปอร์เส้นสายยาวของ *Streptomyces* (A) การเรียงตัวแบบ Rectiflexibiles, (B) การเรียงตัวแบบ Retinaculiaperti, (C) การเรียงตัวแบบ Spira, (D) การเรียงตัวแบบ Verticillati : *Nocardiosis* (E) การเรียงตัวแบบแตกออกมาจากเส้นใยอากาศ (Li *et al.*, 2016)

2.3.4 สปอร์

แอกติโนมัยซีทจะสร้างสปอร์ขึ้นหลังจากการสร้างเส้นใยอากาศเสร็จสิ้น การสร้างสปอร์เกิดจากการแบ่งนิวเคลียสหลายๆ ครั้ง ต่อจากนั้นไซโทพลาสซึมจะแบ่งตาม แล้วจะมีการสร้างเยื่อเป็นชั้นๆ แต่ละส่วนจะมีนิวเคลียส 1 อัน เรียกว่า สปอร์ (Spore) (Kye Joon Lee, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



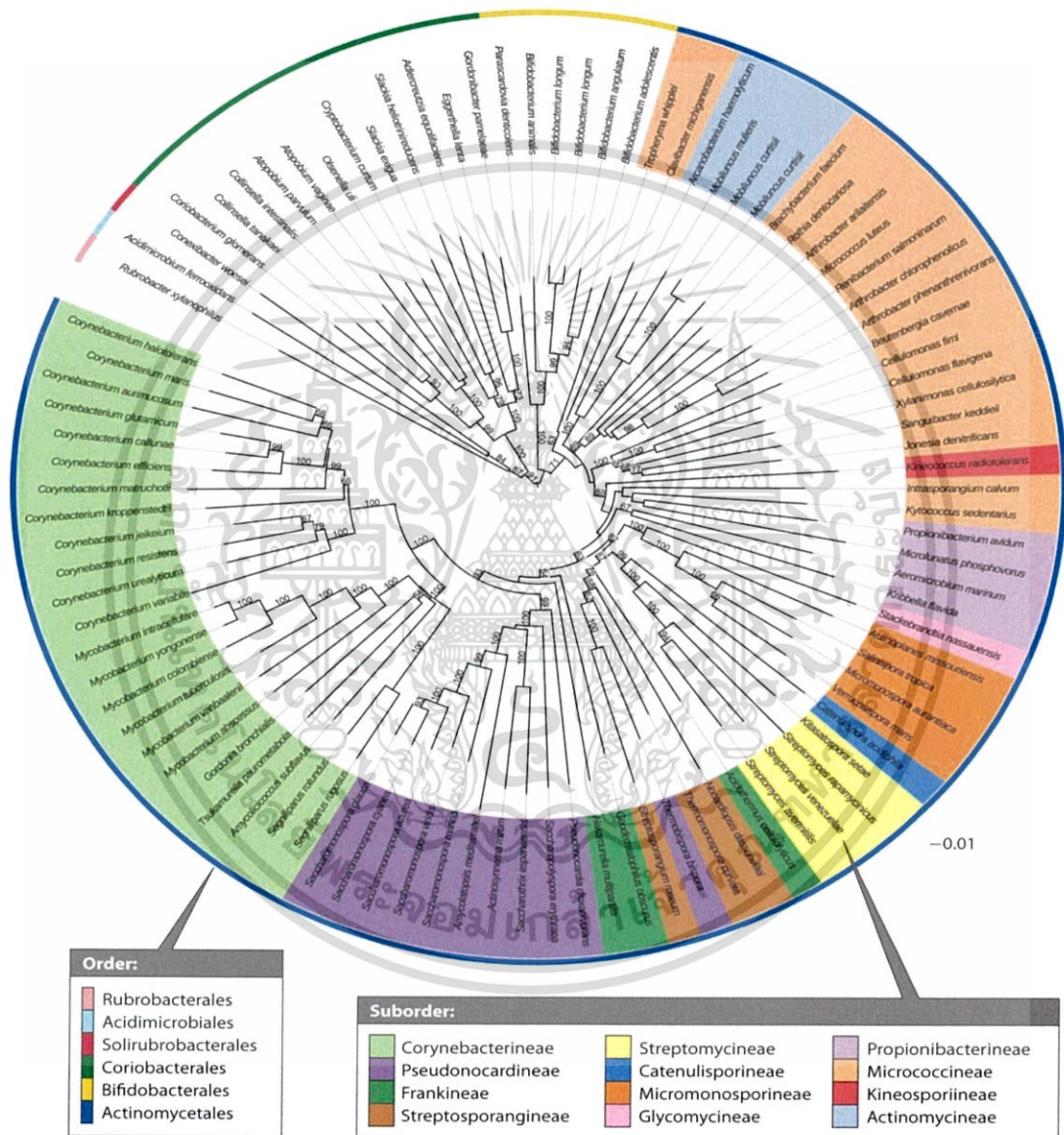
รูปที่ 2.6 ลักษณะของสปอร์ที่แตกต่างกัน

(A) globose, (B) ovoid, (C) doliform, (D) rodshaped, (E) allantoid, (F) reniform. ลักษณะของสปอร์ที่มี flagella (G) monopolar monotrichous, (H) peritrichous, (I) polytrichous, (J) monopolar polytrichous (=lophotrichous), (K) subpolar polytrichous, (L) lateral polytrichous. ลักษณะผิวของสปอร์: (M) smooth, (N) irregular rugose, (O) parallel rugose, (P) warty, (Q) verrucose, (S) spiny, และ (T) hairy (Li *et al.*, 2016)

2.4 การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทถูกจัดอยู่ในไฟลัม Actinobacteria ในปัจจุบันตามการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition) Volume 5 (Ruan, 2013) พบว่าไฟลัมนี้ถูกแบ่งออกเป็น 6 classes ได้แก่ Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitrospirae, Rubrobacteria และ Thermolephilia และถูกจำแนกเป็น 6 orders ประกอบด้วย Actinomicrobiales, Actinomycetales, Bifidobacteriales, Coriobacteriales, Rubrobacteriales และ Solirubrobacteriales โดยใน order Actinomycetales ประกอบด้วย 16 suborders ได้แก่ Actinomycineae,

Actinopolysporineae, Catenulisporineae, Corynebacterineae, Frankineae, Glycomycineae, Jiangellineae, Propionibacterineae, Kineosporineae, Micrococcineae, Micromonosporineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae และ *Streptosporangineae* (Barka *et al.*, 2016) ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Barka *et al.*, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces* จัดเป็นจีนัสใหญ่ที่สุดใน *Actinobacteria* และถูกจัดอยู่ใน family *Streptomycetaceae* ซึ่งเชื้อ *Streptomyces* sp. จัดเป็นพวก chemoorganotrophic คือ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้, ทดสอบ catalase แล้วให้ผลบวก, สามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรต์ได้ และ สามารถย่อยสลาย adenine, esculin, casein, gelatin, hypoxanthine, starch และ L-tyrosine ได้ แอกติโนมัยซีทสามารถผลิตสารระเหย metabolite ที่มีกลิ่นเฉพาะคล้ายกลิ่นดินเรียกว่าสาร geosmin (Hasani *et al.*, 2014) และมีคุณสมบัติที่น่าสนใจมากที่สุดคือความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เรียกว่า secondary metabolite อันได้แก่ สารต้านเชื้อรา, สารต้านไวรัส, สารต้านมะเร็ง, สารลดความดันโลหิต, สารต้านภูมิคุ้มกันและโดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ (Holtmann *et al.*, 2016) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างเส้นใยก่อนที่จะมีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่หลากหลาย (Emerson *et al.*, 2012) ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค แต่พบว่าบางสายพันธุ์สามารถก่อโรคในพืชได้ ตัวอย่างเช่น *S. scabies* ก่อให้เกิดโรค Potato scab และ *S. acidiscabies* ที่ก่อให้เกิดโรค acid scab ในดิน ทำให้ pH ของดินเป็นกรด (Kieser *et al.*, 2000)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาความหลากหลายและการนำมาใช้ประโยชน์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ เนื่องจากว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทในดินส่วนใหญ่เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุด โดยพบประชากรของเชื้อ *Streptomyces* ในดินประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์ (ทายาท และคณะ, 2558) กลุ่มเชื้อ *Streptomyces* เป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ที่สร้างสายใยที่แตกแขนงได้แบบเดียวกับเชื้อรา โดยเราเรียกเส้นใยนี้ว่า mycelium เหมือนกับในเชื้อรา เชื้อจะสร้างเส้นใยที่ผิวของโคโลนีที่เรียกว่า aerial mycelium และสร้างเส้นใยที่เจริญลงไปในอาหารที่เรียกว่า substrate mycelium (ยุวดี, 2546) เชื้อที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* เชื้อส่วนใหญ่ในจีนัสนี้สร้างสปอร์ซึ่งเรียกว่า conidia โดยการสร้าง conidia จะสร้างขณะที่อายุของเชื้อมากขึ้น aerial mycelium ที่ชูขึ้นบนผิวของโคโลนีจะพัฒนาเป็น sporophores ที่จะมี nuclei หลายอัน และเกิดการสร้างผนังกันทำให้แต่ละเซลล์พัฒนาไปเป็น conidia ซึ่งมักเป็นสายยาว และมีลักษณะหลากหลายทั้ง sporophores และ conidia มักมีสีต่างกัน ทำให้สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้โดยอาศัยจากทั้งลักษณะและสีของ sporophores และ conidia ร่วมกับคุณสมบัติด้านอื่นๆ เชื้อ *Streptomyces* สามารถแยกได้จากดินเป็นส่วนใหญ่บางครั้งก็สามารถพบในแหล่งน้ำได้บ้าง และยังพบ *Streptomyces* ที่อาศัยอยู่ในพืชหรือที่เรียกว่า endophytic *Streptomyces* (วัฒนาลัย, 2550)

นอกจากนี้ยังมีแอกติโนมัยซีทอีกกลุ่มหนึ่ง ซึ่งจัดเป็นแอกติโนมัยซีทหายาก มีการกระจายตัวน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของดิน, ค่า pH, ลักษณะของกรดฮิวมิก (humic acid) และปริมาณฮิวมัส (humus) ที่พบในดิน โดยดินที่ใช้เพาะปลูกจะพบปริมาณฮิวมัสสูง และมีค่า pH ประมาณ 6.5-7.0 ซึ่งดินลักษณะนี้จะพบแอกติโนมัยซีทหายากมากที่สุด ส่วนดินที่มีปริมาณฮิวมัสสูงแต่มีสภาพเป็นกรด (pH 5.0-6.5) จะพบ

เชื้อแอกติโนมัยซีทหลายสกุล *Microbispora* และ *streptosporangium* มากที่สุด ส่วนดินที่เป็นต่าง และปริมาณฮิวมัสต่ำจะพบเชื้อในสกุล *Saccharomonospora* (ลักขมี, 2556)

นอกจากนี้ยังมีเชื้อที่เป็น non-streptomycetes จัดเป็นแอกติโนมัยซีทที่หายาก เช่น *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Dactylosporangium* และ *Actinoplanes* เป็นต้น (พานทอง, 2550) เหตุผลที่จัดเป็นแอกติโนมัยซีทที่หายาก เนื่องจากมีปริมาณน้อยและเจริญได้ช้า จะเจริญได้ดีเมื่อมีจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งลดปริมาณลง ในช่วงที่มีสารประกอบที่ทนทานต่อการย่อยสลายเหลืออยู่มาก แอกติโนมัยซีทหลายชนิดจะช่วยกันย่อยสลายสารจำพวกแป้ง, อินซูลิน, โคคิน, เซลลูโลส, ลิกนิน, พาราฟิน, ฟีนอลและไพริมิดีน เป็นต้น (จรินทร์, 2014)

แบคทีเรียทางทะเลทั้งหมด 10% จัดเป็นแอกติโนมัยซีทซึ่งเป็นทรัพยากรที่โดดเด่นและน่าสนใจที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากอัตราการค้นพบสารประกอบที่เป็นที่รู้จักกันสูงจากแอกติโนมัยซีททำให้แอกติโนมัยซีทได้รับความสนใจในการค้นหาและพัฒนาายาต้านจุลชีพชนิดใหม่จาก rare actinomycetes เพื่อต่อสู้กับการเพิ่มจำนวนของเชื้อโรคที่ทนต่อยา multidrug ได้ (Subramani and Aalbersberg, 2013) Rare actinomycetes มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยา เนื่องจากสามารถผลิตสารประกอบที่มีความหลากหลายและซับซ้อน มีความเป็นพิษต่ำ มีสารประกอบทางเคมีหลายชนิด เช่น terpenoids หรือ benzenoids และสารประกอบชนิดที่มีความซับซ้อน เช่น vancomycin, ristocetin ในขณะที่มีรายงานว่ามียามากกว่า 50 ชนิดที่หาได้ยากและพบได้จาก actinomycete (Tanvir and sajid, 2016) สำหรับ rare actinomycetes ที่มีรายงานการศึกษาวิจัยและพบว่าเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Actinokineospora*, *Acrocarpospora*, *Actinosynnema*, *Catenuloplanes*, *Cryptosporangium*, *Nocardia*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Kineosporia*, *Kutzneria*, *Microtetraspora*, *Nonomuraea*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Pseudonocardia*, *Microbispora*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Spirilliplanes*, *Thermomonospora*, *Thermobifida* และ *Virgosporangium* (รัชชัย และคณะ 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ความสามารถในการสร้างสารสารถูยภูมิของเชื้อแอกติโนมัยซีท

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นโดยแอกติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* ได้แก่ ampicillin และ penicillin-N ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้ *S. clavuligerus* สามารถผลิต clavams มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลคตาเมส ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย staphylococci และแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน streptomycin ที่ผลิตโดย *S. griseus* และ neomycin ที่ผลิตโดย *S. fradiae* ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด (วชิร, 2544)

แอกติโนมัยซีทสามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งจัดเป็นสารสารถูยภูมิเช่นกัน เอนไซม์ที่แอกติโนมัยซีทสามารถผลิตได้มีหลายชนิด ได้แก่ xylanase, cellulose, amylase และ chitinase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้เช่น นำมาทำ protoplast ของราเพื่อศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา การสังเคราะห์สารต่างๆ เพื่อนำมาเป็นสารควบคุมทางชีวภาพเช่น ใช้ควบคุมราที่ก่อโรคพืช และการนำมาใช้ย่อยสลายของเสียทางอุตสาหกรรมการแช่แข็งอาหารทะเล เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของของเสียในอุตสาหกรรม เป็นต้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทที่มีรายงานในช่วงปี ค.ศ. 2003-2005 แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีท (กิ่งจันทร์, 2555)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	แอกติโนมัยซีท	กิจกรรมการยับยั้ง
Abyssomicins	<i>Verrucosisspora</i> sp.	Antibacterial
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anticancer
Bonactin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Caprolactones	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
3,6-disubstituted indoles	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial
Diazepinomicin	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial , Anticancer , Antiflammatory
handrananimycins	<i>Actinomadura</i> sp.	Antibacterial

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอกติโนมัยซีทนั้นมีความหลากหลายในการผลิตสารปฏิชีวนะ แต่ปัจจุบันมีเพียงสารปฏิชีวนะบางชนิดเท่านั้นที่มีความสำคัญทางคลินิก เนื่องจากสารปฏิชีวนะชนิดที่ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะเจาะจงเท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ได้ คือ จะต้องมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์สูง แต่ในขณะเดียวกันต้องเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์น้อยที่สุด ถึงจะเป็นสารปฏิชีวนะที่มีคุณค่าต่อการรักษาโดยมีตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ (รัตนภรณ์, 2541)

สารปฏิชีวนะ	แอกติโนมัยซีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะ
Ankingomycin	<i>Streptomyces</i> sp. SF2587
Antimycin A1	<i>Streptomyces</i>
Benanomycin A R=OH	<i>Actinomyceshibisca</i> , <i>Actinomyces spadix</i>
Blemycin A2	<i>Streptomyces verticillus</i>
Cyclothialidine	<i>Streptomyces filipnesis</i> NR 0484
10-Demethoxystreptonigrin	<i>Streptomyces otagonesis</i> SANK 62589
Deoxylaidlomycin	<i>Streptomyces eurocidicus</i> SANK
Esperamicin A1	<i>Actinomadura verrucosospora</i>
FK 506 (Tacrolimus)	<i>Streptomyces tsukubaensis</i> No 9993
Hatomamicin A	<i>Saccharopolyspora</i> sp. YL-0358M
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

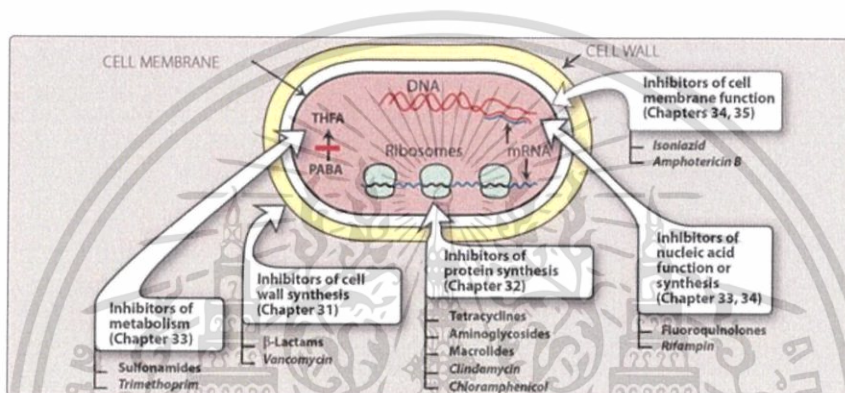
Castillo *et al.* (2003) รายงานว่าสารปฏิชีวนะ kakadumycins ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. NRRL 30566 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ส่วนสารปฏิชีวนะ meroparamycin ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. MAR01 สามารถยับยั้งได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ รวมถึง *Candida albicans* (El-Naggar *et al.*, 2006) และมีรายงานว่า *Streptomyces padanus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ fungichromin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ได้ (Shih *et al.*, 2003)

แอกติโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในดิน สามารถผลิตเอนไซม์ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่ช่วยย่อยสลายสารต่างๆได้ เช่น ลิกนิน, ไคตินและเซลลูโลส เป็นต้น นอกจากนี้บางชนิดสามารถย่อยสลายยาปราบศัตรูพืช เช่น diuron (Castillo *et al.*, 2006) และ alachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง (Sette *et al.*, 2005) และย่อยสลายยาฆ่าแมลง lindane (δ -hexachloro cyclohexane) (Benimeli *et al.*, 2008)

แอกติโนแบคทีเรียสามารถผลิตวิตามินได้หลายชนิด เช่น *Streptomyces olivaceus* สามารถผลิตวิตามิน B12 (Maitra and Roy, 1960) มีรายงานว่าแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากและรากสามารถผลิตกลุ่มของวิตามินบีได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไทอะมีน, ไโรโบฟลาวิน, ฟลาโวโปรตีน, วิตามินบี 12 และโคเอนไซม์ เอ (Santos *et al.*, 1976)

2.6 การออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะและกลไกการดื้อยาของจุลชีพ

กลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพจะตั้งอยู่บนพื้นฐานคือ ให้ยามีผลเฉพาะต่อเชื้อก่อโรค และไม่มีผลหรือมีผลเล็กน้อยต่อเซลล์ของมนุษย์ (selective toxicities) สามารถแบ่งตำแหน่งของการออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพออกได้เป็น 4 แบบ (ศิริลักษณ์, 2549) ได้แก่ ยาที่ยับยั้งหรือขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย, ยาที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน, ยาที่ยับยั้งการสังเคราะห์สารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและยาที่ขัดขวางกระบวนการแบ่งตัวและการถอดรหัสพันธุกรรม ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพโดยอาศัยการจัดจำแนกด้วยตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะ (THFA = tetrahydrofolic acid; PABA = *p*-aminobenzoic acid) (Ghooi and Thatte, 1995)

ยาที่ยับยั้งหรือขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น ยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactams และยาอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกัน เป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่มียาหลากหลายที่สุดและมีขอบเขตการออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อได้ค่อนข้างกว้างขวางตามชนิดของยา ได้แก่ penicillin และ derivatives คือ ampicillin, amoxicillin (amoxicillin), cloxacillin, piperacillin (Kong *et al.*, 2010) โดยทั่วไปยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมบวก เช่น *Streptococci* และ Gram-positive anaerobes ได้ดี ampicillin และ amoxycillin มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* ได้ดีกว่า penicillin อื่นๆ ส่วน cloxacillin นั้นเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ดีที่สุด piperacillin จัดเป็น anti-pseudomonal penicillin เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมลบดีกว่า penicillin รวมทั้งสามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ได้ดีพอสมควร สำหรับ ampicillin, amoxicillin และ piperacillin ที่ได้มีการเติม sulbactam, clavulanate และ tazobactam (อิสยา และวัชรินทร์, 2556) พบว่าสารเหล่านี้เป็น β -lactamase inhibitor ที่มีฤทธิ์เพียงยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase เท่านั้นแต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (ยกเว้น sulbactam ที่อาจมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *A. baumannii* บางสายพันธุ์ได้) การเพิ่มปริมาณ

ของ β -lactamase inhibitor เข้าไป ทำให้ ampicillin และ amoxycillin มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบได้ดีขึ้น และ tazobactam ก็ทำให้ piperacillin ทนต่อ β -lactamase ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และ anaerobes ในลำไส้ได้ดีขึ้น (Drawz and Bonomo, 2010) แต่ β -lactamase inhibitors เหล่านี้ไม่สามารถยับยั้ง β -lactamase ของ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ เมื่อใช้ piperacillin/tazobactam ในการรักษาการติดเชื้อนี้ จึงต้องคิดตามขนาดยา piperacillin เท่านั้น โดย piperacillin/tazobactam 4.5 กรัม จะประกอบด้วย piperacillin 4 กรัม และ tazobactam 0.5 กรัม นอกจากนี้ยาจำพวก Glycopeptides เช่น vancomycin และ teicoplanin มีบทบาทมากขึ้นเมื่อมีการระบาดของเชื้อ MRSA จนทำให้แพทย์จำนวนมากเลือกใช้ยานี้เพื่อรักษาการติดเชื้อ *S. aureus* แต่ความจริงหากเชื้อไม่ติดต่อกับ β -lactams ยากลุ่ม glycopeptide จะทำลายเชื้อได้ไม่ดีเท่ากับ β -lactams ดังนั้นในสถานการณ์ขณะนี้ ที่เชื้อ MRSA ส่วนใหญ่ยังจำกัดอยู่ในโรงพยาบาล จึงไม่ควรใช้ glycopeptide สำหรับการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus* ที่มาจากชุมชน vancomycin เป็นยาที่มีโอกาสทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ได้ไม่บ่อยเท่า β -lactams แต่ต้องให้ทางหลอดเลือดดำช้าๆ เพราะหากให้เร็วจะกระตุ้นการหลั่ง histamine ทำให้หลอดเลือดขยายตัวคล้ายกับ anaphylaxis และอาจทำให้ความดันโลหิตตกได้ (Mayo clinic, 2017)

ยาที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ สารจำพวก aminoglycoside เป็นยาที่มีประโยชน์มากในการรักษาโรคติดเชื้อ เนื่องจากสามารถฆ่าเชื้อหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งที่กลไกหลักในการออกฤทธิ์คือการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งเชื้อจะไม่ตาย กลไกที่ทำให้ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์เป็น bactericidal นั้นไม่แน่ชัด สันนิษฐานว่าในกระบวนการที่ยาซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียนั้น ทำให้ permeability ของเซลล์เสียไป ร่วมกับการที่ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ที่สูงมาก ซึ่งทำให้การแปลรหัสจาก RNA ผิดพลาด นำไปสู่การสร้างโปรตีนที่ผิดปกติทำให้โปรตีนนั้นไม่สามารถใช้งานได้ (Gonzalez et al., 1998)

ยาที่ยับยั้งการสังเคราะห์สารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกนั้น มียาเดียวที่เคยใช้ในอดีต เช่น sulfadiazine แต่ในทางปฏิบัติ ยานี้ก็ต้องใช้ร่วมกับยาอื่น คือ pyrimethamine สำหรับการรักษา toxoplasmic encephalitis แต่เนื่องจากปัจจุบันไม่มี pyrimethamine ที่เป็นยาเดียว sulfadiazine จึงไม่มีการใช้ ยากลุ่มนี้ในปัจจุบันมีเพียงยาผสม trimethoprim และ sulfamethoxazole (TMP/SMX) 80/400 มิลลิกรัม หรือ co-trimoxazole ซึ่งมีข้อบ่งชี้ค่อนข้างจำกัด เช่น ใช้รักษาการติดเชื้อของ *Nocardia* spp. และ *Pneumocystis jirovecii* โดยใช้ร่วมกับ ceftazidime

ในการรักษาโรค melioidosis และป้องกันการเป็นโรคปอดบวมจากเชื้อ *Pneumocystis jirovecii* ในผู้ป่วยโรคเอดส์ เป็นต้น ในอดีตเคยมีการใช้ยานี้ในการรักษาโรคติดเชื้อแกรมลบบางชนิด เช่น การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ, ไซโทพอยด์และอุจจาระร่วงจากเชื้อ *Shigella* spp. (Jaya et al.,

2016) แต่ในปัจจุบันมีอัตราการดื้อยาค่อนข้างสูงจึงไม่นิยมใช้ TMP/SMX ในการรักษาโรคเหล่านี้ โดยไม่ทราบผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา อย่างไรก็ตามหากตรวจพบว่าเชื้อไม่ดื้อยาหรือผู้ป่วยอยู่ในถิ่นที่มีปัญหาเชื้อดื้อยาไม่มากนัก ก็สามารถใช้นี้นในการรักษาโรคต่างๆดังกล่าวได้ ข้อดีของยานี้คือ หาได้ง่าย มีทั้งในรูปยาเม็ดและยารับประทาน สามารถถูกดูดซึมได้ดีจากทางเดินอาหารทำให้ผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องอยู่ในโรงพยาบาลเป็นเวลานาน แต่ข้อเสียของยาชนิดนี้คือ ผู้ป่วยบางกลุ่มอาจมีแนวโน้มที่จะแพ้ยาได้ ถ้าผู้ป่วยมีปฏิกิริยาการแพ้ที่รุนแรง เช่น Steven-Johnson's syndrome หรือ toxic epidermal necrolysis ถือเป็นข้อห้ามในการใช้ยานี้ อีกกรณีหนึ่งคือ fixed-drug eruption ซึ่งแม้จะไม่รุนแรง แต่ก็ยังเป็นปัญหากับผู้ป่วยมาก เป็นข้อห้ามในการใช้ต่อไปเช่นกัน (สุภานันท์, 2548)

ยาที่ขัดขวางกระบวนการแบ่งตัวและการถอดรหัสพันธุกรรมกลุ่มนี้คือ Fluoroquinolone ซึ่งได้จากการเติม fluorine เข้าไปในโมเลกุลของ nalidixic acid ซึ่งเป็น quinolone ตัวแรกที่มีใช้ การเพิ่ม fluorine และ side chain อื่นๆเข้าไป ทำให้ได้ fluoroquinolones ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้น มีโอกาสการดื้อยาน้อยลง การดูดซึมและการกระจายตัวของยาเข้าไปในเนื้อเยื่อต่างๆได้ดีขึ้น fluoroquinolones มีหลายชนิด บางชนิดถูกนำมาใช้เพียงไม่นานก็ต้องถูกระงับไปเนื่องจากผลข้างเคียงที่รุนแรง (Claude, 2001) ยาที่มีใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin, และ moxifloxacin ยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมลบได้ดีโดยเฉพาะ ciprofloxacin นอกจากสามารถทำลายเชื้อแกรมลบโดยทั่วไปได้ดีแล้วยังมีคุณสมบัติต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ levofloxacin ส่วน norfloxacin และ ofloxacin สามารถทำลายเชื้อแกรมลบอื่นๆ นอกจาก *P. aeruginosa* ได้ ยาที่ได้รับการพัฒนามาภายหลัง เช่น levofloxacin และ moxifloxacin มีฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมบวกได้ดีกว่า fluoroquinolones รุ่นแรกๆและยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อ กลุ่มที่ก่อโรค atypical pneumonia เช่น *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, และ *Chlamydia pneumoniae* ได้ดี (กำธร, 2548) จึงอาจเรียกกยาทั้งสองนี้ว่า respiratory fluoroquinolones โดยที่ moxifloxacin จะมี MIC ต่อเชื้อแกรมบวก ต่ำกว่า MIC ของ levofloxacin เชื้ออื่นที่ไวต่อยากลุ่มนี้ ได้แก่ *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Brucella* spp. (อิสยา, 2556)

กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพ (Mechanisms of antimicrobial resistance) สำหรับเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดสามารถเกิดการดื้อยาด้านจุลชีพได้หลายชนิด ซึ่งมีกลไกการดื้อยาแตกต่างกันออกไป ขณะเดียวกันการดื้อยาแต่ละชนิดสามารถเกิดได้จากหลายกลไก (พรรณรวี, 2559) กลไกการดื้อยาด้านจุลชีพที่พบได้ คือ การสร้างเอนไซม์มาื่อย่อยสลายยา (Enzymatic inhibition) เช่น เอนไซม์ β -lactamase ที่สามารถทำลายยาในกลุ่ม β -lactams เอนไซม์ acetyltransferase ที่สามารถทำลายยา chloramphenicol ได้ และ aminoglycoside modifying enzyme ที่สามารถสลายยาในกลุ่มของ

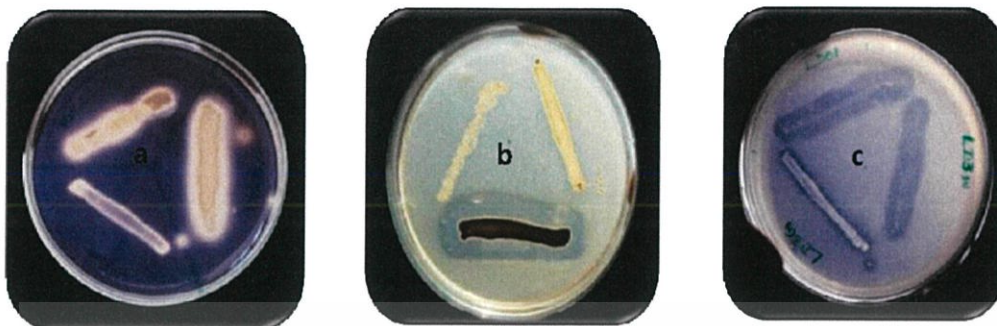
aminoglycosides ได้ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่อาจจะไปออกฤทธิ์ (Target alteration) ได้แก่ การลด affinity ของเป้าหมายต่อยาต้านจุลชีพ เช่น การลด affinity ของ penicillin binding proteins (PBPs) ต่อยา penicillin ใน *S. pneumonia* และ *S. aureus* หรือจะเป็นการสร้างเป้าหมายใหม่หรือเปลี่ยนแปลงเส้นทางเมตาบอลิซึม เช่น การสร้าง PBP ชนิดใหม่ซึ่งไม่เคยมีมาก่อนใน methicillin-resistant *S. aureus* และการสร้างเป้าหมายหรือเส้นทางเมตาบอลิซึมให้มากขึ้น เช่น การสร้างเอนไซม์ dihydropteroate synthetase ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา sulfonamides และการป้องกันไม่ให้ยาเข้าสู่เป้าหมาย เช่น การดื้อยา vancomycin ของเชื้อ *Enterococcus* นอกจากนี้ยังมีการลดปริมาณการนำยาเข้าเซลล์ของเชื้อก่อโรค (Decrease uptake) ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธีคือ การลดการซึมผ่านของยา เช่น การดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ของเชื้อ *P. aeruginosa* และการขับยาออกจากเซลล์ของเชื้อก่อโรค เช่น การดื้อยาของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ต่อยา tetracycline การดื้อยาในกลุ่ม β -lactams ของเชื้อ *P. aeruginosa* (ศิริลักษณ์, 2549)

2.7 ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีท

ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีทนอกจากการผลิตยาปฏิชีวนะที่เป็นที่รู้จักกันดีแล้ว แอกติโนมัยซีทยังสามารถผลิตเอนไซม์ต่างๆ ที่มีความสำคัญได้ เช่น Lipase, Amylase เป็นต้น และยังพบว่าแอกติโนมัยซีทสามารถย่อยสลายสารจำพวก hydrocarbon, pesticide, สารประกอบจำพวก aliphatic และ aromatic ได้อีกด้วย แอกติโนมัยซีทสามารถนำมาใช้ในทางการเกษตรโดยนำมาใช้ในการกำจัดศัตรูพืช หรือ Biocontrol ได้ (Lekshmi et al., 2014)

1. Amylase

เอนไซม์ชนิดนี้จะช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4 glycosidase bond ในโมเลกุลของแป้ง (starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลงทำให้ได้เป็นเดกซ์ทริน (dextrin) และน้ำตาล (sugar) การย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น มอลโทส (maltose) ทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (glucose) การผลิตเอนไซม์ของแอกติโนมัยซีทจะถูกผลิตและปล่อยออกมาออกเซลล์เพื่อทำการย่อยแบบ extracellular digestion เอนไซม์นี้มีบทบาทที่สำคัญในโรงงานกระดาษเนื่องจากสามารถทำการย่อยสลายแป้งได้ แอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ได้แก่ *Streptomyces* sp., *Streptomyces erumpens*, *Nocardopsis* และ *Thermobifida fusca* (Held, 2012) แอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อได้จะมีลักษณะดังรูปที่ 2.9 (a)



รูปที่ 2.9 การผลิตเอนไซม์ของแอกติโนมัยซีท

a) Amylase ย่อยสลายแป้ง b) Protease ย่อยสลายโปรตีน และ c) Lipase ย่อยสลายไขมัน

ที่มา <https://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/an-introduction-to-actinobacteria>

2. Protease

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โปรตีน (protein) ซึ่งเป็นพอลิเพปไทด์หรือพอลิเมอร์ของกรดอะมิโน (amino acid) ให้ได้เป็นเพปไทด์ที่สายสั้นลง ตัวอย่างของเอนไซม์โปรตีเอส เช่น เรนนิน (rennin), โบรมิเลน (bromelain) และปาเปน (papain) การใช้เอนไซม์โปรตีเอสในอาหาร เช่น การผลิตเบียร์ (beer) หลังจากการต้มข้าวมอลต์ (malt) ในเวอร์ต (wort) เบียร์จะมีลักษณะขุ่นเนื่องจากมีโปรตีน (protein) ของข้าวมอลต์ ที่ยังแขวนลอยอยู่ การใช้เอนไซม์ protease เพื่อย่อยสลายโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง ทำให้ละลายในน้ำได้ดีจะช่วยทำให้เบียร์ใสขึ้น นอกจากนี้ใช้ทำให้เนื้อนุ่ม (meat tenderizer) ใช้ตกตะกอนเคซีน (casein) ซึ่งเป็นโปรตีนนม (milk protein) เพื่อผลิตเนยแข็ง (cheese) โดย Genus ของแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่ *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes* และ *Streptosporangium* (Balachandran et al., 2012) แอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้จะมีลักษณะดังรูปที่ 2.9 (b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Lipase

เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้เป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) พบในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์ เอนไซม์ชนิดนี้ผลิตได้จากแบคทีเรีย (bacteria) รา (mold) เอนไซม์ lipase มีบทบาทสำคัญในอาหารทั้งในแง่โภชนา และการนำมาใช้ประโยชน์ดังนี้ ในอาหารประเภทน้ำมันและไขมันหรืออาหารที่มีปริมาณไขมันสูง ได้แก่ อาหารทอด เช่น บะหมี่สำเร็จรูป เมื่อโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ lipase จะได้กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมเสียของอาหาร (food spoilage) ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องคือ ลิพิดออกซิเดชัน (lipid oxidation) ทำให้อาหารเกิดกลิ่นผิดปกติ (off-flavor) ที่เรียกว่ากลิ่นหืน (rancidity) ใช้เพื่อเร่งปฏิกิริยา interesterification ในการปรับโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ เพื่อให้ได้ structure triglyceride ชนิดใหม่ แอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่ *Streptomyces exfoliates* LP10 (Magda et al., 2011) แอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนใน อาหารเลี้ยงเชื้อได้จะมีลักษณะดังรูปที่ 2.9 (c)

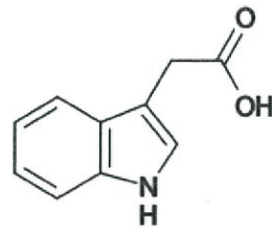
นอกจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่สามารถนำไปใช้ได้อุตสาหกรรมต่างๆแล้ว แอคติโนมัยซีทยังสามารถผลิตสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้อีกด้วย เช่น indole acetic acid (IAA), siderophores เป็นต้น (Himaman et al., 2016)

4. Siderophores

ไซเดอโรฟออร์ (Siderophore) เป็นสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิ ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับธาตุเหล็กสูง มักจะสร้างโดยราและแบคทีเรียในสภาวะที่ขาดแคลนหรือไม่มีธาตุเหล็ก และปล่อยไซเดอโรฟออร์ออกมา นอกเซลล์ โดยไซเดอโรฟออร์จะไปแย่งจับเหล็กของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เพื่อแย่งเอาเหล็กที่จับได้ไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นผลจากการขาดธาตุเหล็กอาจทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากเหล็ก (Fe) เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นในการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ การถ่ายทอดอิเล็กตรอน ตลอดจนการสังเคราะห์ RNA และ DNA (Ahmed and Holmström, 2014)

5. Indole acetic acid (IAA)

IAA หรือ ออกซิน จัดเป็นฮอร์โมนพืช (Ahmad et al., 2004) พืชจะสังเคราะห์ออกซินบริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและปลายราก ใบอ่อน ดอกและผล พบมากที่บริเวณ coleoptile และ embryo รวมทั้งใบที่กำลังเจริญเติบโตด้วย จากส่วนยอดของพืชที่มีการสังเคราะห์ออกซิน ออกซินจะเคลื่อนย้ายไปสู่ส่วนอื่นๆ และมีผลต่อการกระตุ้นการเติบโตของเนื้อเยื่อที่ได้รับสารออกซิน (กนกวรรณ, 2554) โครงสร้างของออกซินมีโครงสร้างดังรูปที่ 2.10



Indole-3-Acetic Acid
(an Auxin)

รูปที่ 2.10 โครงสร้างออกซิน หรือ Indole acetic acid (IAA)

ที่มา http://wildflowerfinder.org.uk/Menu2/Miscellaneous/Miscellaneous_Info/Poisonous_Info.htm

2.8 แหล่งที่อยู่อาศัยของแอกติโนไมซีท

แอกติโนไมซีทสามารถเจริญได้หลายสภาพที่อยู่อาศัยทำให้ต้องมีการปรับสภาพเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมนั้นเพื่อที่จะดำรงชีวิตต่อไปได้ (Xu *et al.*, 2011)

2.8.1 Terrestrial Environment

ดินยังคงเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่สำคัญของแอกติโนไมซีท มีหลากหลายงานวิจัยที่คัดแยกเชื้อ *Streptomyces* ที่อาศัยอยู่ในดินและสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ แหล่งของดินที่ทำการศึกษา เช่น ดินป่าพรุ ดินทราย ดินร่วนปนทราย ดินที่อยู่บริเวณรากของต้นไม้ แอกติโนไมซีทจำเป็นที่จะต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ เพื่อที่จะดำรงชีวิตต่อไปได้ ระบบนิเวศแบบบนพื้นดินนี้จะใช้ลักษณะเด่นของพืชเป็นหลักแบ่งซึ่งขึ้นกับปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ อุณหภูมิและปริมาณน้ำฝน ซึ่งปัจจัยสองข้อนี้ทำให้พืชพรรณมีลักษณะแตกต่างกัน (มุกดา, 2544) ระบบนิเวศบนบกประกอบไปด้วย

1. ระบบนิเวศป่าไม้ (Forest Ecosystem) เป็นระบบนิเวศที่พื้นที่ส่วนใหญ่ปกคลุมไปด้วยป่าไม้ สามารถแบ่งย่อยออกไปได้ดังนี้

1) ระบบนิเวศป่าไม้เขตร้อน ได้แก่ ระบบนิเวศป่าเบญจพรรณ, ป่าเต็งรัง, ป่าดิบชื้น, ป่าดิบแล้ง, ป่าดิบเขา เป็นต้น

2) ระบบนิเวศป่าไม้เขตอบอุ่น ได้แก่ ระบบนิเวศป่าผลัดใบเขตอบอุ่น และป่าเมดิเตอร์เรเนียน

3) ระบบนิเวศป่าไม้เขตหนาว ได้แก่ ระบบนิเวศป่าสน

4) ระบบนิเวศป่าชายฝั่ง ได้แก่ ป่าชายเลน, ป่าชายหาด, ป่าชายหาดหิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ระบบนิเวศทุ่งหญ้า (Grassland Ecosystem) เป็นระบบนิเวศที่มีพืชตระกูลหญ้า เป็นพืชเด่น แบ่งได้ดังนี้

- 1) ระบบนิเวศทุ่งหญ้าเขตร้อน ได้แก่ ระบบนิเวศทุ่งหญ้าซาวันนา
- 2) ระบบนิเวศทุ่งหญ้าเขตอบอุ่น ได้แก่ ระบบนิเวศทุ่งหญ้าแพรรี
- 3) ระบบนิเวศทุ่งหญ้าเขตหนาว ได้แก่ ทุ่งหญ้าทุนดรา

3. ระบบนิเวศทะเลทราย (Desert Ecosystem) เป็นพื้นที่ที่มีปริมาณฝนตกน้อยกว่า ปริมาณการระเหยน้ำ แต่บางพื้นที่อาจมีฝนตกบ้างเล็กน้อยก็จะมีหญ้าเขตแห้งแล้งงอกงามได้ ได้แก่

- 1) ระบบนิเวศทะเลทรายเขตร้อน ทะเลทรายเขตอบอุ่น
- 2) ระบบนิเวศทุ่งหญ้างึ่งทะเลทรายเขตร้อน ทุ่งหญ้างึ่งทะเลทรายเขตร้อน

2.8.2 Aquatic Environment

ระบบนิเวศแบบทะเล แอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมนี้บางครั้งถูกชะมาจากดิน ระบบนิเวศแบบทะเลแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (วิลญา, 2541) ได้แก่

1. Freshwater

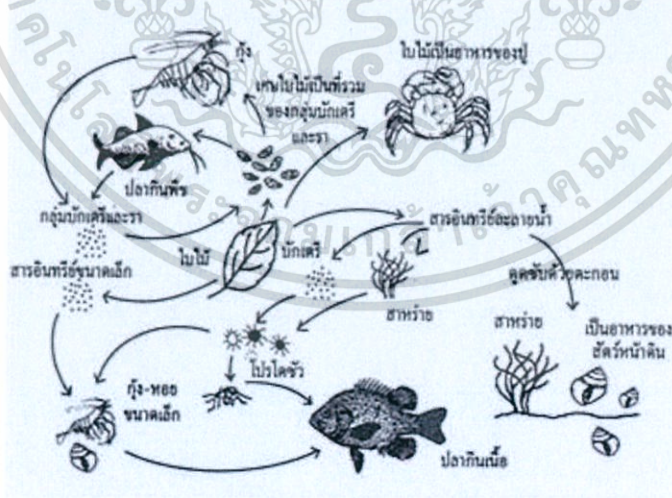
เป็นระบบนิเวศในแหล่งน้ำจืดมีทั้งที่เป็นแบบแหล่งน้ำนิ่ง ได้แก่ อ่างเก็บน้ำ ทะเลสาบ หนอง บึง หรือสระน้ำ เป็นต้น และแหล่งน้ำไหลซึ่งได้แก่ แม่น้ำ ลำคลอง ลำธาร เป็นต้น โดยระบบนิเวศน้ำจืด จะมีสิ่งมีชีวิตที่เป็นองค์ประกอบของระบบนิเวศแตกต่างกันไปตามระดับความลึกของแหล่งน้ำ และอัตราการไหลของกระแส น้ำ แอคติโนมัยซีทบางชนิดถูกพบได้ในบริเวณแหล่งน้ำจืด เช่น *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* และ *Streptomyces*

2. Marine

แอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนี้เป็นที่น่าสนใจว่าจะสามารถสร้างสาร metabolite ใหม่ ๆ ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้ แอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศน้ำจืดเป็นที่ต้องปรับตัวให้อยู่กับสภาพแบบไม่มีอากาศที่พื้นผิวได้เหมาะสม และต้องสามารถที่จะปรับตัวให้อาศัยอยู่ในทะเลลึก ที่มีอุณหภูมิ 0-8 องศาเซลเซียสได้ แอคติโนมัยซีทสกุลแรกที่พบได้ทั้งทะเล คือ *Rhodococcus marinonascene*

2.9 ป่าชายเลน

ระบบนิเวศในป่าชายเลนมักมีความสัมพันธ์กันอย่างซับซ้อน ทั้งแง่มุมในการหมุนเวียนของแร่ธาตุอาหารและการถ่ายทอดพลังงาน ห่วงโซ่อาหารในป่าชายเลนมีการถ่ายทอดพลังงานและอาหาร เช่นเดียวกับระบบนิเวศอื่นคือ มีการถ่ายทอดไปตามลำดับขั้นของการกินอาหารภายในระบบนิเวศกล่าวโดยผู้บริโภคได้รับพลังงานจากผู้ผลิตโดยการกินต่อกันเป็นทอดๆ (Hui, 2012) ดังรูปที่ 2.11 ขบวนการนี้มีความสำคัญมากต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากอาหารที่ถูกกินเข้าไปจะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ รวมทั้งกระบวนการทำงานต่างๆ ของร่างกาย การถ่ายทอดพลังงานที่ได้จากอาหารจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปยังสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ในการถ่ายทอดพลังงานและอาหารจากผู้ผลิตไปยังผู้บริโภคจะไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากพลังงานบางส่วนจะถูกนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ ในการดำรงชีวิต ทำให้มีพลังงานเพียง 10% เท่านั้นที่ถูกส่งต่อไปยังสิ่งมีชีวิตหรือผู้บริโภคที่อยู่ระดับสูงสุด เมื่อมีห่วงโซ่อาหารหลายๆห่วงโซ่อาหารก็จะเกิดเป็นสายใยอาหารขึ้นในธรรมชาติการถ่ายทอดพลังงาน และสารอาหารจะไม่เป็นสายตรงเสมอไป เพราะสิ่งมีชีวิตหนึ่งอาจกินอาหารได้หลายชนิด และขณะเดียวกันอาจตกเป็นเหยื่อของผู้ล่าชนิดอื่นๆอีกหลายชนิดเช่นกัน ดังนั้นห่วงโซ่อาหารของแต่ละระบบนิเวศจึงมีความสัมพันธ์กันโดยมีการกินข้ามห่วงโซ่อาหาร การถ่ายทอดพลังงานจึงมีความซับซ้อนมากขึ้นและสัมพันธ์เกี่ยวโยงไปมาหลายห่วงโซ่อาหาร ความสัมพันธ์ในลักษณะการกินที่เกี่ยวข้องกันและความซับซ้อนนี้เรียกว่า สายใยอาหาร (Food Web) หรือข่ายใยอาหาร สายใยอาหารประกอบด้วยห่วงโซ่อาหารหลายสายเชื่อมโยงกัน แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตในชุมชนที่มีต่อกันอย่างในหลากหลายรูปแบบ (พิพิธภัณฑสถาน 50 พรรษา, 2560)



รูปที่ 2.11 ห่วงโซ่อาหารที่ซับซ้อน

ที่มา <http://auimaneeakan.blogspot.com/2013/07/v-behaviorurldefaultvml.o.htm>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป่าชายเลนจัดเป็นระบบนิเวศป่าชายฝั่งที่มีความสำคัญ นอกจากเป็นแหล่งที่ใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำแล้ว ป่าชายเลนยังเป็นบริเวณที่พบแอกติโนไมซีที่ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะใหม่ๆ และเนื่องจากว่าระบบนิเวศแบบป่าชายเลนเป็นบริเวณที่น้ำจืดและน้ำเค็มมาบรรจบกัน (Kelvin et al., 2001) ทำให้มีความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตมาก สภาพแวดล้อมโดยทั่วไปของป่าชายเลนมีความแตกต่างออกไปอย่างมากจากป่าชนิดอื่น โดยเฉพาะดิน ดินในป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์สูงจากธาตุอาหารที่มาจากกรัดเซาะตามชายฝั่งและแหล่งน้ำลำธาร สารอินทรีย์จากซากพืชซากสัตว์ในบริเวณป่าชายเลนเอง โดยเฉพาะใบไม้ที่ร่วงหล่นทับถมกันเป็นจำนวนมากแหล่งค่อนพืชและสาหร่าย น้ำบริเวณนี้มีความเค็มค่อนข้างต่ำ ระดับความเค็มของน้ำเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาตามระดับน้ำที่ขึ้นลงและปริมาณน้ำจืดไหลมาจากแม่น้ำลำคลอง สัตว์ต่างๆที่อาศัยอยู่ในป่าชายเลน ต่างก็ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมที่ต่างไปจากสัตว์ในป่าบกทั่วไปเช่นกัน โดยเฉพาะสัตว์ที่อาศัยอยู่ตามพื้นป่า ซึ่งอาศัยคืบคลานหรือเกาะหรือขุดรูอยู่ตามพื้นดิน รวมทั้งชนิดที่อาศัยอยู่ในน้ำจะต้องมีการปรับตัวอย่างมากเพื่อการอยู่รอด เนื่องจากต้องประสบกับสภาวะต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงอยู่เป็นประจำหรือต้องอยู่ในสภาพไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตโดยทั่วไป เช่น สภาวะที่ทำให้มีการสูญเสียน้ำออกจากลำตัว สภาพอุณหภูมิสูง สภาพที่มีปริมาณออกซิเจนค่อนข้างต่ำของดินเลน และการเปลี่ยนแปลงความเค็มของกระแสน้ำ (ภุริภัทร, 2548) เป็นต้น

2.9.1 ป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร

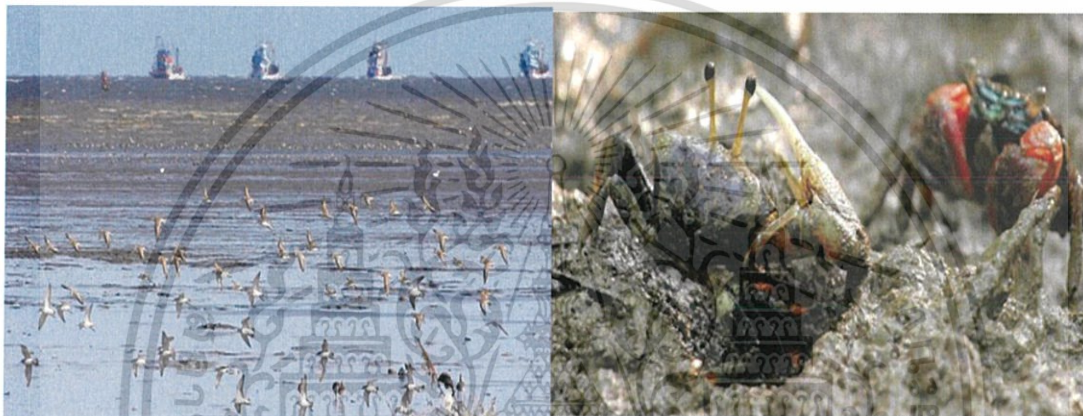
ศูนย์วิจัยป่าชายเลนสมุทรสาคร เป็นศูนย์ที่ดูแลผืนป่าชายเลนของสมุทรสาครซึ่งเป็นป่าสงวนแห่งชาติซึ่งเรียกกันว่า ป่าชายเลนอ่าวมหาชัย โดยมีอยู่สองฝั่งคือฝั่งตะวันตกและฝั่งตะวันออก คั่นกลางด้วยแม่น้ำท่าจีน ป่าชายเลนอ่าวมหาชัยเป็นพื้นที่ที่อยู่ในบริเวณน้ำกร่อยของปากแม่น้ำท่าจีน โดยมีอิทธิพลของกระแสน้ำทะเลที่นำเอาโคลนเลนมาทับถมทำให้เกิดหาดเลนยาวตลอดแนวชายฝั่ง จึงเกิดสภาพเป็นป่าชายเลน มีความอุดมสมบูรณ์และความหลากหลายทางชีวภาพ (สถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 5 สมุทรสาคร, 2559)



รูปที่ 2.12 ป่าชายเลนบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากพื้นที่แคว้นนี้เป็นหาดเลนซึ่งเป็นแหล่งสะสมของตะกอนดินที่อุดมไปด้วยธาตุอาหารไหลปะปนมากับกระแสน้ำก่อให้เกิดเป็นระบบนิเวศของหาดเลนปากแม่น้ำ เราสามารถเห็นนกประจำถิ่นได้แก่ นกยางเปีย นกตีนเทียน นกยางเขียว นกยางกรอกพันธุ์ชวา เหยี่ยวแดง และและนกชายเลนอพยพช่วงฤดูหนาว ส่วนใหญ่เป็นนกที่อพยพมาจากทางตอนเหนือของทวีปเอเชีย ไม่น้อยกว่า 20 ชนิด เช่น นกทะเลขาเขียวลายจุด นกชายเลนปากแอม่น นกอีโก้ยใหญ่ นกอีโก้ยเล็ก นกทะเลขาเขียว นกหัวโตหลังจุดสีทอง นกนางนวลแกลบเคราขาว นกนางนวลแกลบปากหนา นกน้อทเล็ก นกซ่อมทะเลอกแดง นกปากแอม่นหางดำ นกทะเลขาแดงธรรมดา นกหัวโตทรายเล็ก นกชายเลนปากโค้ง



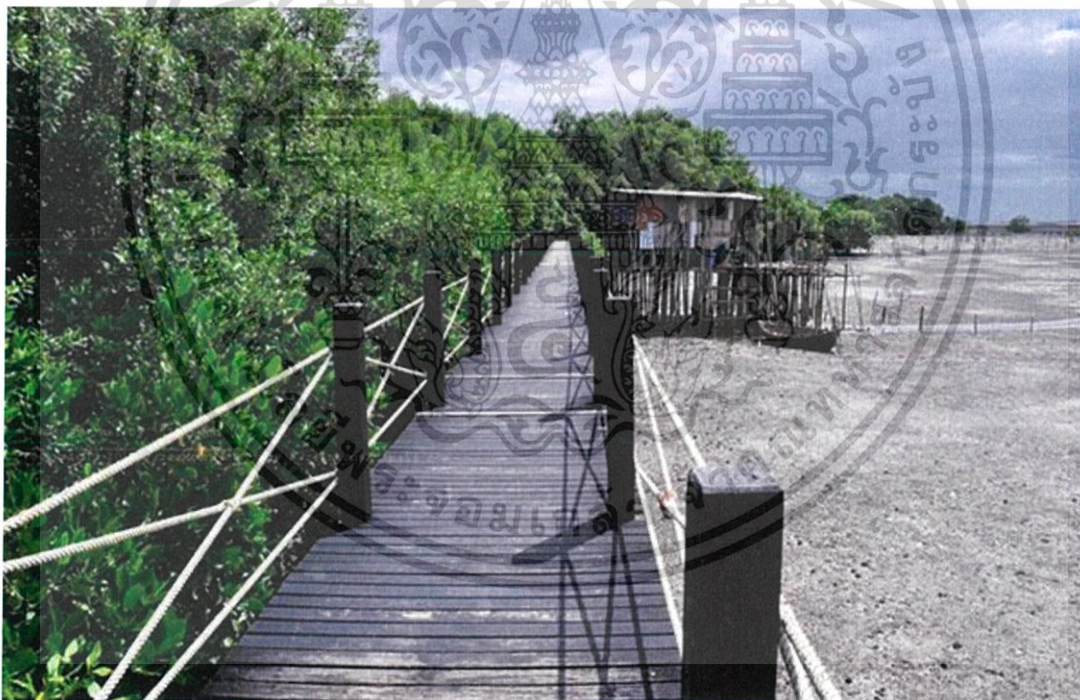
รูปที่ 2.13 ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่ป่าชายเลนบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร
ที่มา <http://www.zthailand.com/place/ao-maha-chai-mangrove-forest-natural-education-centre-samut-sakhon>

สิ่งมีชีวิตที่จะพบเห็นได้มาก ได้แก่ ปูก้ามดาบ (Fiddle Crab) หรือที่เรียกว่า บู่เปียว หรือบู่ผู้แทน มีขนาดเล็ก ขอบกระดองส่วนหน้าแคบ ก้านตายาว ตัวผู้จะมีก้ามใหญ่ที่ข้างหนึ่งซึ่งจะเป็นช้ำหรือขาาก็ได้ เอาไว้สู้แสดงอาณาเขตและเรียกร้องความสนใจจากตัวเมีย ปูก้ามดาบนี้สามารถรู้กำหนดเวลาน้ำขึ้นน้ำลงได้ โดยมันจะออกจากรูซ้ำเร็ว รวดๆ 2 ชั่วโมง ปูก้ามดาบเป็นมีชีวิตที่มีความสำคัญกับนิเวศวิทยาแห่งนี้ (พัฒนวรรณ และคณะ, 2555) นอกจากนั้นยังพบปลาตีน (Mudskipper) หรือที่เรียกกันอีกชื่อว่า ปลาจุมพรวด ปลากระจัง ปลาตัจัง หรือ ปลาพรวด เป็นปลากระดูกแข็ง มีเกล็ดปกคลุม ตามตัวมีจุดวาวๆ มีสีเขียวมรกต ชอบขุดรูอยู่ตามป่าชายเลนและปากอ่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 ป่าชายเลนตำบลบางเสม็ด จังหวัดชลบุรี

จากลักษณะทางภูมิประเทศที่เป็นชายฝั่งทะเล ชลบุรีจึงเป็นจังหวัดหนึ่งซึ่งในอดีตเคยมีพื้นที่เป็นป่าชายเลนมากแห่งหนึ่งของประเทศไทย แต่ปัจจุบันแทบจะไม่หลงเหลือให้เห็นมากนัก เนื่องจากถูกทำลายจากคนที่อยู่อาศัย ทั้งทั้งขยะลงทะเล และการปล่อยน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรม โดยไม่คำนึงถึงธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมที่มีความอุดมสมบูรณ์ของป่าชายเลนในอดีต ซึ่งมีความสำคัญมาก จังหวัดชลบุรีจึงได้จัดทำยุทธศาสตร์การฟื้นฟูและอนุรักษ์พื้นที่ป่าชายเลน และก่อตั้งศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศจังหวัดชลบุรีขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2544 เพื่อเป็นการอนุรักษ์และเพื่อให้ชาวชลบุรีและนักท่องเที่ยวได้มีโอกาสสัมผัสและศึกษาธรรมชาติของป่าชายเลนได้จากสถานที่จริงอย่างใกล้ชิด และถือได้ว่าเป็นการส่งเสริมการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ ตามแผนแม่บทของการพัฒนาการท่องเที่ยวของประเทศ พ.ศ. 2541-2546 ซึ่งสอดคล้องกับแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 ด้านการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (ศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี, 2560)



รูปที่ 2.14 ป่าชายเลนตำบลบางเสม็ด จังหวัดชลบุรี

ที่มา <http://www.chumchonburi.com/buri/node/1300>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี ตั้งอยู่ที่ หมู่ 3 ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เป็นผืนป่าชายเลนที่สมบูรณ์ที่สุดและผืนสุดท้ายของชลบุรี มีเนื้อที่ 300 ไร่ เปิดดำเนินการโดยความร่วมมือของกรมป่าไม้และองค์การบริหารส่วนจังหวัดชลบุรี สำนักงานป่าไม้จังหวัดได้จัดตั้งศูนย์ฯขึ้นเพื่ออนุรักษ์ป่าชายเลน และให้เป็นแหล่งเรียนรู้แก่ประชาชน มีเส้นทางศึกษาธรรมชาติเป็นสะพานไม้ที่ยาว 2,300 เมตร ซึ่งยาวที่สุดในประเทศไทย (ทั่วร้อนไทย, 2560) ตลอดเส้นทางความยาว 2,300 เมตร บนสะพานทางเดินศึกษาธรรมชาติของศูนย์ฯจะได้พบเห็น ความหลากหลายทางธรรมชาติของป่าชายเลน ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ไม้ป่าชายเลนและสัตว์น้ำหลากหลายชนิด ระหว่างทางจะมีศาลาชมวิวพาได้น้ำ สะพานแขวน และมีบอร์ดให้ความรู้เกี่ยวกับป่าชายเลนเป็นระยะๆ ศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลนแห่งนี้ อุดมไปด้วยพันธุ์ไม้ป่าชายเลนหลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น โกงกางใบใหญ่ โกงกางใบเล็ก ตะบูนดำ ตะบูนขาว แสมดำ แสมขาว โปรงแดง โปรงขาว ลำพู และพืชอีก หลายชนิด นอกจากนี้ ยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยและเพาะพันธุ์สัตว์น้ำอีกหลากหลายชนิด ได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย หอยนางรม หอยแครง ปูก้ามดาบ ปูแสม ปลานวลจันทร์ ปลากระพงขาว ปลาดิน และนกอีก นานาชนิด



รูปที่ 2.15 ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่ป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี

ที่มา <http://www.manager.co.th/travel/viewnews.aspx?NewsID=9570000010636>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.3 ป่าชายเลนตำบลคลองสอง จังหวัดฉะเชิงเทรา

ป่าชายเลนตำบลคลองสองคลอง เดิมเกิดจากคลอง 2 สาย สายหนึ่งเป็นคลองน้ำเค็ม ซึ่งมีพื้นที่ติดกับทะเลด้านอ่าวไทย อีกสายหนึ่งเป็นคลองน้ำจืด ลักษณะภูมิประเทศบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง เป็นที่ราบลุ่มแม่น้ำและที่ราบลุ่มชายฝั่งทะเลเกิดจากการทับถมของดินตะกอนแม่น้ำบางปะกง และจากทะเล สภาพโดยทั่วไปของพื้นที่ปากแม่น้ำบางปะกงมีคลองน้อยใหญ่กระจายอยู่ทั่วไปมากกว่า 40 คลอง และมีสภาพเป็นป่าชายเลน ถึง 1 ใน 3 ของพื้นที่ทั้งหมด ตลอดแนวชายฝั่งคือป่าชายเลนที่ยังคงสภาพสมบูรณ์พื้นที่ติดทะเลทำให้เมืองนี้ได้รับอิทธิพลจากลมบกและลมทะเลอย่างเต็มที่ และด้วยลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือและตะวันตกเฉียงใต้ ฉะเชิงเทราจึงชุ่มชื้นด้วยฝนที่ตกต้องตามฤดูกาล ชนิดพรรณไม้ที่พบและเป็นตัวแทนป่าชายเลนบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง ได้แก่ จาก แสมขาว แสมดำ ปอทะเล โกงกางใบเล็ก ตะบูนขาว โกงกางใบใหญ่และลำพู พบพรรณไม้น้ำที่มีความสำคัญต่อทรัพยากรประมง โดยพบพรรณไม้น้ำรวม 35 ชนิด สาหร่าย 2 ชนิด ทรัพยากรประมงในระบบนิเวศน้ำกร่อยแม่น้ำบางปะกง พบพันธุ์ปลารวม 170 ชนิด ใน 53 วงศ์ ปลากลุ่มใหญ่ที่พบในบริเวณนี้ที่เป็นปลาน้ำจืด คือวงศ์ *Cyprinidae* ปลากลุ่มเด่นอื่นที่พบ ได้แก่ กลุ่มปลาบู๋ พบปลาที่อยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มสูญพันธุ์ 5 ชนิด คือ ปลาหงอนไก่ ปลาม้าน้ำ ปลากะพงขี้เซา ปลากระทิงไฟ และปลากีบเป้าสกุล *Chonerhinus* ทรัพยากรกุ้งเป็นทรัพยากรเป้าหมายทางการประมงในบริเวณนี้ที่สำคัญ ได้แก่ กุ้งก้ามกราม กุ้งหัวมัน กุ้งตะกาด กุ้งแชบ๊วย และเคยตาดำ

นอกจากนี้ยังพบ โลมาอิรวดี ซึ่งโลมาอิรวดีได้รับการจัดให้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองลำดับที่ 138 (สัตว์ป่าคุ้มครองเป็นสัตว์ป่าที่เกิดในธรรมชาติและมีรายชื่ออยู่ในประกาศคณะรัฐมนตรีให้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ห้ามล่า ห้ามครอบครอง หรือห้ามเพาะพันธุ์ เว้นแต่จะได้รับอนุญาต) (ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2560)



รูปที่ 2.16 โลมาอิรวดีที่พบที่ปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา

ที่มา <http://www.mcrc-upper.go.th/?p=817>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

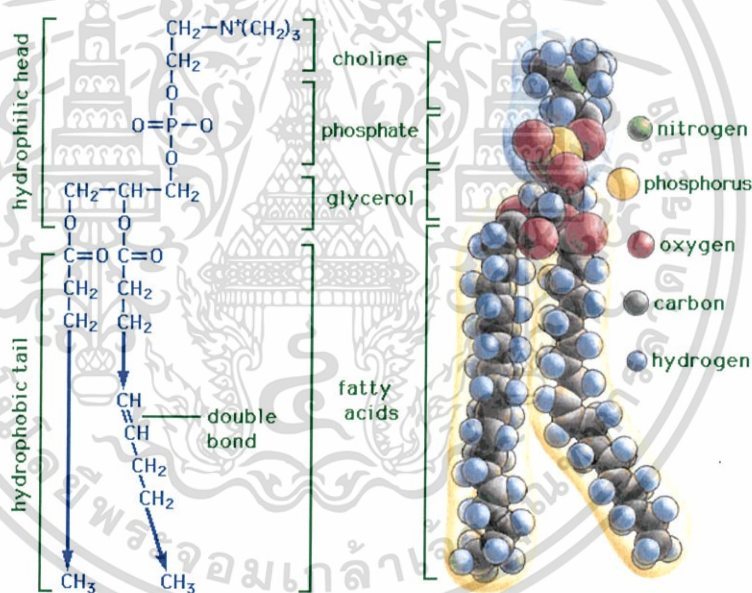
ในปัจจุบันปัญหาเชื้อดื้อยาทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ถูกวิธี ตลอดจนสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปเอื้อประโยชน์ทำให้จุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะจะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายทางทรัพย์สิน และเศรษฐกิจแนวทางการแก้ปัญหาอย่างหนึ่งคือ การเร่งหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ และมีความหลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งป่าชายเลน (จิตติ, 2553)

เชื้อในกลุ่มแอกติโนมัยซีทเป็นกลุ่มเชื้อที่น่าสนใจ เพราะมีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะยา จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด 22,500 ชนิด สังเคราะห์โดยเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 10,100 ชนิด และถูกสังเคราะห์โดยเชื้อใน order *Actinomycetales* และมีการคาดการณ์ว่า 7,630 ชนิด ถูกสร้างขึ้นจากเชื้อในจีนัส *Streptomyces* ซึ่งสารส่วนใหญ่จะเป็นยาปฏิชีวนะ (Berdy, 1995) ซึ่งในความเป็นจริงอาจมีสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สร้างโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ที่ยังไม่ถูกค้นพบอีกมากมาย ยาปฏิชีวนะมากกว่า 60 ชนิด ที่ผลิตโดยเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* ที่สามารถนำมาผลิตและประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่มีขายในท้องตลาดทั้งยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราหลายชนิดที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายและเป็นยาที่ผลิตจากเชื้อใน genus *Streptomyces* ยกตัวอย่างเช่น streptomycin, spectinomycin, neomycin, tetracycline, chlorotetracycline, erythromycin, clindamycin, nystatin, amphotericin B และ chloramphenicol เป็นต้น ซึ่ง genomes ของ *Streptomyces* จะมีขนาดใหญ่ 8 Mb หรือใหญ่กว่านี้ และ genome ของ *Streptomyces* จะเป็น linear ขณะที่ genome ของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นแบบปลายปิด (circular) และยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะมักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มของยีน (Cluster) และเป็นยีนที่มี G+C content สูงมาก 68-78% ซึ่งทำให้งานด้าน gene cloning ทำได้ยากกว่าเชื้อทั่วไป (วัฒนาลัย, 2550)

และยังมีงานวิจัยของ Azman *et al.*, (2015) ที่รายงานว่าระบบนิเวศแบบป่าชายเลนมีความหลากหลายของพันธุ์พืชและสัตว์มาก เป็นแหล่งที่พบแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะใหม่ๆ ที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาได้

2.10 ฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมายซีทและแบคทีเรียทั่วไป

โครงสร้างโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดจะเห็นว่าโมเลกุลมีส่วนของกรดไขมันที่มีลักษณะคล้ายหางสองหางมีคุณสมบัติแบบไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) คือ ไม่รวมตัวกับน้ำและส่วนที่มีหมู่ฟอสเฟตมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนมีคุณสมบัติแบบไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) คือ ชอบอยู่กับน้ำ เราเรียกคุณสมบัติของโมเลกุลที่มีลักษณะแบบนี้ว่า แอมฟิพาธิก (amphipathic) จากคุณสมบัติดังกล่าวหากเรานำฟอสโฟลิปิดใส่ลงในน้ำ โมเลกุลของฟอสโฟลิปิดจะเรียงตัวกันเป็นสองชั้น โดยหันส่วนหางที่ไม่รวมตัวกับน้ำเข้าหากันและหันส่วนหัวที่ชอบน้ำ เข้าหาส่วนที่เป็นน้ำทั้งสองด้านเราเรียกโครงสร้างลักษณะนี้ว่า ลิพิดไบเลเยอร์ (lipid bilayer) ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของเยื่อหุ้มเซลล์อันเกิดจากการเรียงตัวของโมเลกุลฟอสโฟลิปิด (พงชัย, 2555)



รูปที่ 2.17 โครงสร้างทั่วไปของ phospholipid

ที่มา <http://www.madsci.org/posts/archives/2006-12/1164999854.Bc.r.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phospholipid เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อการเลือกผ่านของเนื้อเยื่อและรูปร่างของเนื้อเยื่อ phospholipid แสดงถึงลักษณะของแอมฟิพาติก (amphipatic) เนื่องจากมีทั้งบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ และบริเวณที่ชอบน้ำในโมเลกุล มีนอกจากนี้ phospholipid มีความสำคัญในการจำแนกแอสโตไซโทไมยซีทในระดับสกุล แบ่งเป็น 5 รูปแบบ (ลลิตา, 2554) ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงชนิดของ Phospholipid ที่พบในแอสโตไซโทไมยซีท (ลลิตา, 2554)

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

หมายเหตุ v, variable; +, present; -, absent ; PIM, phosphatidylinositolmannosides; PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PME, phosphatidylmethylethanolamine; GluNu, unknown glucosamine containing phospholipids; APG, acyl phosphatidylglycerol และ DPG, diphosphatidylglycerol

แบคทีเรียสามารถสร้างกรดไขมันที่มีฟอสโฟลิปิดที่จะทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหรือสารประกอบภายในเยื่อหุ้มเซลล์ หลายชนิดสังเคราะห์โมเลกุลเยื่อหุ้มเซลล์ใหม่ เช่น การตอบสนองต่อเปปไทด์ที่ต้านจุลชีพ การสังเคราะห์แตกต่างกันไปโดยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบฟอสโฟลิปิด (Sandoval-Calderón *et al.*, 2015) ส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดนั้นมีความหลากหลายโดยมีการแบ่งประเภทของส่วนหัวฟอสโฟลิปิดโดยการสังเคราะห์กลุ่ม phospholipid จะถูกสังเคราะห์โดยแบคทีเรียเพื่อสร้างประจุ

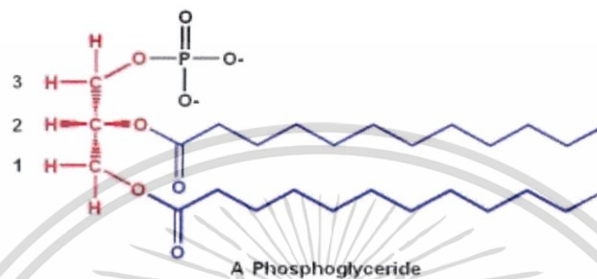
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนพื้นผิวสำหรับเยื่อหุ้มเซลล์ ประจุของ zwitterionic ส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดต้องสมดุลกับกลุ่มที่เป็นกรด เช่น phosphatidylglycerol ความสมดุลประจุไฟฟ้าสถิตนี้เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับเยื่อหุ้มโปรตีนหลายตัวเพื่อใช้โครงสร้างที่ถูกต้องในเยื่อหุ้มของเซลล์ ส่วนเยื่อหุ้มฟอสโฟลิปิดมีความสำคัญต่อการเพิ่มความแข็งแรงที่เกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิลดลง คือ ไขมันบริเวณเยื่อหุ้มฟอสโฟลิปิดเป็นของเหลวแต่แข็งตัวขึ้นเมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของเยื่อหุ้ม ความลื่นของเยื่อหุ้มฟอสโฟลิปิดเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเคลื่อนที่และกิจกรรมของ โปรตีนเมมเบรนจึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่งต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิปรับเปลี่ยนในระหว่างการเจริญเติบโต (Parsons and Rock, 2013) กรดไขมันในแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นพวก straight-chain เช่น MUFAs กลุ่มหลักที่พบ ได้แก่ Oleic series หรือ Vaccenic series และกลุ่มกรดไขมันในแบคทีเรียที่ไม่เหมือนในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้แก่ b-OH, Cyclopropane และ Branchedchain ในแบคทีเรียบางชนิดจะอยู่ในรูป กรดไขมัน อิสระหรือในรูปของ glycerides แต่ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นโมเลกุลเริ่มจาก Phospholipids glycolipids จนถึง Lipoproteins กรดไขมันจากจุลินทรีย์มีทั้งในจุลินทรีย์กลุ่มโปรคาริโอตและจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอต ดังเช่น แบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย อะมีบา โปรโตซัว จุลสาหร่าย ตลอดจนจุลินทรีย์ต่างๆ ล้วนแล้วแต่มีกรดไขมันที่มีสายอะตอมคาร์บอนยาว มีความไม่อิ่มตัวสูงมีพันธะคู่หลายตำแหน่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ทั้งสิ้น โดยมีปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกันไปตามชนิดและแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์นั้นๆ (ณิชา และคณะ, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 ชนิดของฟอสโฟลิปิด

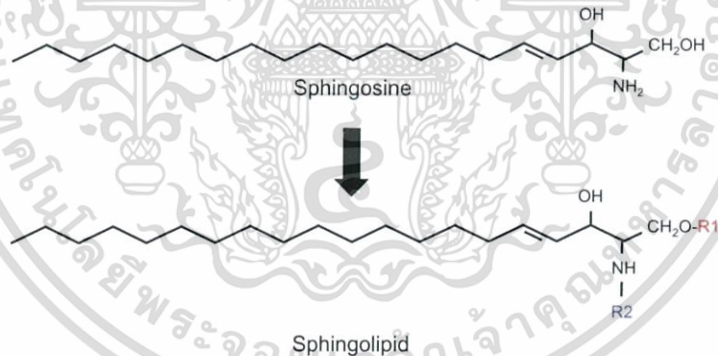
ฟอสโฟลิปิดเป็นสารที่พบมากในเยื่อหุ้มเซลล์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะโครงสร้าง ได้แก่ phosphoglycerides มีโครงสร้างเป็น phosphate ester ประกอบไปด้วยหมู่กลีเซอรอล เป็นอนุพันธ์ของ phosphatidic acid (วรสารณ์, 2544)



รูปที่ 2.18 โครงสร้างของ phosphoglyceride

ที่มา <http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture13/phosphoglyceride.jpg>

และฟอสโฟลิปิดชนิดอีกชนิด คือ sphingolipid เป็นส่วนประกอบของ myelin ซึ่งเป็นสารห่อหุ้มใยประสาทก็เป็น phospholipids ชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธ์ของ sphingosine (วรสารณ์, 2544)



รูปที่ 2.19 โครงสร้างของ sphingolipid

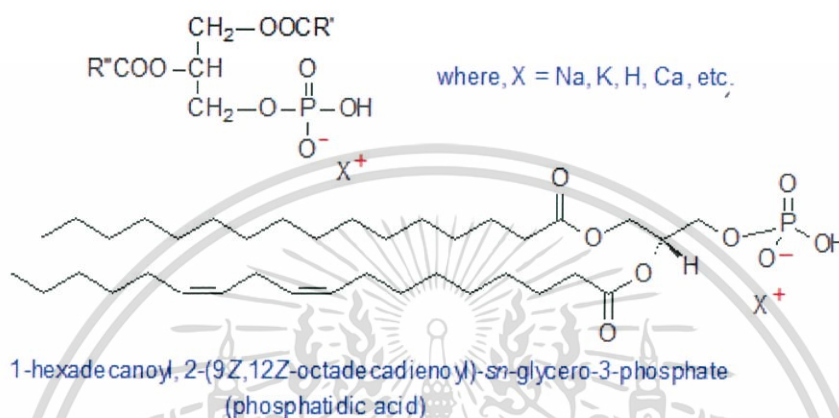
ที่มา https://www.researchgate.net/figure/264794709_fig1_Structure-of-sphingolipids-In-sphingolipids-the-hydrophobic-region-consists-of-a

ฟอสโฟลิปิดแบ่งออกได้เป็นหลายชนิดตามโครงสร้างของฟอสโฟลิปิด โดยฟอสโฟลิปิดที่พบได้
ในสิ่งมีชีวิตมีหลายชนิด ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.1 Phosphatidic acid

ฟอสโฟลิปิดชนิดนี้เป็น precursor ที่สำคัญ ในการสังเคราะห์ฟอสโฟลิปิดชนิดอื่นๆ ได้ เช่น Phosphatidylserine , phosphatidylethanolamine และ phosphatidylholine เป็นต้น (Karin and Daum, 1999)

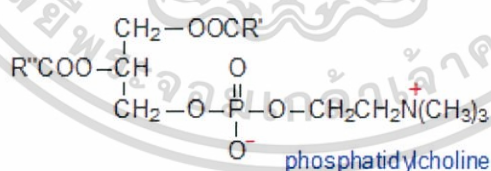


รูปที่ 2.20 โครงสร้างของ phosphatidic

ที่มา <http://aocs.files.cms-plus.com/LipidsLibrary/images/ImportedImages/lipidlibrary/Lipids/whatlip/Figure07.png>

2.11.2 Phosphatidylcholine

ฟอสโฟลิปิดชนิดนี้พบได้ทั่วไปในผนังเซลล์ของสัตว์ พบในพืชเป็นส่วนใหญ่ และพบได้น้อยในแบคทีเรีย (Alternative Medicine review, 2002)



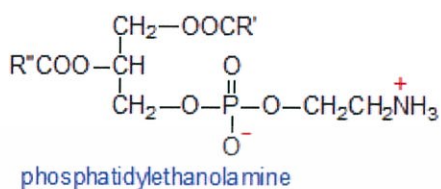
รูปที่ 2.21 โครงสร้างของ phosphatidylcholine

ที่มา <http://aocs.files.cms-plus.com/LipidsLibrary/images/ImportedImages/lipidlibrary/Lipids/whatlip/Figure11.png>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.3 Phosphatidylethanolamine

ฟอสโฟลิพิดชนิดนี้พบได้มากเป็นอันดับที่ 2 ในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ พบได้มากในพวกรูตินารี (Müllera *et al.*, 2012)

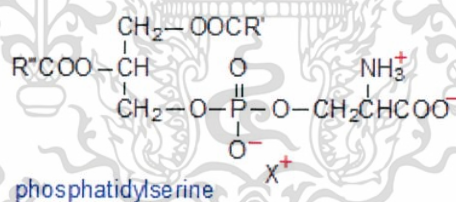


รูปที่ 2.22 โครงสร้างของ Phosphatidylethanolamine

ที่มา <http://aocs.files.cms-plus.com/LipidsLibrary/images/ImportedImages/lipidlibrary/Lipids/whatlip/Figure13.png>

2.11.4 Phosphatidylserine

ฟอสโฟลิพิดชนิดนี้พบได้ในเนื้อเยื่อของสัตว์ มีโครงสร้างคล้ายกับ phosphatidylethanolamine โดยไปแทนที่ ethanolamine ด้วยหมู่ของ serine (Kataoka *et al.*, 2010)



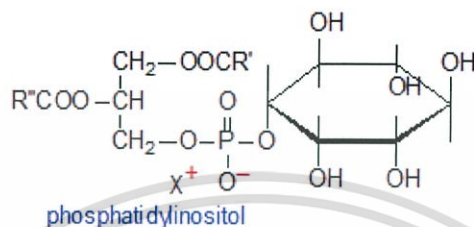
รูปที่ 2.23 โครงสร้างของ Phosphatidylserine

ที่มา <http://aocs.files.cms-plus.com/LipidsLibrary/images/ImportedImages/lipidlibrary/Lipids/whatlip/Figure14.png>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.5 Phosphatidylinositol

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

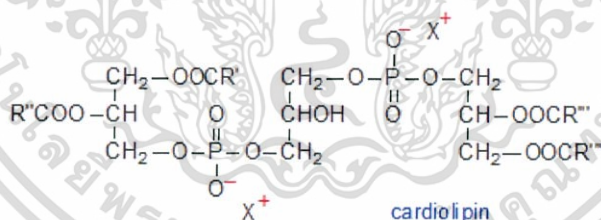


รูปที่ 2.24 โครงสร้างของ Phosphatidylinositol

ที่มา <http://aocs.files.cms-plus.com/LipidsLibrary/images/ImportedImages/lipidlibrary/Lipids/whatlip/Figure15.png>

2.11.6 Cardiolipin

ฟอสโฟลิปิดชนิดนี้พบได้มากในแอคติโนไมซีทเนื่องจากมีงานวิจัยพบว่า ฟอสโฟลิปิดชนิดนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการแตกแขนงกิ่งก้านสาขาของแอคติโนไมซีท หากแอคติโนไมซีทมีฟอสโฟลิปิดชนิดนี้มากก็จะสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้มากเช่นกัน (Sandoval-Calderón *et al.*, 2009)



รูปที่ 2.25 โครงสร้างของ cardiolipin

ที่มา <http://aocs.files.cms-plus.com/LipidsLibrary/images/ImportedImages/lipidlibrary/Lipids/whatlip/Figure09.png>

2.12 โครมาโทกราฟี

chromatography เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม การทำสารให้บริสุทธิ์ และยังใช้พิสูจน์สารเหล่านั้นได้ด้วย เนื่องจากโครมาโทกราฟีเกี่ยวข้องกับขบวนการกระจาย (distribution) ของสาร ระหว่าง 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคที่อยู่กับที่ (stationary phase) และวัฏภาคที่เคลื่อนที่ได้ (mobile phase) ในการแยกสารโดยวิธี chromatography จึงอาศัยหลักที่ว่าสารนั้นจะเคลื่อนที่ออกจากกันบน stationary phase เนื่องจากอิทธิพลของ mobile phase และเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วต่างกัน โดยสารที่ละลายได้ดีใน mobile phase และถูกดูดซับได้น้อยโดย stationary phase จะเคลื่อนที่ได้เร็ว (ธวัชชัย, 2551)

เราสามารถแบ่งโครมาโทกราฟีอย่างกว้างๆ ตามลักษณะของวัฏภาคที่เกี่ยวข้องได้เป็น 2 ลักษณะตาม (พิกุลทอง, 2560) คือ

1. Adsorption Chromatography ในกรณีนี้จะมี stationary phase ที่เป็นของแข็งซึ่งมักเรียกว่าตัวดูดซับ (adsorbent) เช่น อลูมินา หรือ ซิลิกาเจล ส่วน mobile phase อาจเป็นก๊าซหรือของเหลวก็ได้ การแยกเกิดเนื่องจากสารแต่ละชนิดถูกดูดซับไว้โดยตัวดูดซับในอัตราที่ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของตัวดูดซับ ตัวอย่างของโครมาโทกราฟีแบบนี้คือ Thin layer chromatography (TLC) และ Column chromatography (CC) ทั้งสองวิธีเป็นเทคนิคที่สามารถทดลองได้ง่ายและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงแต่อย่างใด

2. Partition chromatography ในกรณีนี้จะมี stationary phase เป็นของเหลวซึ่งจะถูกพองอยู่ด้วยของแข็งที่มีรูพรุน ตัวอย่างเช่น Paper chromatography ซึ่งมี stationary phase เป็นน้ำและถูกพองด้วย cellulose ในกระดาษ เป็นต้น ส่วน mobile phase อาจเป็นก๊าซหรือของเหลวก็ได้ ทั้งนี้การแยกจะเกิดจากความสามารถในการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดจาก stationary phase ไปยัง mobile phase ได้ในอัตราที่ต่างกัน นอกจาก Paper chromatography ซึ่งสามารถทำได้ง่ายแล้ว ยังมีเทคนิคทางโครมาโทกราฟีอื่นๆที่มีความละเอียดและประสิทธิภาพสูง แต่ต้องใช้เครื่องมือที่ค่อนข้างซับซ้อนและมีราคาแพง เช่น Gas-liquid chromatography (GC) และ Liquid-liquid chromatography (LC) จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วยเช่นกัน

2.12.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

Thin Layer Chromatography (โครมาโทกราฟีแผ่นบาง) เป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว และให้ผลดีสามารถใช้ได้กับสารเกือบทุกชนิด จึงเป็นที่นิยมใช้กันมาก โดยทั่วไปแล้วนิยมใช้ TLC ในการแยกสารพิษสูงชนิดของสาร และตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น โดยเฉพาะในกรณีที่สารเป็นสารระเหยยากหรือมีจำนวนน้อย นอกจากนี้ยังสามารถหาปริมาณของสารในสารผสมได้ด้วย (Bele and Khale, 2010) ลำดับขั้นในการทำ TLC มีดังนี้

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจก

แผ่นกระจกที่จะเคลือบด้วย silica gel หรือ aluminum นั้นจะต้องล้างด้วยผงซักฟอกก่อน แล้วจึงนำมาแช่ใน cleaning solution (เตรียมโดยใช้ $K_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$ 92 กรัม ละลายในน้ำ 458 มล. แล้วค่อยๆ เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 800 มล. ลงไปในสารละลายนี้) เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อกำจัดเอาคราบน้ำมันบนแผ่นกระจก ทดสอบว่าแผ่นกระจกยังมีคราบน้ำมันอยู่หรือไม่โดยนำไปจุ่มลงในน้ำกลั่น ถ้า น้ำเกาะบนแผ่นกระจกตลอดโดยที่ไม่แยกเกาะเป็นหยดๆ ก็แสดงว่าแผ่นกระจกนี้สะอาดแล้ว แต่ถ้าหากน้ำเกาะบนแผ่นกระจกเป็นหยดๆ แสดงว่าแผ่นกระจกนั้นยังมีคราบน้ำมันอยู่ จะต้องทำความสะอาดแผ่นกระจกนี้ใหม่จนกว่าจะสะอาดแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นและอบให้แห้งนำไปใช้ได้ (พิกุลทอง, 2560)

2. เตรียม Chromatoplate

สารที่ใช้ในการเคลือบแผ่นกระจก ได้แก่ silica gel และ alumina ซึ่งสารนี้จะทำหน้าที่เป็น adsorbent และความสามารถในการ adsorb สารนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำที่มีอยู่ใน silica gel และ alumina ถ้ามีน้ำอยู่มากจะทำให้ความสามารถในการ absorb สารน้อยลง (Fried and Sherma, 1999) การเคลือบแผ่นกระจกทำได้ 2 วิธี คือ

1) **Dipping** เป็นการเตรียมแผ่น chromatoplate โดยการจุ่มแผ่นกระจกลงใน slurry ของ silica gel วิธีนี้เหมาะสำหรับการเตรียม chromatoplate ขนาดเล็กเท่านั้น

2) **Spreading** เป็นการเตรียม chromatoplate โดยการ spread slurry ของ silica gel ในน้ำลงบนแผ่นกระจก วิธีนี้นิยมใช้เตรียม chromatoplate จำนวนมาก

การเตรียม chromatoplate ทั้งสองวิธีล้วนมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน คือ การเตรียม chromatoplate โดยวิธี dipping นั้น ทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว แต่ความหนาของ chromatoplate อาจจะไม่เท่ากัน ส่วนวิธี spreading จะต้องทำหลายครั้งเพื่อให้ได้แผ่น chromatoplate ที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงเสียเวลานาน แต่วิธีนี้จะได้แผ่น chromatoplate ที่มีความหนาสม่ำเสมอ ทำความหนาได้ตามต้องการและทำได้ทั้ง chromatoplate แผ่นเล็กและแผ่นใหญ่ (Bele and Khale, 2010)

3. การหยดสารบนแผ่น Chromatoplate

กำหนดตำแหน่งที่จะจุดสารที่ต้องการแยก โดยนำแผ่น chromatoplate มาวัดระยะจากปลายล่าง ประมาณ 1 ซม. หรือสูงกว่าระดับของตัวทำละลายใน TLC tank และปลายบน 0.5-1.0 ซม. แล้วทำเครื่องหมายเบาๆ ไว้ทั้ง 2 แห่ง (ดังรูปที่ 2.26) (Fried and Sherma, 1999)

นำสารที่ต้องการแยกมาละลายในตัวทำละลายที่ระเหยง่ายให้มีความเข้มข้นที่พอเหมาะ ใช้ capillary ที่มีปลายเรียวเล็กจุ่มลงในสารละลายนี้แล้วแตะลงบนตำแหน่งที่ทำไว้แล้วข้างต้น หยดสารนี้ซ้ำเต็ม 2-3 ครั้ง สารที่หยดลงไปต้องระงับอย่าให้มีจุดใหญ่จนเกินไป คือ เส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 0.5 มม. เพราะถ้าหากจุดสารขนาดใหญ่เกินไปจะทำให้เกิดการซ้อนทับกับจุดที่อยู่ใกล้เคียงเมื่อเคลื่อนที่สูงขึ้นไป และอย่าหยดสารมากเกินไปเพราะ silica gel จะ adsorb สารไว้ไม่หมดซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายที่เป็น mobile phase ไม่สามารถพาขึ้นไปได้พร้อมกันซึ่งจะเห็นเป็นแถบสีวาวๆ แต่ถ้าหยดสารน้อยเกินไปจะทำให้มองเห็นตำแหน่งของสารได้ยาก หลังจากนั้นปล่อยให้หยดของสารนั้นแห้งที่อุณหภูมิห้อง หรือใช้เครื่องเป่า (ธวัชชัย, 2551)



รูปที่ 2.26 การวัดระยะก่อนที่จะหยดสารและการหยดสารลงบน Chromatoplate
ที่มา https://www.chemicool.com/definition/thin_layer_chromatography_tlc.html

4. นำ Chromatoplate ใส่ลงใน mobile phase (El-Hamshary, 2015)

ก่อนที่จะนำ chromatoplate มาใส่ใน TLC tank จะต้องเลือกตัวทำละลายที่จะใช้เป็น mobile phase ในกรณีนี้ นิยมเรียกตัวทำละลายที่ใช้ว่า developing solvent ซึ่งการเลือกตัวทำละลายนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก เช่น กรณีที่สารมี polarity น้อย จะต้องใช้ developing solvent ที่ค่อนข้าง non-polar แล้วจึงเพิ่ม polarity ของตัวทำละลาย ตามความมีขั้วของสารที่ต้องการแยกตัวทำละลายที่ใช้กันมาก ได้แก่ (เรียงตาม polarity จากน้อยไปมาก)

Petroleum ether/Hexane < Cyclohexane < Carbon tetrachloride < Benzene < Chloroform < Carbon disulfide < Diethyl ether < Dichloromethane < Ethyl acetate < Acetone < 2-propanol < Ethanol < Methanol < Acetic acid

โดยปกตินิยมใช้ตัวทำละลายผสม เพื่อให้มีอำนาจในการละลายและพาสารเคลื่อนที่ได้ อย่างพอเหมาะ ตัวทำละลายผสมที่นิยมใช้ เช่น Hexane/Diethyl ether, Chloroform/Methanol, Petroleum ether/Ethyl acetate/Methanol เป็นต้น

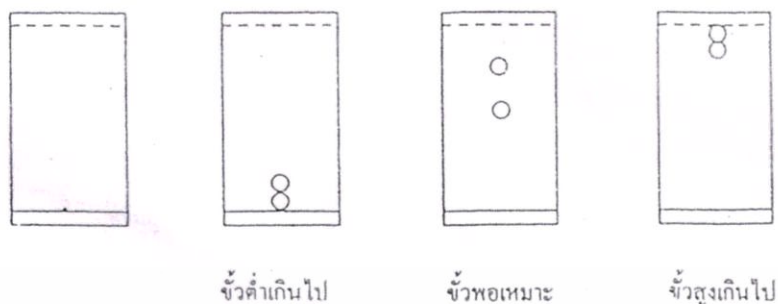


รูปที่ 2.27 การวาง chromatoplate ใน TLC tank

ที่มา https://www.spectrumchemical.com/OA_HTML/lab-supplies-products_KontesR-TLC-Tank-with-Latch-Lid_312834.jsp?section=13179

เมื่อได้ตัวทำละลายที่จะใช้เป็น mobile phase ได้แล้วให้ใส่ลงใน TLC tank และวางกระดาษกรองไว้รอบข้าง TLC tank ให้กระดาษกรองชุ่มไปด้วยตัวทำละลาย (ดังรูปที่ 2.27) ซึ่งจะทำให้ภายในภาชนะอ้อมตัวด้วยไอของตัวทำละลาย และเป็นผลให้ตัวทำละลายนี้เคลื่อนที่ได้เร็ว ระดับของตัวทำละลายนี้จะต่ำกว่าจุดของสารบน chromatoplate วาง chromatoplate ลงใน TLC tank แล้วปิดฝา หลังจากนั้นตัวทำละลายนี้เคลื่อนที่พาเอาสารขึ้นไปบน chromatoplate ซึ่ง chromatoplate ที่มีจุดของสารที่แยกแล้วเรียกว่า “Chromatogram” และเมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงระดับด้านบนของ chromatoplate ซึ่งเรียกระดับนี้ว่า solvent front นำ chromatoplate ออกจาก TLC tank แล้วทำให้แห้ง พิจารณาว่าตัวทำละลายใดเหมาะสมที่จะทำให้สารแยกออกจากกันได้ดีที่สุด ให้พิจารณาตามรูปที่ 2.28 แสดงตัวอย่างของ chromatogram เมื่อเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน (ธวัชชัย, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.28 แสดงตัวอย่างของโครมาโทแกรม เมื่อเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน
(รัชชัย, 2551)

5. การหาตำแหน่งของสารบน Chromatoplate (พิกุลทอง, 2560)

นำ chromatoplate ที่แห้งแล้วมาหาตำแหน่งของสารได้โดย

1. ดูจากสีของสารนั้นๆ ที่ปรากฏให้เห็นด้วยตา
2. ในกรณีที่สารไม่มีสี จะต้องทำให้สารนั้นปรากฏสีขึ้นบน plate แล้วจึงทำเครื่องหมาย

โดยการวางวอร์บลิที่ปรากฏไว้ ทั้งนี้ การเลือกใช้เทคนิคใดนั้นขึ้นอยู่กับสมบัติของสารที่ศึกษา เช่น

2.1 การฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ในกรณีที่สารนั้นสามารถดูดกลืนรังสี UV ได้ จะปรากฏสีภายใต้รังสี UV

2.2 การนำ chromatoplate ไปวางในภาชนะที่มีผลึก Iodine (ใช้ผลึก I_2 0.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิด) สารอินทรีย์เกือบทุกชนิด (ยกเว้น saturated hydrocarbons และ halides) จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ Iodine เป็นสีน้ำตาลหรือสีม่วงปรากฏบน plate ชั่วคร่าว

2.3 การพ่นด้วย developing agents อื่นๆ ที่เกิดปฏิกิริยากับสารที่จะแยกแล้วให้สีปรากฏให้เห็น โดยสามารถเลือกใช้รีเอเจนต์ได้ตามความเหมาะสม

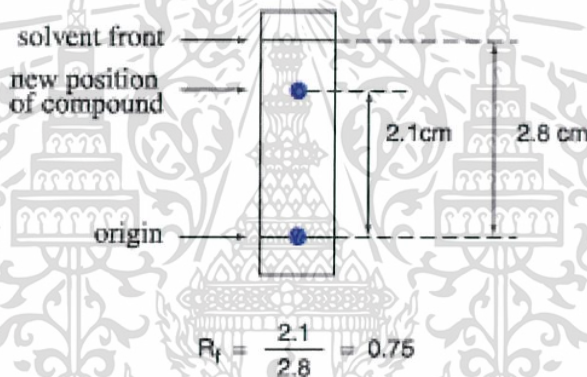
6. การหาค่า R_f ของสาร (IUPAC, 2014)

ค่า R_f หรือค่า “rate of flow” คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ในกรณีที่ใช้ตัวดูดซับเดียวกัน ใช้ระบบตัวทำละลายเดียวกัน และระบบที่ศึกษาอยู่ในสภาวะเดียวกัน (อุณหภูมิ, ความดัน, ความหนาของตัวดูดซับ ฯลฯ) สารหนึ่งๆจะมีค่า R_f คงที่เสมอ การวัดเปรียบเทียบค่า R_f จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการพิสูจน์ชนิดของสาร

ถ้าระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดศูนย์กลางวงกลมของสีที่ปรากฏเป็นระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ และระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึง solvent front เป็นระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ จะได้ว่า

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

การหาค่า R_f ของสารที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 2.29

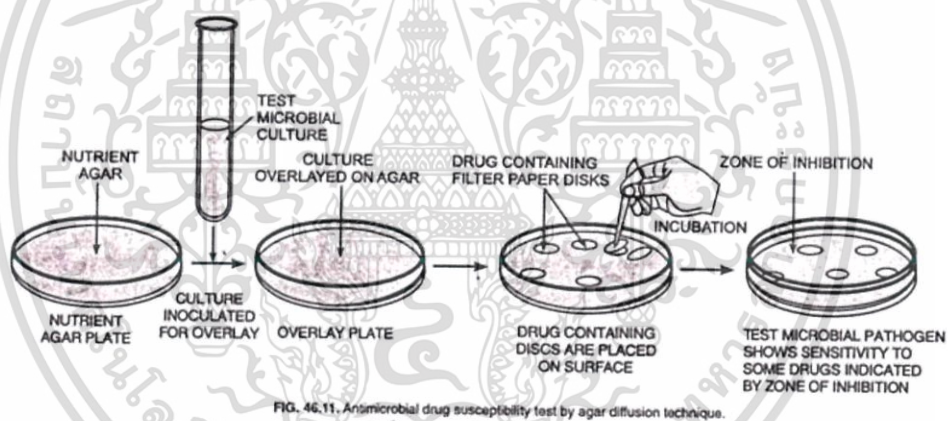


รูปที่ 2.29 การหาค่า R_f ของสารที่แยกได้

ที่มา <http://orgchemboulder.com/Technique/Procedures/TLC/TLC.shtml>

2.13 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

การทดสอบนี้อาศัยหลักการแพร่ของสารสกัดที่ออกมาโดยรอบแผ่นทดสอบในงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฐานเป็นส่วนประกอบ โดยบริเวณยับยั้งจะขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัด จากนั้นใช้ไม้พันสาลีที่ปราศจากเชื้อ (sterile swab) ชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ แล้วทา (swab) ลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ให้เชื้อทดสอบกระจายตัวอยู่บนอาหารอย่างสม่ำเสมอ เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบ ที่มีความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบรองนแห้ง จากนั้นวางลงบนอาหารที่ได้ทาเชื้อเอาไว้แล้ว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเชื้อยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลการทดสอบได้ด้วยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เชื้อไม่เจริญในหน่วยที่เป็นมิลลิเมตร (Ballav *et al.*, 2014)



รูปที่ 2.30 การทดสอบการต้านยาปฏิชีวนะโดยวิธี Agar disc diffusion

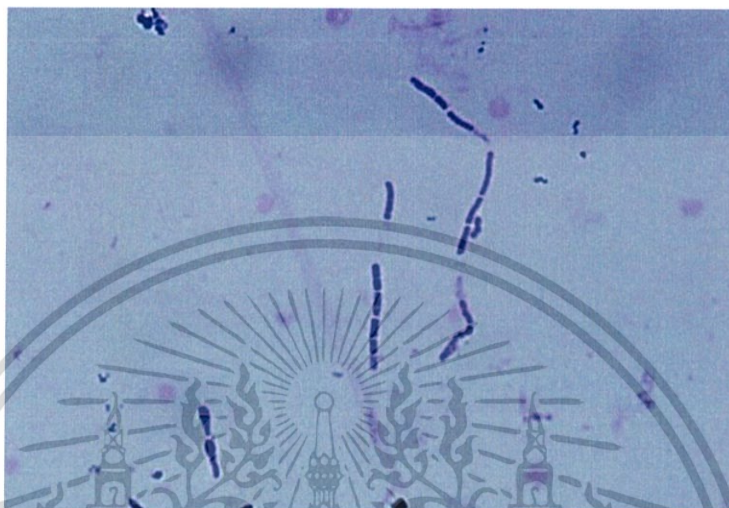
ที่มา <http://www.biologydiscussion.com/medical-microbiology/top-4-tests-for-antimicrobial-drug-susceptibility/55863>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ Agar disc diffusion

2.13.1.1 *Bacillus subtilis*

ลักษณะทั่วไปของ *Bacillus subtilis*



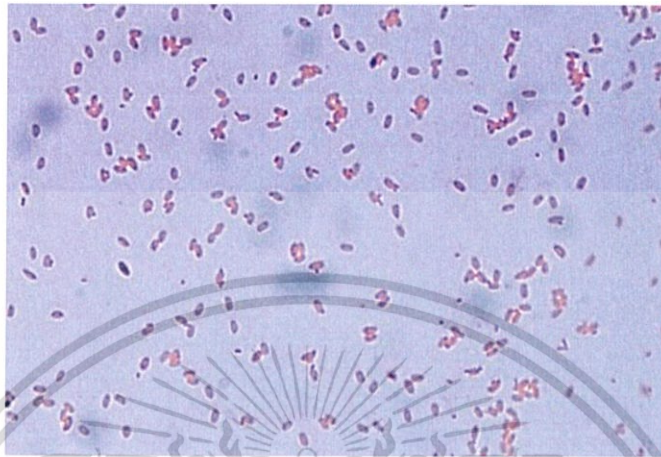
รูปที่ 2.31 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus subtilis* เมื่อมองผ่านเลนส์กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียที่มีรูปท่อน ยอมติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ สามารถสร้างแคปซูล (capsule) ได้ จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae แหล่งที่อยู่อาศัยพบได้ทั่วไปในดิน (อนุเทพ, 2558) *Bacillus* sp. มีขนาด $0.3 - 2.2 \times 1.2 - 7.0$ ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดย flagella ที่ด้านข้างของเซลล์ พบได้ในดิน มีปริมาณ G-C อยู่ในช่วงกว้าง คือ 32 - 62 โมลเปอร์เซ็นต์ ตาม Bergey's Manual of Bacteriological Microbiology เล่มที่ 8 จัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอต (prokaryote) อยู่ใน Kingdom Prokaryota แบ่งออกเป็น 2 division โดย แบคทีเรียอยู่ใน division ที่ 2 ซึ่ง *Bacillus* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 15 คือ Endospore - forming rods และ cocci (ปรีณา, 2554) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปในดิน ปุ๋ยคอกวัสดุปลูกพืช เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลายของซากพืชและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เป็นแบคทีเรียประเภท aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม สามารถอยู่รอดได้แม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนสูง ขาดแคลนอาหาร และแสงอัลตราไวโอเล็ต เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมสปอร์ของ *B. subtilis* ก็จะสามารถงอกกลับเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ใหม่โดยง่าย ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพธรรมชาติ (อรอนงค์, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13.1.2 *Escherichia coli*

ลักษณะทั่วไปของ *Escherichia coli*



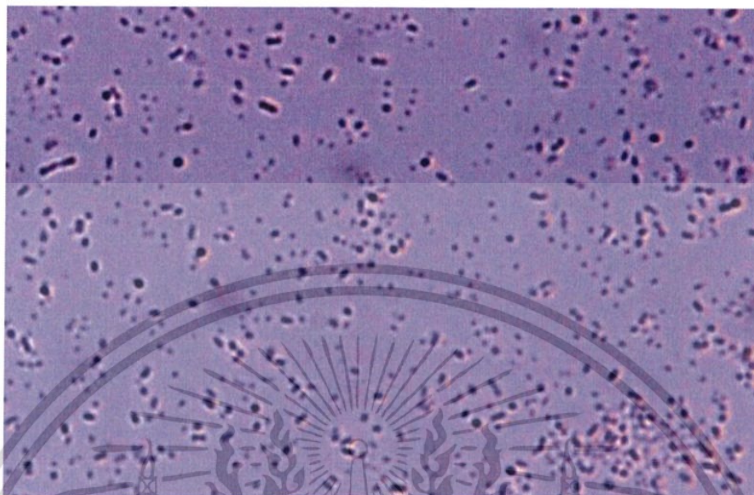
รูปที่ 2.32 ลักษณะเซลล์ของ *Escherichia coli* เมื่อมองผ่านเลนส์กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างแท่ง ขนาด 1.1-1.5 x 2.0-6.0 ไมโครเมตร มีการจัดเรียงตัวอยู่แบบเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน สามารถสร้างแคปซูลและสร้างสารพิษ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไร้ออกซิเจนเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ สามารถก่อโรคได้บ่อยกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่อื่นในกลุ่ม Enterobacteriaceae เหมือนกัน ซึ่งส่วนใหญ่ก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารแต่บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหารได้โดยโรคติดเชื้อ *E. coli* ที่สำคัญได้แก่โรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น (ธนภพ และคณะ, 2558)

E. coli เป็นแบคทีเรียแยกได้ครั้งแรกจากอุจจาระเด็ก ที่ป่วยด้วยโรคท้องร่วงในปี ค.ศ. 1885 โดยนักจุลชีววิทยา ชาวเยอรมันชื่อ ทีโอดอร์ เอสเชริช (Theodor Escherich) ต่อมาได้รับการตั้งชื่อเป็น *Escherichia coli* (*E. coli*) ก่อนปี ค.ศ. 1982 นั้น ไม่ถือว่า *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่มีอันตราย ถึงแม้ว่าจะเป็นที่น่ากังวลว่าแบคทีเรียนี้มักจะทำให้เด็กทารกในประเทศกำลังพัฒนาเกิดอาการท้องเดินและเนื่องจากที่เป็นแบคทีเรียในลำไส้จึงพบบ่อยในอุจจาระของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้จึงใช้แบคทีเรียนี้เป็นบรรณานุกรมซึ่งถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (Edberg *et al.*, 2000)

2.13.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

ลักษณะทั่วไปของ *Pseudomonas aeruginosa*



รูปที่ 2.33 ลักษณะเซลล์ของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อมองผ่านเลนส์กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

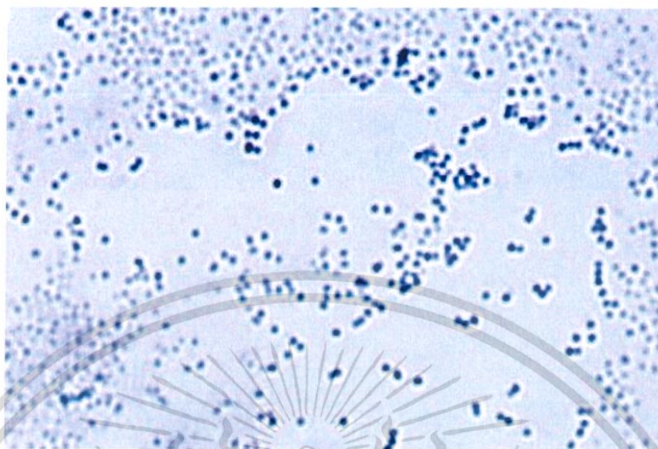
เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างท่อน ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต จัดอยู่ในวงศ์ *Pseudomonadaceae* สามารถเคลื่อนที่ได้ เซลล์ของ *P. aeruginosa* มีขนาด $0.5-1.0 \times 1.5-5.1$ ไมโครเมตร ผนังเซลล์ประกอบด้วยลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ lipopolysaccharide (LPS) ปกติจะพบได้ในสิ่งแวดล้อมกระจายในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช และเป็น normal flora ในลำไส้คน (พิณิจ, 2553) *P. aeruginosa* สามารถก่อโรคได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สำหรับในคนพบว่าก่อโรคในผู้ที่มีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน เช่น ผู้ป่วย AIDS ผู้ป่วยมะเร็ง ผู้ที่ถูกแผลไฟไหม้และผู้ป่วยโรค cystic fibrosis (CF) (ปรินท์ และคณะ, 2552)

Pseudomonas aeruginosa จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อฉวยโอกาส แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญและแพร่กระจายไปยังอวัยวะของผู้ป่วยในส่วนต่างๆ พร้อมทั้งมีการทำลายเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโดยสร้างสารพิษและเอนไซม์ต่างๆ (virulence factors) 15,16 เช่น alginate (slime layers, biofilm) (จินตนา, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13.1.4 *Staphylococcus aureus*

ลักษณะทั่วไปของ *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 2.34 ลักษณะเซลล์ของ *Staphylococcus aureus* เมื่อมองผ่านเลนส์กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

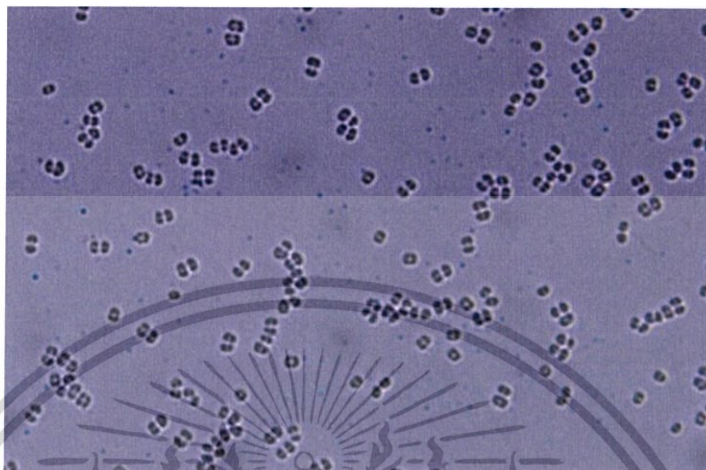
Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ถูกจัดอยู่ในตระกูลไมโครค็อกคาซีอิดี (*Micrococcaceae*) มีลักษณะทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 0.5-1.5 ไมโครเมตร ไม่เคลื่อนที่ บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลทำให้โคโลนีเป็นเมือก (slime) ช่วยให้เชื้อมีความทนทานต่อการทำลายของยาปฏิชีวนะและภูมิคุ้มกันของร่างกาย เชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป และเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเล็กน้อย (microaerophilic) เจริญเร็วในอาหารเหลว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (จินตนา, 2549)

ปัจจัยที่เอื้ออำนวยให้เชื้อสามารถในการก่อโรคได้แก่ โครงสร้างเซลล์การสร้างสารพิษ การสร้างเอนไซม์ ซึ่งเป็นผลให้เชื้อเจริญและแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ พร้อมทั้งมีการทำลายเนื้อเยื่อของผู้ป่วย คือ การที่แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพ เช่น coagulase เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทำให้พลาสมาแข็งตัว โดยขบวนการดังกล่าวจะทำให้มีการสร้างไฟบริน ในผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียนี้ซึ่งไฟบรินที่สร้างขึ้นนี้จะไปหุ้มรอบเชื้อแบคทีเรียแต่ละตัว เป็นกลวิธีหลบหนีจากการกินเม็ดเลือดขาวของโฮสต์ได้ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยในโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อได้ทั่วร่างกาย เช่น โรคติดเชื้อที่ผิวหนังการเกิดตุ่มหนองที่ผิวหนัง (impetigo) ฝี (furuncle) (นิตยา และมุกิตา, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13.1.5 *Micrococcus luteus*

ลักษณะทั่วไปของ *Micrococcus luteus*

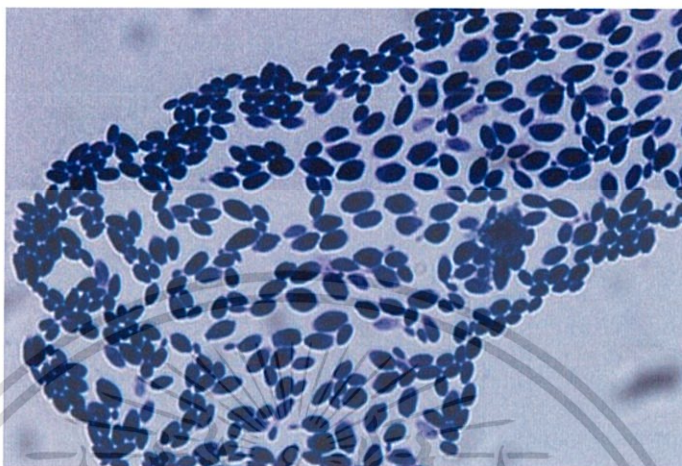


รูปที่ 2.35 ลักษณะของเซลล์ของ *Micrococcus luteus* เมื่อมองผ่านเลนส์กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

Micrococcus ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Cohn ในปี ค.ศ. 1872 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (Zheng *et al.* 2009) สามารถพบได้ในดิน ฝุ่น ตลอดจนบนผิวหนังของคนและสัตว์ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถทนต่อทั้งแรงดันออสโมซิส การฉายรังสี และทนต่อความเค็มของเกลือ ถึงแม้เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคแต่ก็เป็นสาเหตุให้อาหารหลายชนิดเน่าเสีย (microbial spoilage) เช่น นม ไข่ อาหารทะเล เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (นิตยา และคณะ 2556)

2.13.1.6 *Candida albicans*

ลักษณะทั่วไปของ *Candida albicans*



รูปที่ 2.36 ลักษณะของเซลล์ของ *Candida albicans* เมื่อมองผ่านเลนส์กล้อง

จุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

C. albicans เป็นยีสต์ที่มีรูปร่างทั้งแบบวงรี (oval shape) และทรงไข่ (ellipsoidal shape) ไม่มีแคปซูลหุ้ม เพิ่มจำนวนได้ด้วยการแตกหน่อ (budding) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25 – 37 องศาเซลเซียส สามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ บริเวณที่พบเชื้อนี้สามารถพบได้ทั้งบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกโดยเฉพาะเยื่อเมือกในทางเดินอาหาร รวมถึงบริเวณของอวัยวะสืบพันธุ์ (สุรชัย, 2557)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ซ้อนสแตนเลส

3.2.2 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.2.3 ซ้อนตักสาร

3.2.4 ปีกเกอร์

3.2.5 กระจกตวง

3.2.6 ปีเปต

3.2.7 ลูกยาง

3.2.8 Vernier calipers

3.2.9 แท่งแก้ว

3.2.10 ขวดดูแรน

3.2.11 หลอดหยด

3.2.12 ขวดฉีดย้ำกลั่น

3.2.13 หลอดทดลอง

3.2.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.15 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

3.2.16 ห่วงเขี่ยเชื้อ

3.2.17 Centrifuge tube

3.2.18 Micro centrifuge tube

3.2.19 มีดผ่าตัด

3.2.20 Forceps

3.2.21 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์

3.2.22 สำลีและผ้าก๊อซ

3.2.23 Needle

3.2.24 ขวดรูปชมพู่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.25 Auto pipette ขนาด 50 ไมโครลิตร , 200 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร

3.2.26 Tips

3.2.27 ขวดปรับปริมาตร

3.2.28 กรวยแยก

3.2.29 ไม้พันสำลี

3.2.30 Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.2.31 Spray gun

3.2.32 กระจกครอบวอทแมน เบอร์ 1

3.2.33 แผ่น thin later chromatography

3.2.34 TLC tank

3.2.35 ขวด vial

3.3 สารเคมี

3.3.1 แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch research laboratories Pvt. Ltd, India)

3.3.2 Potassium nitrate (KNO_3 : BHD Chemical Ltd, Poole, England) (มวลโมเลกุล = 101.1032 กรัมต่อโมล)

3.3.3 Sodium chloride ($NaCl$: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) (มวล โมเลกุล = 58.4428 กรัมต่อโมล)

3.3.4 Casein (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St.louis, MO 63103, USA)

3.3.5 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$: fluka chemical AG CH- 9470, Buchs, Switzerland) (มวลโมเลกุล = 246.4746 กรัมต่อโมล)

3.3.6 Calcium carbonate ($CaCO_3$:ajax finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand) (มวล โมเลกุล = 100.0869 กรัมต่อโมล)

3.3.7 Ferrous heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$:Carlo erba Ltd., Italy) (มวลโมเลกุล = 278.0146 กรัมต่อโมล)

3.3.8 วุ้น (agar : Bio agar)

3.3.9 Distilled water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.10 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
- 3.3.11 Nystatin
- 3.3.12 แอลกอฮอล์ 70% และ 95%
- 3.3.13 Phenol (C_2H_5OH) (มวลโมเลกุล = 94.1112 กรัมต่อโมล)
- 3.3.14 Molybdenum trioxide (มวลโมเลกุล = 143.9582 กรัมต่อโมล)
- 3.3.15 กรดซัลฟูริก (HSO_4 : Carlo erba Ltd., Italy) (มวลโมเลกุล = 98.0785 กรัมต่อโมล)
- 3.3.16 Peptone (titan biotech Ltd., India)
- 3.3.17 สารสกัดจากเนื้อ (biomark laboratories., India)
- 3.3.18 สารสกัดจากยีสต์ (biomark laboratories., India)
- 3.3.19 Glycerol ($C_3H_8O_3$: ajax finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand) (มวล โมเลกุล = 92.0938 กรัมต่อโมล)
- 3.3.20 สารละลายเมทิลีนบลู
- 3.3.21 สารละลายเอทานอล (Carlo erba Ltd., Italy) (มวลโมเลกุล = 46.0684 กรัมต่อโมล)
- 3.3.22 Ammonia monybdrate tetrahydrate (Sigma-Aldich Chemie GmbH, St.louis, MO 63103, USA) (มวลโมเลกุล = 1235.9975 กรัมต่อโมล)
- 3.3.23 Glucose ($C_6H_{12}O_6$) มวลโมเลกุล = 92.0938 กรัมต่อโมล)
- 3.3.24 Malt extract (HiMedia laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Bussiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)
- 3.3.25 Gelatin
- 3.3.26 Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4 : Carlo erba Ltd., Italy) (มวล โมเลกุล = 174.1759 กรัมต่อโมล)
- 3.3.27 Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$: Carlo erba Ltd., Italy) (มวลโมเลกุล = 132.1395 กรัมต่อโมล)
- 3.3.28 Manganese (II) choride tetrahydrate ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$: ajax finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand) (มวลโมเลกุล = 521.3915 กรัมต่อโมล)
- 3.3.29 Zinc sulfate hepahydrate ($ZnSo_4 \cdot 7H_2O$: fluka chemical AG CH-9470, Buchs, Switzerland) (มวลโมเลกุล = 287.5496 กรัมต่อโมล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.30 Sulfalnic acid

3.3.31 สารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine

3.3.32 สารละลายแกรมไอโอดีน

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

3.3.34 สารละลายมาตรฐาน Mcfarland NO.5

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

3.3.36 สารละลาย เมทานอล (มวลโมเลกุล = 32.0419 กรัมต่อโมล)

3.3.37 สารละลายกรดอะซีติก (มวลโมเลกุล = 60.0520 กรัมต่อโมล)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

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

3.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

- *Bacillus subtilis* TISTR 1248

- *Escherichia coli* TISTR 074

- *Micrococcus luteus* TISTR 2374

- *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870

- *Staphylococcus aureus* TISTR 746

- *Candida albicans* TISTR 5239

3.6 ฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 ตัวอย่างดิน

3.7.1 ดินป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 10 ตัวอย่างดิน (วันที่เก็บตัวอย่าง : 21 สิงหาคม 2559)

3.7.2 ดินป่าชายเลนตำบลคลองสอง จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 10 ตัวอย่างดิน (วันที่เก็บตัวอย่าง : 10 ธันวาคม 2559)

3.7.3 ดินป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี จำนวน 10 ตัวอย่างดิน (วันที่เก็บตัวอย่าง : 11 ธันวาคม 2559)

3.8 การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

3.8.1 การเก็บตัวอย่างดิน (วสุ, 2554)

เลือกจุดเก็บตัวอย่างดินจากป่าชายเลนธรรมชาติ โดยเก็บตัวอย่างจากในแผ่นดินออกสู่ทะเล กวาดเศษกิ่งไม้บริเวณผิวดินออก จากนั้นทำการขุดดินลึกลงไป 2-3 เซนติเมตรโดยซ้อนแกงหรือซ้อนปลูกใส่ในถุงพลาสติกใสไม่รัดปากถุง ทำการวัดค่าความเป็นกรดเบสของดินด้วยกระดาษวัดพีเอชหรือ pH meter ให้ทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 10 จุด แต่ละจุดเก็บตัวอย่างประมาณ 500 กรัม โดยบันทึกตำแหน่งจุดที่เก็บ วัตถุภาพ และบันทึกค่าความเป็นกรดเบสที่วัดได้

3.8.2 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท (Wongsakorn *et al.*, 2014)

นำตัวอย่างดินข้อ 3.8.1 มาแยกเชื้อโดยนำตัวอย่างดินที่เก็บมาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เต็มเพลท นำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. แล้วชั่งดินมา 1 กรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มี 0.1% tween 80 ปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) กำหนดเป็นระดับการเจือจางที่ 10^{-1} ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ให้ดินตกตะกอน จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีระดับความเจือจางจนถึง 10^{-5} ด้วย 0.1% Basic Lauryl Sulfate โดยที่ 10^{-2} ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่ 10^{-3} - 10^{-5} ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ศึกษาระบายตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร SCA (starch casein agar) ที่เติม nystatin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.8.3 หาสสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน (AOAC, 1990)

3.8.3.1 การหาน้ำหนักดิน

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

ซังน้ำหนักรองบีกเกอร์อีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนอบและหลังอบ

3.8.3.2 การหาปริมาณความชื้น

ซังตัวอย่างดินมา 1-2 กรัมใส่ในถ้วยเซรามิกหรือบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป

3.8.3.3 การวัดค่าความเป็นกรดเบส

ซังตัวอย่างดิน 2 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วยในขณะเดียวกันด้วยข้อตักสารหรือแท่งแก้ว จนสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนผิว (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง) จึงทำการวัดค่าความเป็นกรด-เบส

3.8.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา (Klantbut, 2013)

นำตัวอย่างเชื้อในอาหารที่ได้จากข้อ 3.8.2 ทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร SCA ที่เติม nystatin (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยเติม 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อแยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ลงบนหลอดอาหารเลี้ยง International Streptomyces project (ISP2) ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน จนเชื้อเจริญเต็มที่เก็บไว้สำหรับทำการทดลองในขั้นต่อไป และทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลต

3.8.5 เตรียม spore suspension (Klantbut, 2013)

ทำการ cross streak แอคติโนมัยซีทให้ทั่วทั้งเพลทอาหาร SCA เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญเติบโตเต็มที่ทุกไอโซเลต จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อขูดเอาสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารจนทั่ว แล้วจึงทำการเทลง centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เส้นใยสปอร์เกิดการแตกหักออกจากกัน จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีฆ่าเชื้อเพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับสปอร์ออก นำส่วนที่กรองถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที เทส่วนละลายใส่ทิ้งไป และทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อย เพื่อทำการกระจายตัวสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ในหยดน้ำภายในหลอดแล้วจึงทำการ resuspension ด้วยกลีเซอรอล 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสปอร์ที่ได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำเป็น stock culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ (คニングกานต์, 2558 และ ลลิตา, 2554)

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิด ISP2 โดยวิธี Cross steak ตรวจสอบผลโดยการดูการเจริญเนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Nanjwade *et al.*, 2010)

3.9.1 การตกตะกอนโปรตีนนม (Coagulation) และการย่อยสลายโปรตีนนม (Peptonization)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอสคิตินมัยซีททุกไอโซเลทในน้ำนม (Skim milk ร้อยละ 10) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมเกิดขึ้น น้ำนมที่มีสีขาวขุ่นจะเปลี่ยนเป็นสารละลายใส และเกิดการตกตะกอนของโปรตีนในน้ำนม (Coagulation)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอสคิตินมัยซีททุกไอโซเลทในอาหารแข็ง Skim milk agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจสอบผลโดยการสังเกตโซนใสที่เกิดขึ้น หากมีการย่อยสลายโปรตีนนม อาหารจากสีขาวขุ่นจะเปลี่ยนเป็นสีขาวใส (Peptonization)

3.9.2 การย่อยสลายเจลาติน (Gelatinization)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอสคิตินมัยซีททุกไอโซเลทในอาหารเหลว Bouillon Gelatin Broth ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน จากนั้นนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้มาแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้ามีการย่อยสลายเจลาตินก็จะไม่เกิดการแข็งตัวของอาหาร

3.9.3 การย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction)

เลี้ยงเชื้อแอสคิตินมัยซีททุกไอโซเลทใน Peptone KNO₃ broth ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิกลงไป 2 หยด และสารละลาย *N,N*-Dimethyl-1-naphthylamine 3 หยด ถ้าเชื้อมีการเปลี่ยนไนเตรทไปเป็นไนไตรต์สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูถึงแดง

3.9.4 การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

เลี้ยงเชื้อแอสคิตินมัยซีททุกไอโซเลทโดยขีตลงบนอาหาร Inorganic salt-starch agar (ISP4) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายแอมโมเนียมไอโอดีนลงไปบนอาหารที่มีการเพาะเชื้อเลี้ยงไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้น จะเกิดเป็นบริเวณใสรอบๆโคโลนีของเชื้อ แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเกิดเป็นสีน้ำเงิน

3.10 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Agar cross streak) (คニングกานต์, 2558)

ทำการคัดเลือกเชื้อบนอาหาร Glucose Yeast extract agar (GYE) โดยขีดเป็นเส้นตรงตามแนวยาวจากด้านหนึ่งไปสู่อีกด้านหนึ่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นทำการทดสอบกับเชื้อทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 1248, *Escherichia coli* TISTR 074, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Candida albicans* TISTR 5239 โดยลากเชื้อทดสอบตั้งฉากกับแอคติโนมัยซีท (ดังรูป 3.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ สังเกตระยะห่างระหว่างแนวการเจริญของแอคติโนมัยซีทกับเชื้อทดสอบที่เกิดขึ้น จากการศึกษาจะสามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในเบื้องต้น



รูปที่ 3.1 วิธีการทำ Agar cross streak

3.11 การทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion

3.11.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท (จิตติ, 2556 และ เกศแก้วกัลยา, 2556)

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทใน seed medium (Yeast extract-malt extract broth) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ค่าพีเอชที่ 7.2 บ่มไว้ในสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วเลี้ยงต่อใน Production medium (Yeast extract – malt extract) ที่เติม 0.1% CaCO_3 โดยเติม 1% ของ seed medium ลงใน production medium (Yeast extract-malt extract broth) ค่าพีเอชที่ 7.2 โดยทำการ inoculums บ่มเลี้ยงไว้ในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 วัน กรองตัวเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยใช้กระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 (whatman no.1) นำส่วนใสไปทำการระเหยแห้ง (ดังวิธีการที่ 3.11.2) จากนั้นนำตัวเซลล์ไปสกัดด้วยเมทานอล 50 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปกรองและนำส่วนใสไปทำการระเหยแห้ง (ดังวิธีการที่ 3.11.2

3.11.2 การสกัดสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอสคิโนแบคทีเรีย

นำน้ำหมักส่วนใสที่ปราศจากเส้นใยมาทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตท โดยทำการเติมเอทิลอะซิเตทลงไปให้อัตราส่วน 1:1 (v/v) ซึ่งในเฟสบนของเอทิลอะซิเตทที่มีสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จะแยกตัวออกจากเฟสของน้ำ จากนั้นนำสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทมาระเหยด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศภายใต้ความดัน (rotary evaporator) จะทำให้ได้สารสกัดหายไปในชั้นเอทิลอะซิเตท จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ส่วนเซลล์และเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองทำการล้างด้วยเมทานอลแล้วนำไปสกัดต่อในเมทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำน้ำหมักเชื้อแอสคิโนแบคทีเรียที่ได้ มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เพื่อแยกเอาเส้นใยของเชื้อแอสคิโนแบคทีเรียและน้ำหมักออกจากกัน จากนั้นนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะทำให้ได้สารสกัดหายไปในชั้นเมทานอลจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.11.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ และการเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ (Parekh and Chanda, 2007)

3.11.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้แก่เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248, *Escherichia coli* TISTR 074, *Micrococcus luteus* TISTR 2374, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Candida albicans* TISTR 5239 ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อ แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐานแมคฟาแลน หมายเลข 0.5 ให้มีค่า OD อยู่ในช่วง 0.08-0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.0×10^8 CFU/ml

3.11.3.2 การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบ

เตรียมอาหาร Mueller's hinton agar สำหรับอาหารที่ใช้ในการทดสอบเลี้ยงแบคทีเรีย และเตรียมอาหาร Sabouraud's agar (SDA) เป็นอาหารสำหรับใช้เลี้ยงทดสอบเชื้อยีสต์ โดยทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 20 มิลลิลิตร วนจานเพาะเชื้อให้อาหารกระจายทั่วแล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัว

3.11.4 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยเทคนิค Agar disc diffusion (Ballav *et al.*, 2014)

การทดสอบนี้อาศัยหลักการแพร่ของสารของสารซึ่งสกัดออกมาโดยรอบแผ่นทดสอบ ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบ โดยบริเวณยับยั้ง จะขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัด จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3.11.3.1 แล้วทา (swab) ลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ ให้เชื้อทดสอบกระจายตัวอยู่บนอาหารอย่างสม่ำเสมอ เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบในข้อ 3.11.2 ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร หยดบนแผ่นทดสอบรอนแห้ง จากนั้นวางลงบนอาหารที่ได้ทาเชื้อเอาไว้แล้ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนเชื้อยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดสอบได้ด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสที่เชื้อไม่เจริญในหน่วยที่เป็นมิลลิเมตร

3.12 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (Klanbut, 2013)

3.12.1 การเตรียมหัวเชื้อ และการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท

การศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทจะศึกษาสภาวะการเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว เพื่อทำการศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะของฟอสโฟลิปิดที่ทำการสกัดได้ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

3.12.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหารเหลว

ทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ทำการเลี้ยงบนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract - malt extract agar) ที่บ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน ลงในอาหารเหลว Yeast extract – malt extract broth (YEME broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ค่า pH เท่ากับ 7.2 บ่มเลี้ยงไว้ในสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อทำการ pre - germination แล้วทำการเลี้ยงต่อในอาหาร Yeast extract – malt extract broth (YEME broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ค่า pH เท่ากับ 7.2 บ่มเลี้ยงไว้ในสภาวะเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนละลายใส่ทิ้งไป ตักตะกอนเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ microcentrifuge tube เพื่อนำไปทำการสกัดฟอสโฟลิปิด

3.12.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทบนอาหารแข็ง

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Starch casein agar (SCA) เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้เชื้อแอกติโนมัยซีทเจริญเติบโตและสร้างเส้นใยอาหารให้เต็มที่ จากนั้นนำไปมิดที่ปราศจากเชื้อชุดแอกติโนมัยซีทใส่ลงในหลอด eppendorf ซึ่งน้ำหนักของเส้นใยให้ได้ประมาณ 100 มิลลิกรัม เพื่อนำไปทำการสกัดฟอสโฟลิปิด

3.12.2 วิธีการสกัดหยาบเพื่อทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ทำการเติมคลอโรฟอร์ม 100 ไมโครลิตร เมทานอล 200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 80 ไมโครลิตร จากนั้นทำการ vortex เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพิ่มลงไปในตัวอย่งที่จะทำการสกัด แล้วทำการผสมให้เข้ากัน เมื่อสารตัวอย่างเข้ากันแล้ว จึงทำการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป 100 ไมโครลิตร และทำการ vortex เพื่อผสมสารให้เข้ากันอีกเป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำการแยกเฟส โดยเปิดเอาชั้นอินอออกแกนิคเฟสที่อยู่ข้างล่างถ่ายใส่ microcentrifuge tube หลอดใหม่และทำการระเหยแห้ง นำส่วนที่เหลือมาทำการ resuspension ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 6-10 ไมโครลิตร จากนั้นใช้อุปกรณ์เปิดดูดสารมาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ครั้งละ 2 ไมโครลิตรจนหมด และหยดฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ L- α phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt from egg yolk lecithin (PG) หยดลงไป 10 ไมโครลิตร , 3-sn phosphatidylethanolamine from bovine brain (PE) หยดลงไป 20 ไมโครลิตร และ cardiolipin sodium salt from bovine heart (CL) หยดลงไป 20 ไมโครลิตร เพื่อนำมาใช้เป็น standard เปรียบเทียบ unknown จากนั้นนำแผ่น TLC ไปวางในภาชนะที่มีฝาปิด ซึ่งมีคลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:12:15:4 ปริมาตร/ปริมาตร ตามลำดับ และมีแผ่นกระดาษที่ชุ่มด้วยสารละลายเป็นเวลา 30 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้สารตัวพาวัง ปล่อยให้ตัวทำละลายขึ้นมาจนประมาณ $\frac{3}{4}$ ของความสูงของแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ออกและทำเครื่องหมายตามแนวของตัวทำละลาย เมื่อแผ่น TLC แห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำแผ่นไปฉีดพ่นด้วยสารละลาย ammonium molybdate จะเห็นจุดสีน้ำเงินบริเวณที่มีสารตัวอย่างอยู่ และนำไปอบในตู้ incubator ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นให้ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดต่างๆบนแผ่น TLC แล้วจึงวัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า R_f

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างดินจากศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร ป่าชายเลนอำเภอบางประกง จังหวัดฉะเชิงเทรา และ ศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี โดยทำการวัดค่าความเป็นกรดต่างของดิน ณ จุดเก็บตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 7 – 8 จากการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 30 จุด สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ 55 ไอโซเลต ดังตารางที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 แสดงหมายเลขไอโซเลตของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ทำการคัดแยกได้

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จุดเก็บ ตัวอย่างดิน	รหัสตัวอย่าง ดิน	หมายเลขไอโซเลต
ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร	1	SMK01	GWN01, GWN08
	2	SMK02	GWN02, GWN03, GWN09, GWN10
	3	SMK03	GWN04, GWN15, GWN19
	4	SMK04	GWN06, GWN12
	5	SMK05	GWN07, GWN14
	6	SMK06	-
	7	SMK07	GWN05, GWN13, GWN16
	8	SMK08	-
	9	SMK09	-
	10	SMK10	-
ป่าชายเลน ตำบลคลองสอง จังหวัดฉะเชิงเทรา	11	CHS01	GWN17, GWN20, GWN21, GWN22, GWN28
	12	CHS02	GWN18, GWN23, GWN24, GWN25, GWN26
	13	CHS03	-
	14	CHS04	GWN29, GWN30, GWN31
	15	CHS05	-
	16	CHS06	-
	17	CHS07	-
	18	CHS08	GWN32, GWN33, GWN34, GWN36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	19	CHS09	GWN37, GWN38
	20	CHS10	GWN39, GWN40
ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลเสม็ด จังหวัด ชลบุรี	21	CHB01	GWN41, GWN42, GWN48, GWN52
	22	CHB02	-
	23	CHB03	-
	24	CHB04	GWN44, GWN49, GWN58, GWN60
	25	CHB05	GWN56, GWN59
	26	CHB06	GWN50
	27	CHB07	GWN46
	28	CHB08	GWN53
	29	CHB09	GWN45, GWN55
	30	CHB10	GWN47, GWN54, GWN57

หมายเหตุ :

รหัสตัวอย่างดิน คือ สถานที่เก็บดิน

SMKXX = จังหวัดสมุทรสาครตามด้วยจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง

CHSXX = จังหวัดฉะเชิงเทราตามด้วยจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง

CHBXX = จังหวัดชลบุรีตามด้วยจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง

หมายเลขไอโซเลต GWNXX คือ ชื่อไอโซเลตตามด้วยรหัสไอโซเลตที่แยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 30 จุด ประกอบไปด้วย ดินตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรสาคร 10 จุด ตัวอย่างดินจากจังหวัดฉะเชิงเทรา 10 จุด และตัวอย่างดินจากจังหวัดชลบุรี 10 จุด เนื่องจากดินตัวอย่างมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จึงนำมาทำการหาคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน ซึ่งประกอบไปด้วย 3 การทดสอบ ได้แก่ การหาน้ำหนักดิน (ตั้งวิธีการทดลองที่ 3.8.3.1) การหาความชื้น (ตั้งวิธีการทดลองที่ 3.8.3.2) และการวัดค่าความเป็นกรดเบส (ตั้งวิธีการทดลองที่ 3.8.3.3) พบว่าตัวอย่างดินแต่ละจุดมีค่าดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน

จุดเก็บ ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรด - ด่าง	
			จุดเก็บตัวอย่าง	ห้องปฏิบัติการ
1	7.200	37.28	7.49	7.59
2	7.239	35.21	7.55	8.12
3	7.073	47.15	7.61	7.86
4	7.319	48.46	7.41	7.57
5	7.360	50.81	7.35	7.78
6	7.317	45.44	7.54	8.04
7	6.494	43.43	7.33	8.15
8	6.095	48.40	7.35	8.03
9	7.159	45.73	7.43	7.70
10	6.616	44.75	7.32	8.16
11	6.396	42.00	7.28	8.14
12	7.455	58.62	7.35	7.71
13	7.174	40.77	7.14	8.01
14	7.664	37.55	7.23	7.89
15	7.739	39.23	7.41	8.10
16	6.817	41.48	7.47	7.80
17	6.692	44.47	7.45	7.59
18	7.388	38.53	7.41	7.77
19	7.259	38.89	7.65	8.03
20	7.443	37.82	7.32	7.62
21	7.530	44.43	7.28	7.48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดิน (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่างดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	ค่าความเป็นกรด - ด่าง	
			จุดเก็บตัวอย่าง	ห้องปฏิบัติการ
22	7.256	35.82	7.35	8.14
23	6.756	31.79	7.45	7.89
24	7.499	45.34	7.36	7.51
25	7.464	34.57	7.33	7.74
26	7.275	32.42	7.50	7.96
27	6.994	32.50	7.27	8.13
28	7.415	30.74	7.28	8.05
29	6.831	35.31	7.40	7.74
30	6.457	48.13	7.30	8.18

หมายเหตุ :

- จุดเก็บตัวอย่างดินที่ 1 - 10 จากศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร
- จุดเก็บตัวอย่างดินที่ 11 - 20 จากป่าชายเลนตำบลคลองสอง จังหวัดฉะเชิงเทรา
- จุดเก็บตัวอย่างดินที่ 21 - 30 จากศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินอัมยซีท

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิตินอัมยซีท

แอสคิตินอัมยซีทที่ถูกทำการแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร starch casein agar ที่เติม nystatin (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยเติม 100 ไมโครลิตร ต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน (ดังวิธีการที่ 3.8.4) จากนั้นนำเชื้อแอสคิตินอัมยซีทที่ทำการคัดแยกได้จำนวนทั้งหมด 55 ไอโซเลต (ดังแสดงในตารางที่ 4.1) มาทำการตรวจสอบลักษณะการเจริญ สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ รงควัตถุที่ละลายน้ำ โดยทำการ cross streak ลงบนอาหาร ISP medium no. 2 (Yeast extract – malt extract agar) โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBs/IBCC system)(ดังวิธีการที่ 3.9)(Mundie, 1995) (ภาคผนวก จ) และทำการตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของแอสคิตินอัมยซีทโดยการเพาะเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ (ภาคผนวก ง) ซึ่งวิธีนี้จะช่วยให้เห็นการเรียงตัวของเส้นสายสปอร์ได้อย่างชัดเจน โดยการตรวจดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะของแต่ละไอโซเลตดังตารางที่ 4.3



ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท

กลุ่ม ที่	หมายเลข ไอโซเลต	การเจริญบน อาหาร ISP2	สีของ Substrate Mycelium	สีของ Aerial Mycelium	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	ลักษณะ ของสปอร์	การจัดเรียงตัว ของสปอร์
1	GWN01	ปานกลาง	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN03	ดี	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN08	น้อย	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN12	ปานกลาง	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	กลม	Spiral
	GWN19	น้อย	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN20	ปานกลาง	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN22	ดี	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	globuse	สายยาว

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลต	การเจริญบนอาหาร ISP2	สีของ Substrate Mycelium	สีของ Aerial Mycelium	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ลักษณะของสปอร์	การจัดเรียงตัวของสปอร์
1	GWN23	ปานกลาง	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN24	ปานกลาง	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN26	ดี	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN30	น้อย	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN32	น้อย	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ovoid	สายยาว
	GWN36	ปานกลาง	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN38	ดี	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ovoid	สายยาว

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิตินอมีซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลต	การเจริญบนอาหาร ISP2	สีของ Substrate Mycelium	สีของ Aerial Mycelium	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ลักษณะของสปอร์	การจัดเรียงตัวของสปอร์
1	GWN44	ดี	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN45	ดี	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN50	ดี	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN52	น้อย	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN58	น้อย	Pale Yellow #F3E5AB	Grayish Yellow # C2B280	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
2	GWN02	น้อย	Deep Greenish yellow #9F8200	Pale Yellow #F3E5AB	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN05	ปานกลาง	Deep Greenish yellow #9F8200	Pale Yellow #F3E5AB	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลต	การเจริญบนอาหาร ISP2	สีของ Substrate Mycelium	สีของ Aerial Mycelium	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ลักษณะของสปอร์	การจัดเรียงตัวของสปอร์
2	GWN21	ปานกลาง	Deep Greenish yellow #9F8200	Pale Yellow #F3E5AB	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN54	ปานกลาง	Deep Greenish yellow #9F8200	Pale Yellow #F3E5AB	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
3	GWN04	ดี	Strong Orange yellow #EAA221	Pale Pink #FFCBBB	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายสั้น
	GWN34	ปานกลาง	Strong Orange yellow #EAA221	Pale Pink #FFCBBB	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายสั้น
4	GWN25	ดี	Brilliant Greenish yellow #FFDC33	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Ovoid	สายยาว
	GWN28	ดี	Brilliant Greenish yellow #FFDC33	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายสั้น
5	GWN06	ปานกลาง	Moderate Olive brown #64400F	Moderate Olive brown #6C541E	Strong Yellowish brown #996515	กลม	สายยาว

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิตินัมยีสท์ (ต่อ)

กลุ่ม ที่	หมายเลข ไอโซเลต	การเจริญบน อาหาร ISP2	สีของ Substrate Mycelium	สีของ Aerial Mycelium	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	ลักษณะ ของสปอร์	การจัดเรียงตัว ของสปอร์
5	GWN10	น้อย	Moderate Olive brown #64400F	Moderate Olive brown #6C541E	Strong Yellowish brown #996515	Rod	สายยาว
	GWN15	ดี	Moderate Olive brown #64400F	Moderate Olive brown #6C541E	Strong Yellowish brown #996515	Rod	สายยาว
	GWN17	ดี	Moderate Olive brown #64400F	Moderate Olive brown #6C541E	Strong Yellowish brown #996515	กลม	สายยาว
	GWN29	น้อย	Moderate Olive brown #64400F	Moderate Olive brown #6C541E	Strong Yellowish brown #996515	Rod	สายยาว
	GWN37	น้อย	Moderate Olive brown #64400F	Moderate Olive brown #6C541E	Strong Yellowish brown #996515	Rod	สายยาว

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่ม ที่	หมายเลข ไอโซเลต	การเจริญบน อาหาร ISP2	สีของ Substrate Mycelium	สีของ Aerial Mycelium	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	ลักษณะ ของสปอร์	การจัดเรียงตัว ของสปอร์
5	GWN39	น้อย	Moderate Olive brown #64400F	Moderate Olive brown #6C541E	Strong Yellowish brown #996515	กลม	สายยาว
	GWN40	น้อย	Moderate Olive brown #64400F	Moderate Olive brown #6C541E	Strong Yellowish brown #996515	Globuse	สายยาว
6	GWN07	ดี	Strong Greenish yellow #BEB72E	Light Green #6AAB8E	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Ovoid	Verticillati
	GWN59	ดี	Strong Greenish yellow #BEB72E	Light Green #6AAB8E	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
7	GWN09	ดี	Light Olive brown #967117	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN13	ดี	Light Olive brown #967117	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	กลม	Rectiflexibles

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่ม ที่	หมายเลขไอโซ เลต	การเจริญบน อาหาร ISP2	สีของ Substrate Mycelium	สีของ Aerial Mycelium	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	ลักษณะ ของสปอร์	การจัดเรียงตัวของ สปอร์
	GWN16	ปานกลาง	Light Olive brown #967117	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN55	ปานกลาง	Light Olive brown #967117	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN56	น้อย	Light Olive brown #967117	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN57	ปานกลาง	Light Olive brown #967117	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	กลม	สายยาว
	GWN60	ปานกลาง	Light Olive brown #967117	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
8	GWN31	ดี	Strong Yellowish brown #95500C	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Ovoid	สายยาว
	GWN33	ปานกลาง	Strong Yellowish brown #95500C	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่ม ที่	หมายเลขไอโซ เลต	การเจริญบน อาหาร ISP2	สีของ Substrate Mycelium	สีของ Aerial Mycelium	สีของรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	ลักษณะ ของสปอร์	การจัดเรียงตัว ของสปอร์
9	GWN14	ดี	Dark Yellow #AB9144	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN18	ดี	Dark Yellow #AB9144	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Ovoid	สายยาว
	GWN47	ปานกลาง	Dark Yellow #AB9144	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN48	ปานกลาง	Dark Yellow #AB9144	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN49	ดี	Dark Yellow #AB9144	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
	GWN53	ปานกลาง	Dark Yellow #AB9144	White #F2F3F4	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Ovoid	สายยาว
10	GWN41	ดี	Light Olive brown #945D08	Strong Yellowish brown #95500C	ไม่สร้างรงควัตถุ ที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่มที่	หมายเลขไอโซเลต	การเจริญบนอาหาร ISP2	สีของ Substrate Mycelium	สีของ Aerial Mycelium	สีของรงควัตถุที่ละลายน้ำ	ลักษณะของสปอร์	การจัดเรียงตัวของสปอร์
11	GWN42	ดี	Strong Brown #80461B	Pale Yellow green #DADFB7	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Rod	สายยาว
12	GWN46	ดี	Grayish Greenish Yellow #C4A55F	Pale Yellow green #DADFB7	ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ	Globuse	สายยาว

หมายเหตุ: #XXXXXX แสดงสัญลักษณ์ระบบสี RGB (red , green และ blue) ซึ่งเป็นระบบสีที่เกิดจากการรวมตัวของแสงสีแดง เขียว และน้ำเงิน เช่น #C4A55F สี Grayish Greenish Yellow

4.3.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ในการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร ป่าชายเลนอำเภอบางประกง จังหวัดฉะเชิงเทรา และ ศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี (ดังวิธีการที่ 3.9) มีการทดสอบทั้งสิ้น 5 การทดสอบ ได้แก่

1. การทดสอบการตกตะกอนนมในอาหาร Skim milk agar 10% ถ้าเกิดการตกตะกอนของโปรตีน จะเกิดเป็นตะกอนในน้ำนมบริเวณก้นหลอด โดยเทียบกับชุดควบคุม
2. การทดสอบย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar ถ้าเกิดการย่อยสลายโปรตีนจะมีการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารจากขาวขุ่นเป็นสีใส
3. การทดสอบการย่อยสลายเจลาตินในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth ถ้าเกิดการย่อยสลายเจลาติน จะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
4. การย่อยสลายไนเตรทในอาหารเหลว Peptone KNO₃ เมื่อทำการตรวจผลด้วย N,N-dimethyl-L-naphthylamine ถ้าเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้ จะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีแดง หลังหยดสารละลายทดสอบลงไป
5. การทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt – starch agar ทำการตรวจผลโดยเติมสารละลายแกรมไอโอดีนลงไปบนอาหาร ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้น จะเกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่กล่าวมาข้างต้นทั้ง 55 ไอโซเลต จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เป็น 12 กลุ่ม ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

กลุ่ม ที่	หมายเลข ไอโซเลต	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
		Coagulation	Peptonization			
1	GWN01	W	+	-	-	W
	GWN03	-	+	-	-	W
	GWN08	W	+	-	-	W
	GWN12	W	W	-	-	W
	GWN19	-	+	-	-	W
	GWN20	W	W	-	-	W
	GWN22	W	+	-	-	+
	GWN23	W	+	-	-	W
	GWN24	-	+	-	-	W
	GWN26	-	+	-	-	W
	GWN30	W	W	-	-	+
	GWN32	-	+	-	-	+
	GWN36	W	+	-	-	+
	GWN38	W	+	-	-	W
	GWN44	-	W	-	-	W
	GWN45	-	+	-	-	W
	GWN50	-	W	-	-	+
	GWN52	-	+	-	-	W
GWN58	-	W	-	-	W	
2	GWN02	W	+	-	-	W
	GWN05	W	+	-	-	+
	GWN21	+	+	+	-	W
	GWN54	-	-	+	-	W
3	GWN04	-	W	+	+	W
	GWN34	-	-	-	-	W
4	GWN25	-	W	-	+	+
	GWN28	W	-	+	-	-
5	GWN06	+	-	W	-	W
	GWN10	+	-	-	-	W

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท (ต่อ)

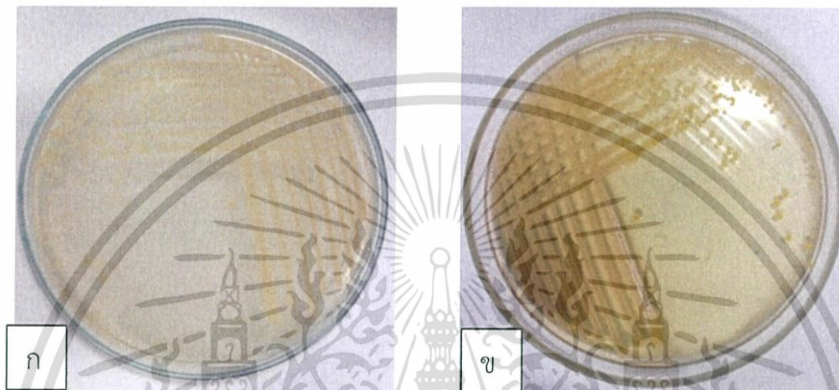
กลุ่ม ที่	หมายเลข ไอโซเลต	Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis
		Coagulation	Peptonization			
5	GWN15	W	W	W	-	-
	GWN17	W	W	W	-	-
	GWN29	W	-	-	-	W
	GWN37	+	-	-	-	-
	GWN39	+	-	-	-	-
	GWN40	+	W	-	-	-
6	GWN07	W	W	-	-	W
	GWN59	+	W	W	-	+
7	GWN09	-	W	+	-	-
	GWN13	W	-	-	-	+
	GWN16	+	-	-	-	-
	GWN55	-	-	+	-	W
	GWN56	-	-	-	-	W
	GWN57	-	-	+	-	+
	GWN60	-	+	-	+	W
8	GWN31	+	+	-	+	+
	GWN33	+	+	-	+	W
9	GWN14	W	+	-	-	+
	GWN18	-	-	+	-	+
	GWN47	-	-	+	-	+
	GWN48	-	-	+	-	W
	GWN49	-	+	+	-	W
	GWN53	-	-	+	-	-
10	GWN41	+	+	+	-	-
11	GWN42	+	-	-	-	W
12	GWN46	-	-	+	-	-

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีทสามารถจัดกลุ่มเชื้อที่แยกออกได้เป็น 12 กลุ่ม ดังนี้

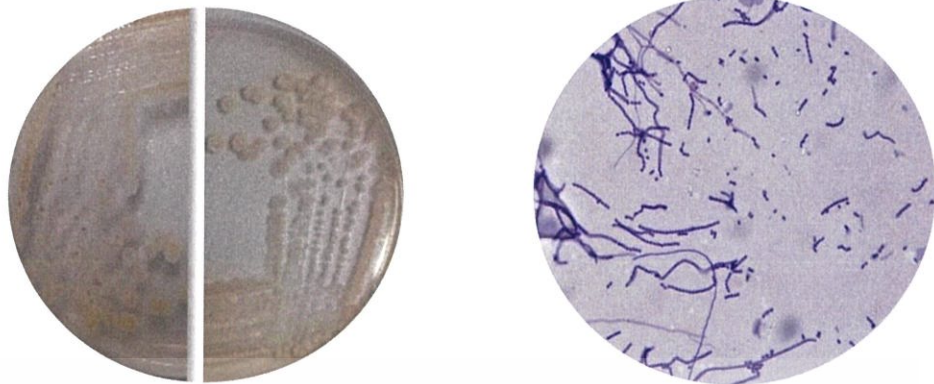
กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Grayish Yellow และสร้างเส้นใยอาหารสี Pale Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.1) มีสมาชิกทั้งหมด 19 ไอโซเลต ได้แก่ GWN01, GWN03, GWN08, GWN12, GWN19, GWN20, GWN22, GWN23, GWN24, GWN26, GWN30, GWN32, GWN36, GWN38, GWN44, GWN45, GWN50, GWN52 และ GWN58



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 1

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 1 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 1 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN01 สามารถตกตะกอนโปรตีนมได้เล็กน้อย และสามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมได้ สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรต (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะของโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.2)



ก ข

ค

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิติมัยซีทไอโซเลต GWN01

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิติมัยซีทไอโซเลต GWN01 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิติมัยซีทไอโซเลต GWN01 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN01 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN03 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่ย่อยสลายไนเตรต (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* TISTR 746, *Bacillus subtilis* TISTR 1248 และ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.3)



ก ข

ค

รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิติมัยซีทไอโซเลต GWN03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN03 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN03 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN03 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN08 สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมได้ ตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.4)

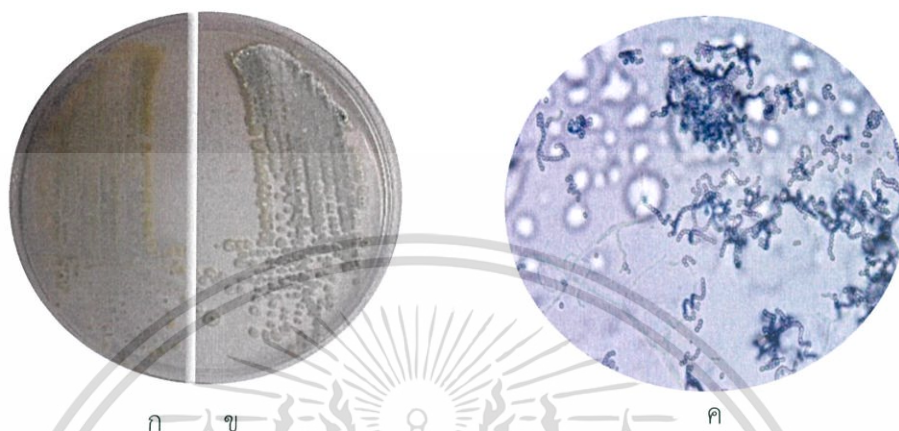


รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN08

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN08 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN08 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN08 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต GWN12 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้เล็กน้อย ย่อยสลายโปรตีนนม และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN12

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN12 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN12 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN12 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN19 สามารถย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมและย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN19

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN19 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN19 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN19 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN20 สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ย่อยสลายโปรตีนนม และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.7)

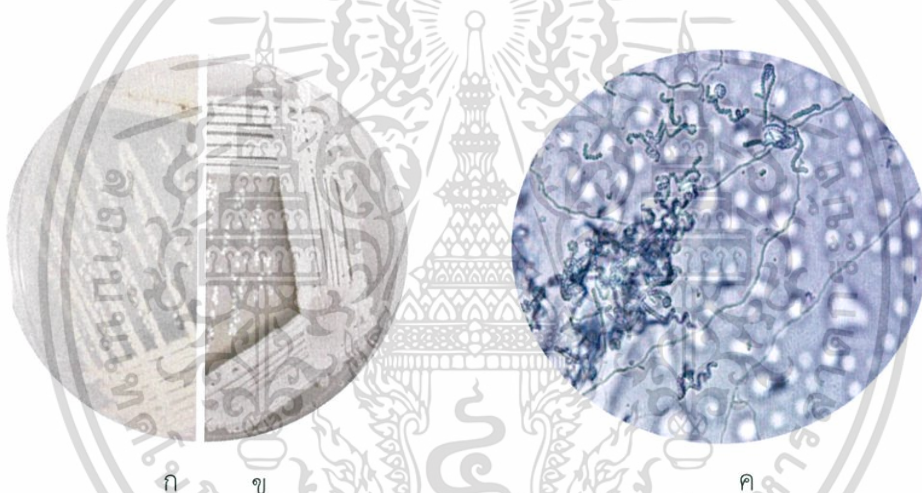


รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN20 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN20 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN20 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN22 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรต (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN22

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN22 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN22 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN22 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต GWN23 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถตกตะกอนโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.9)



ก

ข

ค

รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN23

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN23 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN23 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN23 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

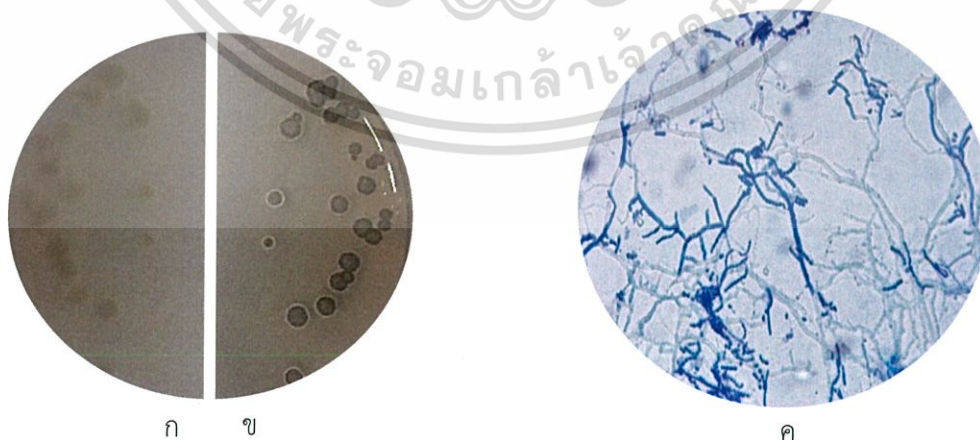
ไอโซเลต GWN24 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN24

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN24 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN24 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN24 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN26 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ ย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN26 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN26 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN26 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN30 สามารถตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายโปรตีนนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.12)

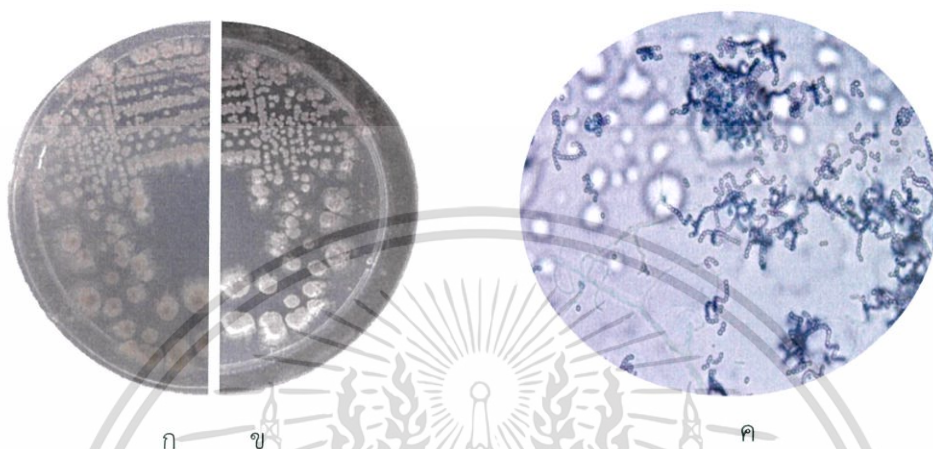


รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN30

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN30 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN30 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN30 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต GWN32 สามารถสลายโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต GWN32

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านข้างของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต GWN32 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต GWN32 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN32 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

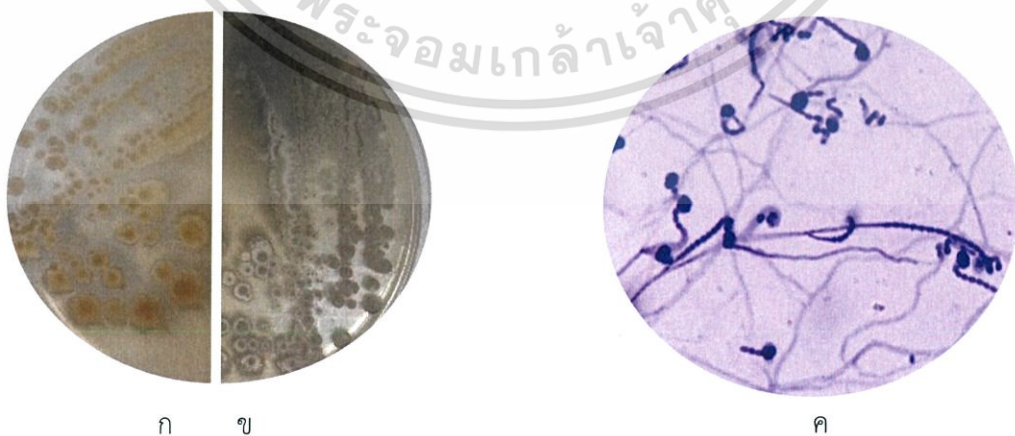
ไอโซเลต GWN36 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN36

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN36 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN36 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN36 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN38 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* TISTR 074 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.15)

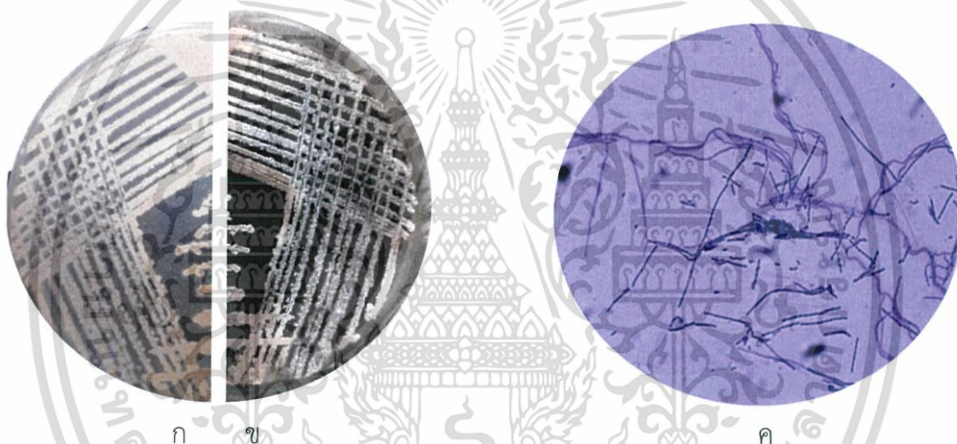


รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN38 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN38 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN38 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN44 สามารถย่อยสลายโปรตีนนม และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.16)

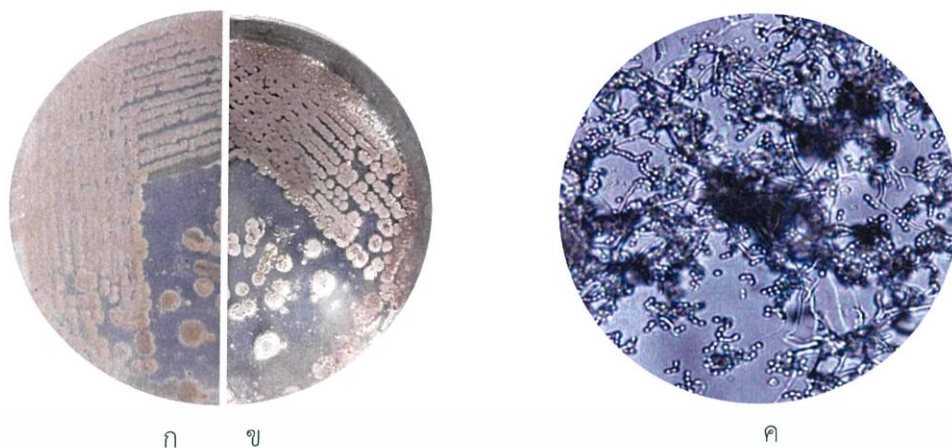


รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN44

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN44 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN44 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN44 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN45 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.17)

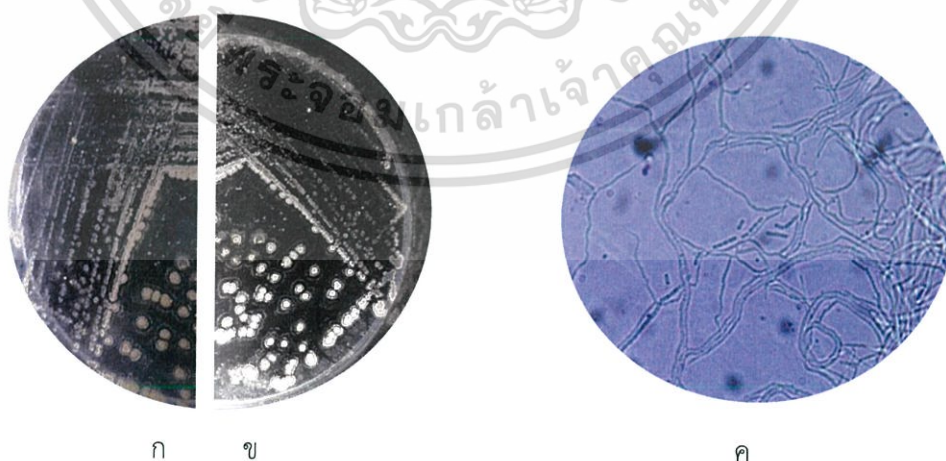
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN45

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN45 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN45 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN45 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN50 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.18)

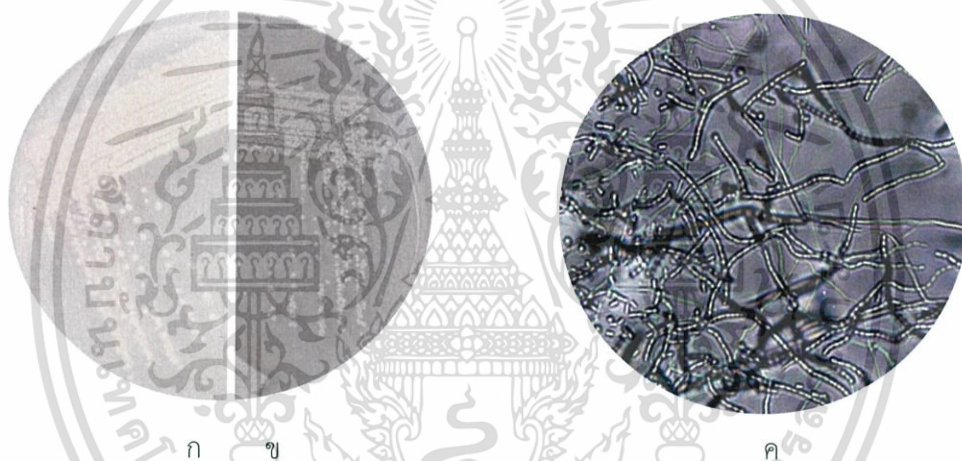


รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN50 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN50 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN50 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN52 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.19)



รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN52

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN52 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN52 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN52 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

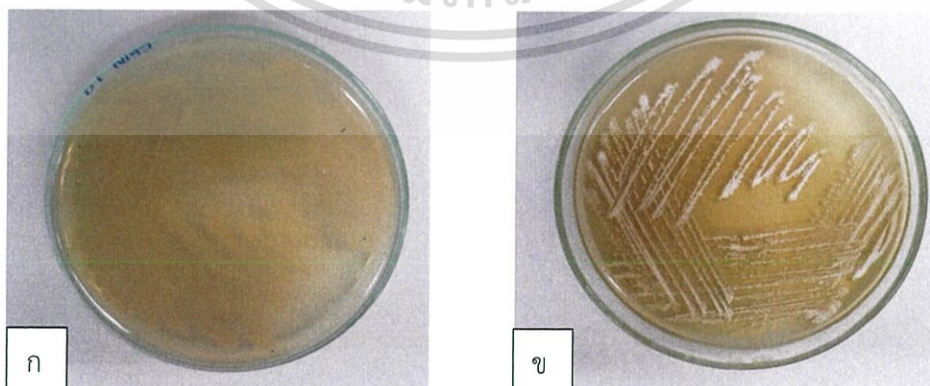
ไอโซเลต GWN58 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.20)



รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN58

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN58 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN58 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN58 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pale yellow และสร้างเส้นใยอาหารสี Deep greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.21) มีสมาชิกทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ GWN02, GWN05, GWN21 และ GWN54



รูปที่ 4.21 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 2 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 2 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

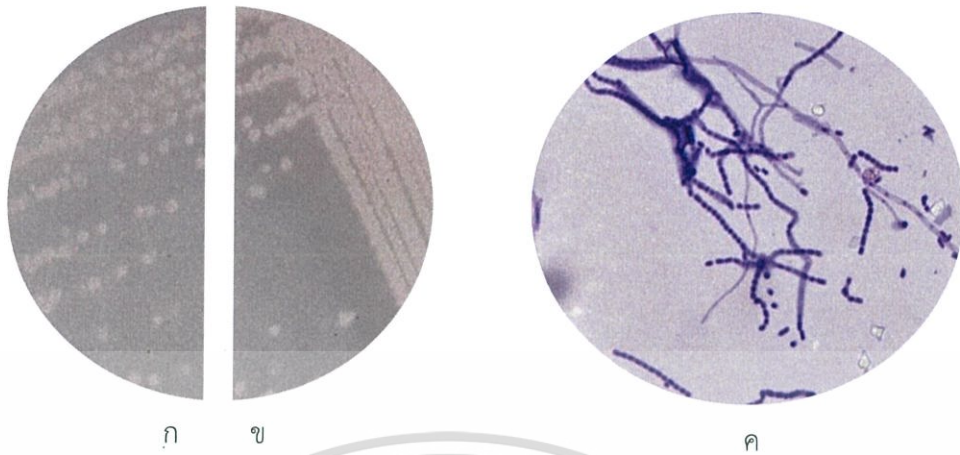
ไอโซเลต GWN02 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถตกตะกอนโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.22)



รูปที่ 4.22 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN02

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN02 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN02 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN02 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN05 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้เล็กน้อย สามารถตกตะกอนโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.23)



รูปที่ 4.23 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN05

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN05 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN05 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN05 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN21 สามารถย่อยสลายโปรตีนนม ตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายเจลาตินได้ สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารพิษเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.24)



รูปที่ 4.24 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN21 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN21 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN54 สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนม ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.25)

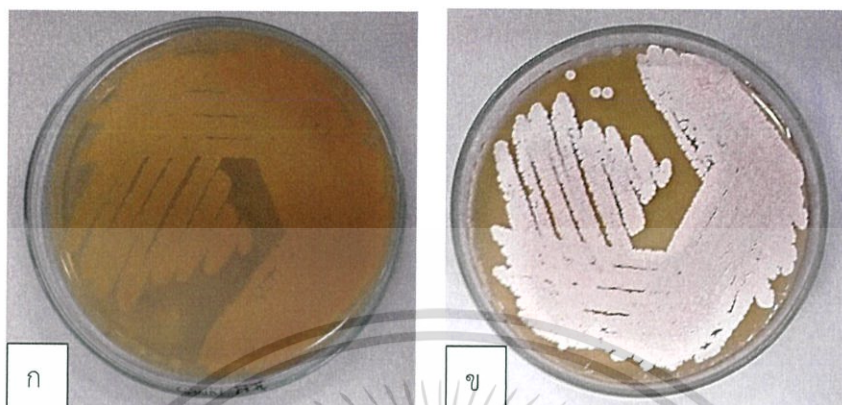


รูปที่ 4.25 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN54

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN54 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN54 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN54 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

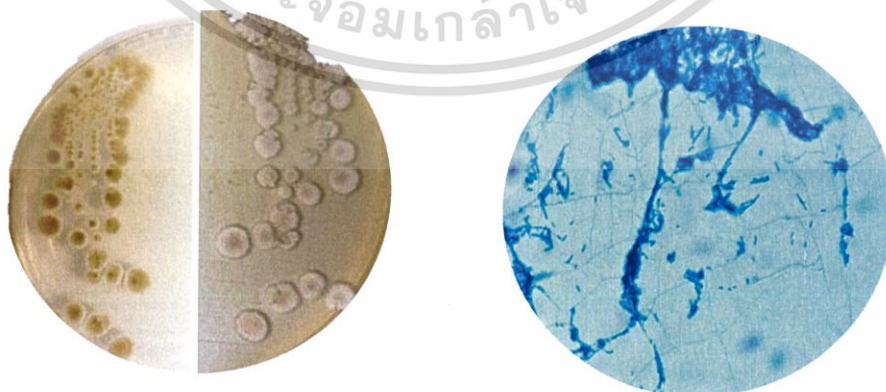
กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Pink และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong Orange Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.26) มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ GWN04 และ GWN34



รูปที่ 4.26 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 3

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 3 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 3 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN04 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย ย่อยสลายเจลาตินและย่อยสลายไนเตรตได้ แต่ไม่ตกตะกอนโปรตีนนม (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.27)



รูปที่ 4.27 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN04 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN04 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN04 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN34 สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 1248 และ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.28)

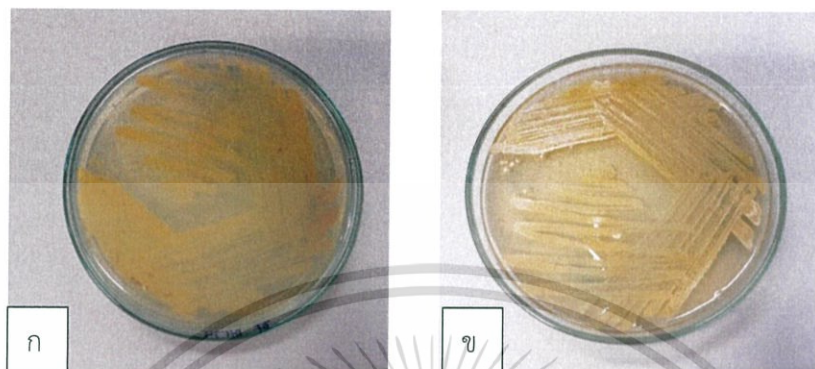


รูปที่ 4.28 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN34

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN34 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN34 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN34 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

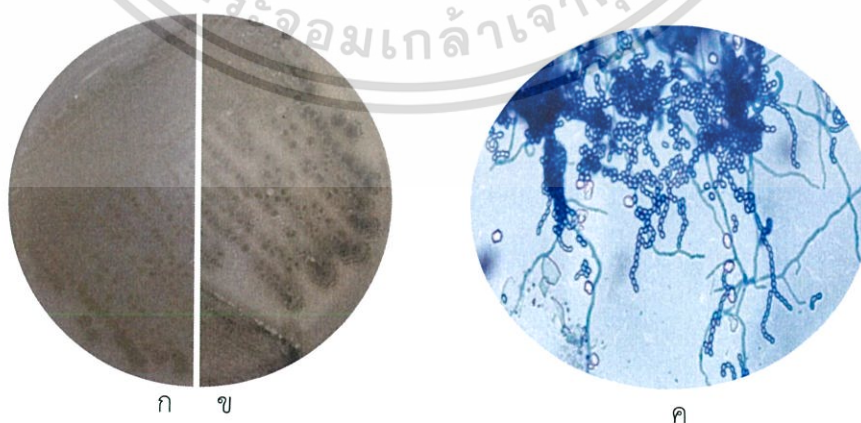
กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Brilliant Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.29) มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ GWN25 และ GWN28



รูปที่ 4.29 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 4

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 4 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 4 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN25 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้งและย่อยสลายไนเตรตได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และตกตะกอนโปรตีนนมได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.30)



รูปที่ 4.30 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN25 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN25 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN25 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN28 สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ สามารถตกตะกอนนมได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยแป้งและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.31)

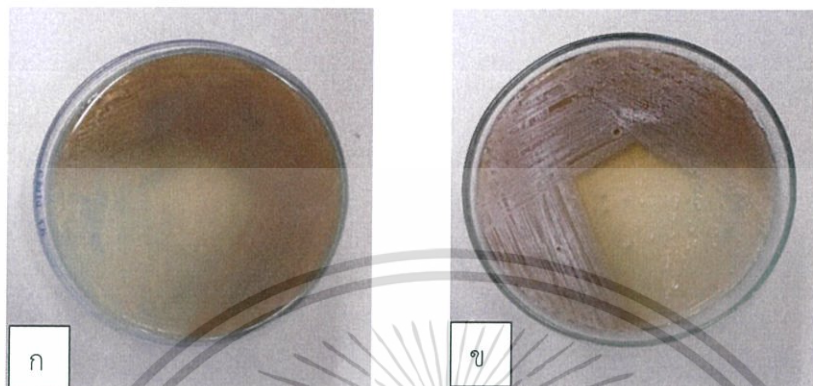


รูปที่ 4.31 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN28

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN28 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN28 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN28 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Olive brown และสร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Olive brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Strong Yellowish Brown บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.32) มีสมาชิกทั้งหมด 8 ไอโซเลต ได้แก่ GWN06, GWN10, GWN15, GWN17, GWN29, GWN37, GWN39 และ GWN40

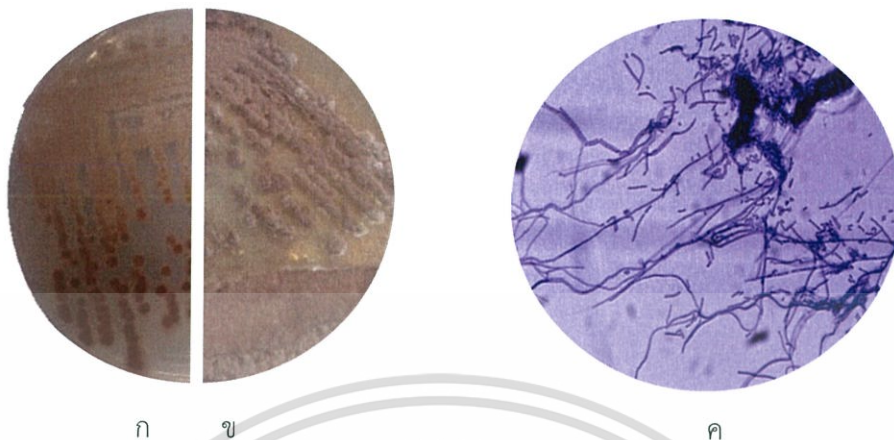


รูปที่ 4.32 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 5

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 5 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 5 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN06 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.33)

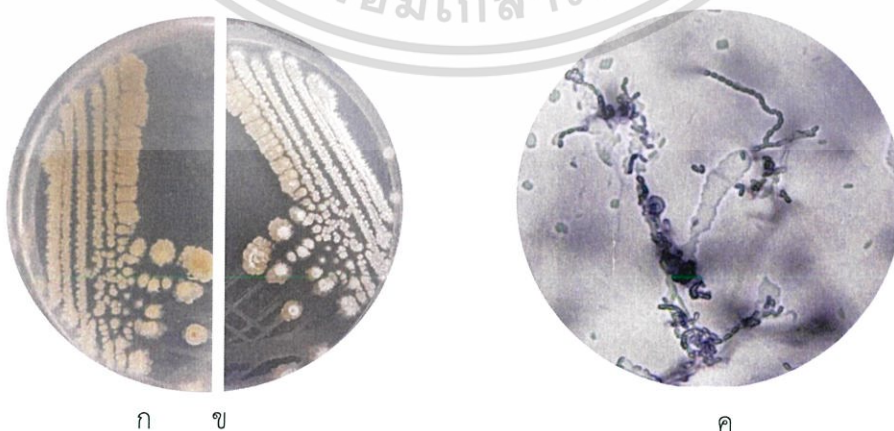
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.33 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลต GWN06

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลต GWN06 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลต GWN06 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN06 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN10 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ และสามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่า ไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.34)



รูปที่ 4.34 แสดงลักษณะของเชื้อแอสเพอริลลัสไอโซเลต GWN10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN10 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN10 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN15 สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ย่อยสลายโปรตีนนมและย่อยสลายเจลาตินได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายแป้งและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.35)



รูปที่ 4.35 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN15

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN15 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN15 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN15 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

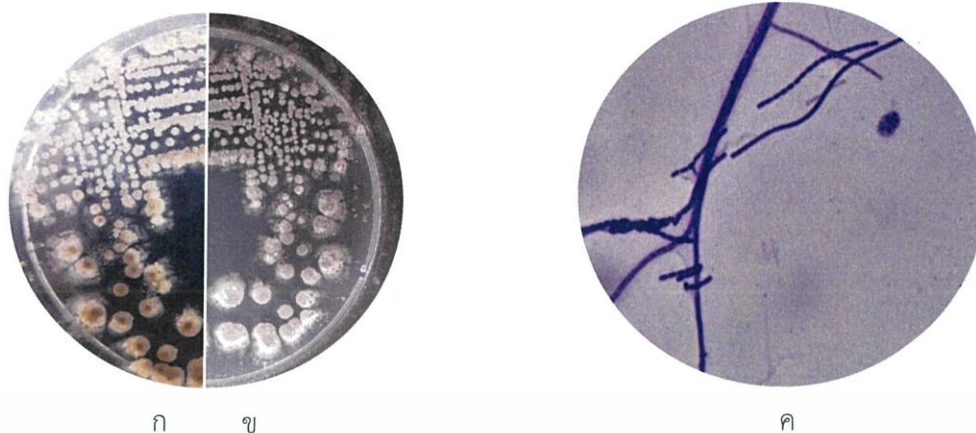
ไอโซเลต GWN17 สามารถตกตะกอนโปรตีนนม สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและย่อยสลายเจลาตินได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายแป้งและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.36)



รูปที่ 4.36 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN17

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN17 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN17 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN17 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

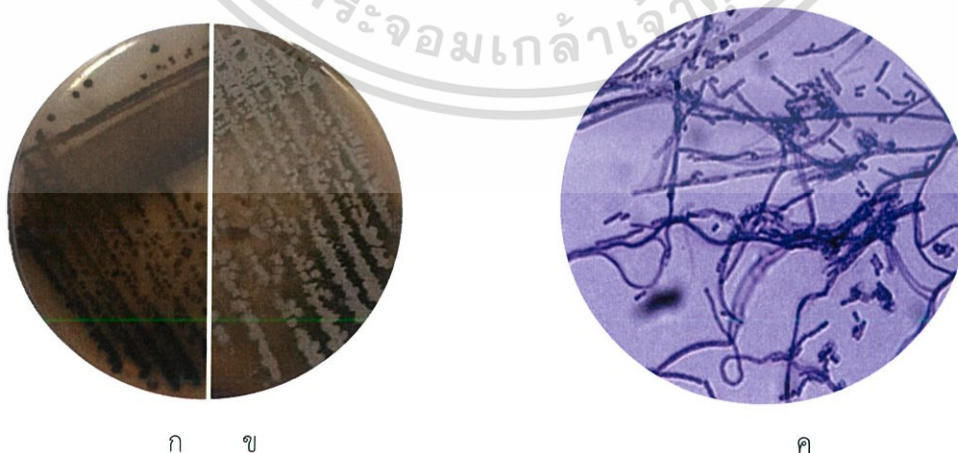
ไอโซเลต GWN29 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนม ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.37)



รูปที่ 4.37 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN29

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN29 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN29 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN29 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN37 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายแป้ง และไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* TISTR 074 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.38)



รูปที่ 4.38 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN37 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN37 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN37 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN39 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนม ไม่ย่อยสลายแป้ง และไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.39)

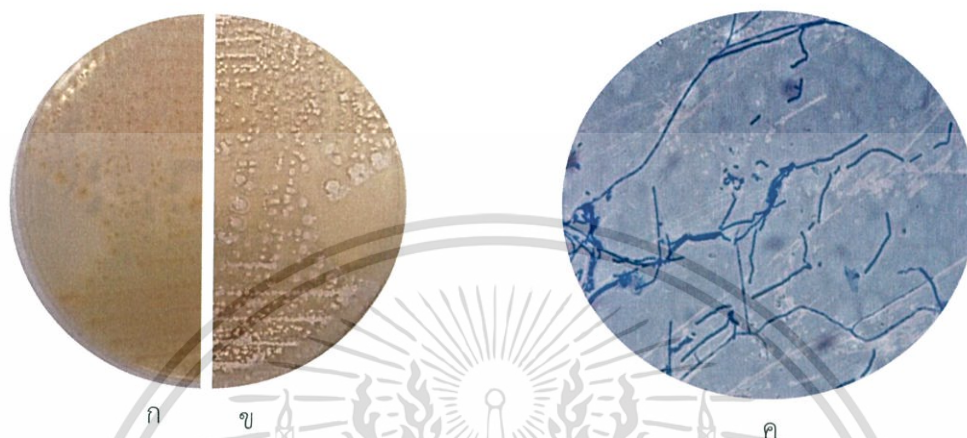


รูปที่ 4.39 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN39

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN39 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN39 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN39 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต GWN40 สามารถตกตะกอนโปรตีนนม สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายแป้ง ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารหุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.40)

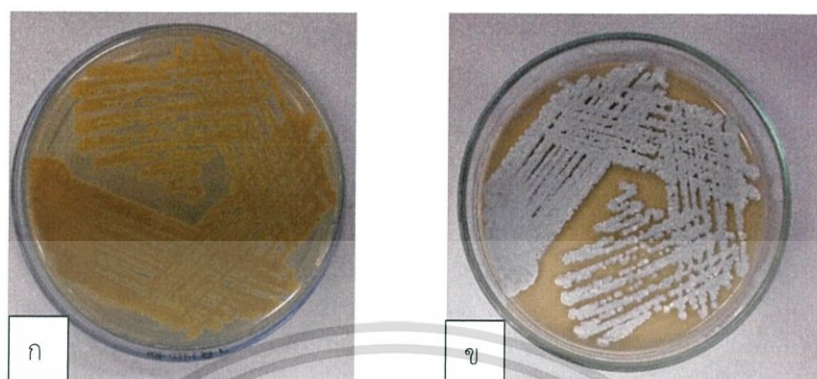


รูปที่ 4.40 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN40

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN40 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN40 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN40 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Light Green และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong Greenish yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.41) มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ GWN07 และ GWN59



รูปที่ 4.41 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 6

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 6 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 6 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN07 สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ย่อยสลายโปรตีนนมและย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.42)



รูปที่ 4.42 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN07 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN07 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN07 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN59 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายโปรตีนนม ย่อยสลายแป้ง และย่อยสลายเจลาตินได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.43)

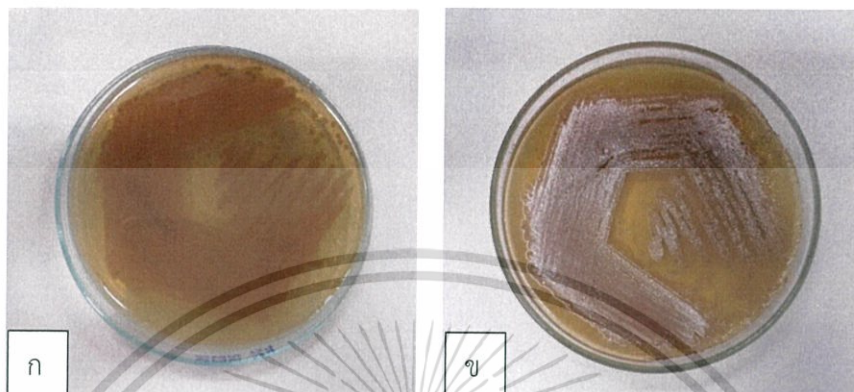


รูปที่ 4.43 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN59

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN59 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN59 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN59 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

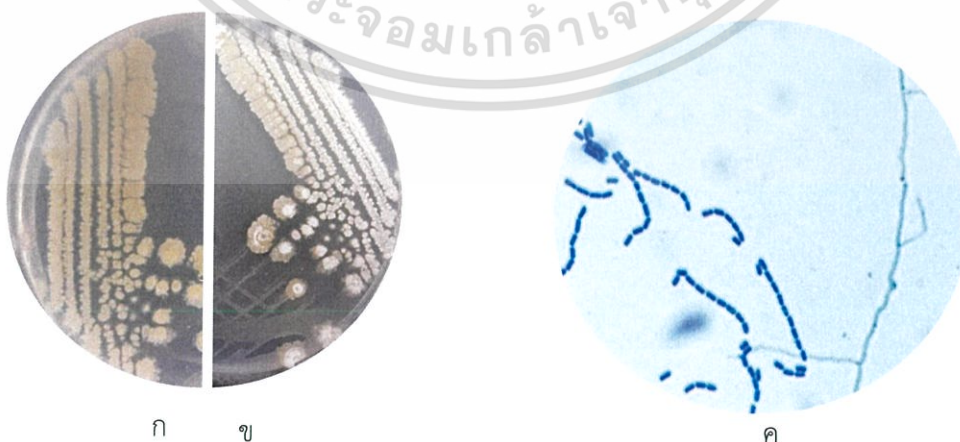
กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong Olive brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.41) มีสมาชิกทั้งหมด 7 ไอโซเลต ได้แก่ GWN09, GWN13, GWN16, GWN55, GWN56, GWN57 และ GWN60



รูปที่ 4.44 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 7

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 7 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 7 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN09 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถตกตะกอนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายแป้งและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.45)

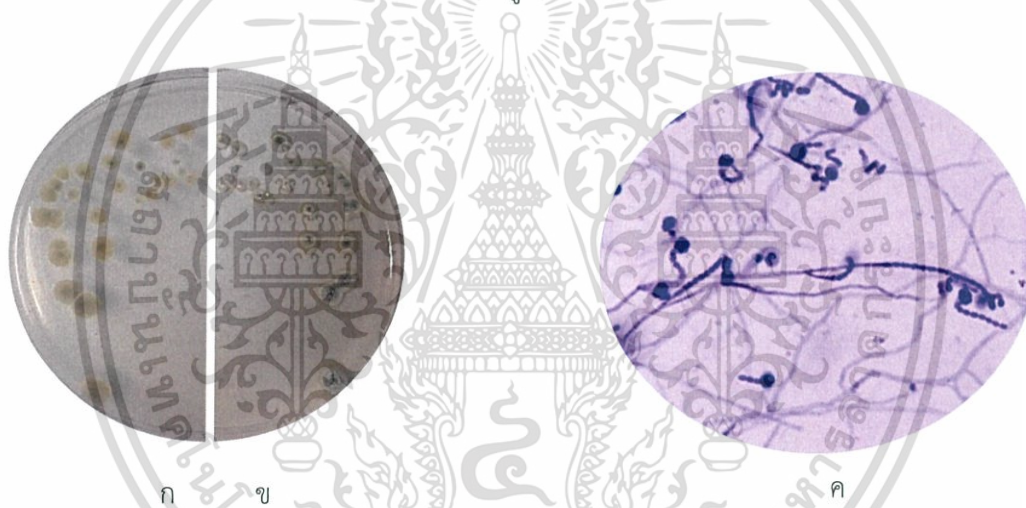


รูปที่ 4.45 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN09 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN09 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN09 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN13 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.46)

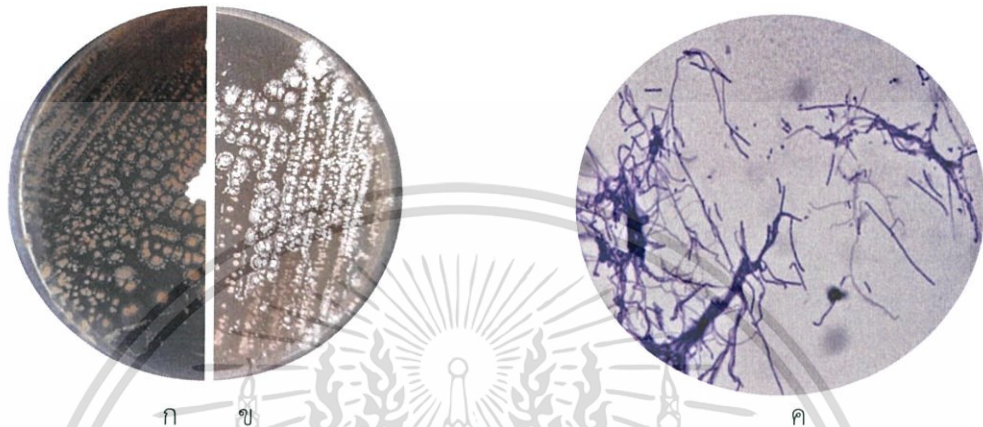


รูปที่ 4.46 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN13

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN13 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN13 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN13 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต GWN16 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ และย่อยสลายโปรตีนนมได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยแป้ง ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* TISTR1248, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.47)

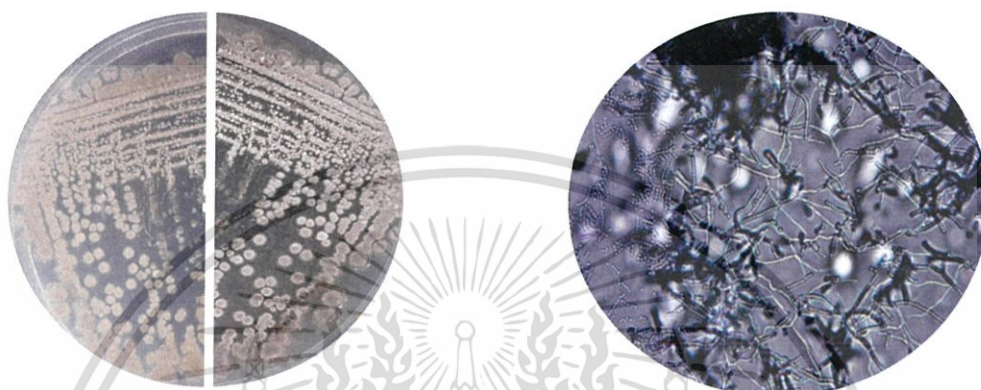


รูปที่ 4.47 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN16

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN16 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN16 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN16 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต GWN55 สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนมและย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.48)

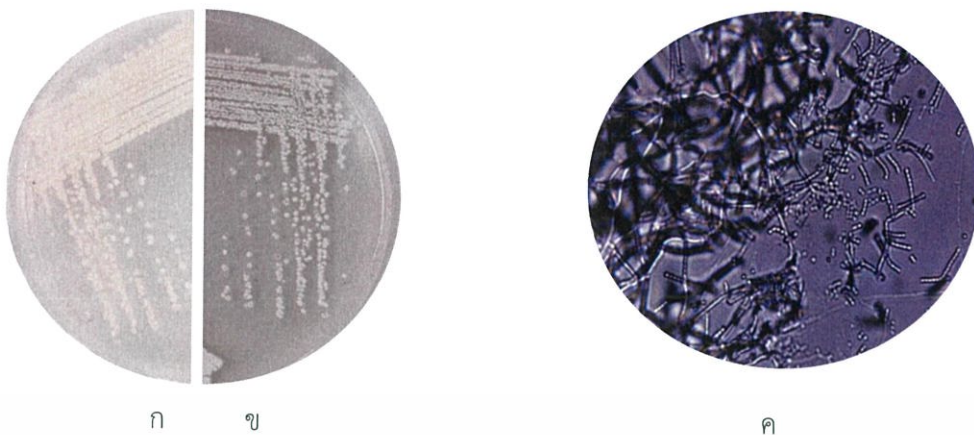


ก ข ค

รูปที่ 4.48 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN55

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN55 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN55 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN55 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

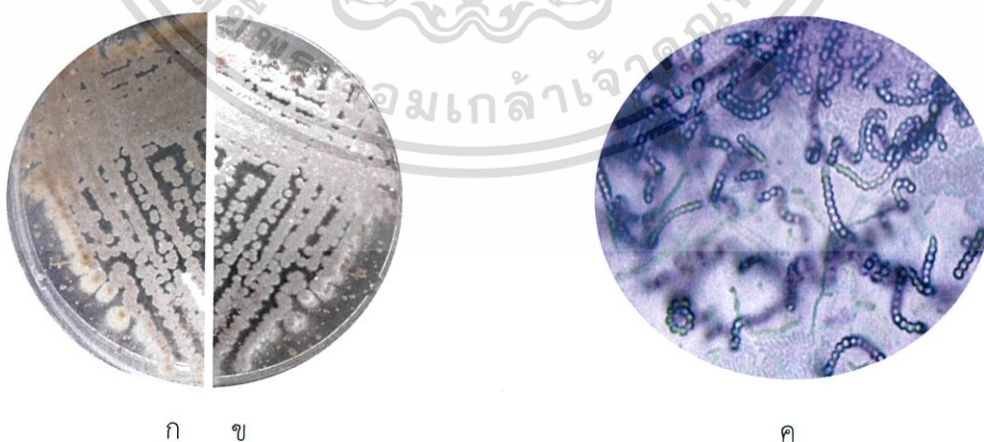
ไอโซเลต GWN56 สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนมและย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.49)



รูปที่ 4.49 แสดงลักษณะของเชื้อแลคโตค็อกคัสไอโซเลต GWN56

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแลคโตค็อกคัสไอโซเลต GWN56 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแลคโตค็อกคัสไอโซเลต GWN56 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN56 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN57 สามารถย่อยสลายแป้งและเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถตกตะกอนนม ไม่ย่อยสลายโปรตีนนม ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.50)



รูปที่ 4.50 แสดงลักษณะของเชื้อแลคโตค็อกคัสไอโซเลต GWN57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN57 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN57 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN57 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN60 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายในเตรตได้ และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนนมและไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.51)



รูปที่ 4.51 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN60

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN60 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN60 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN60 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong Yellowish Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.52) มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ GWN31 และ GWN33



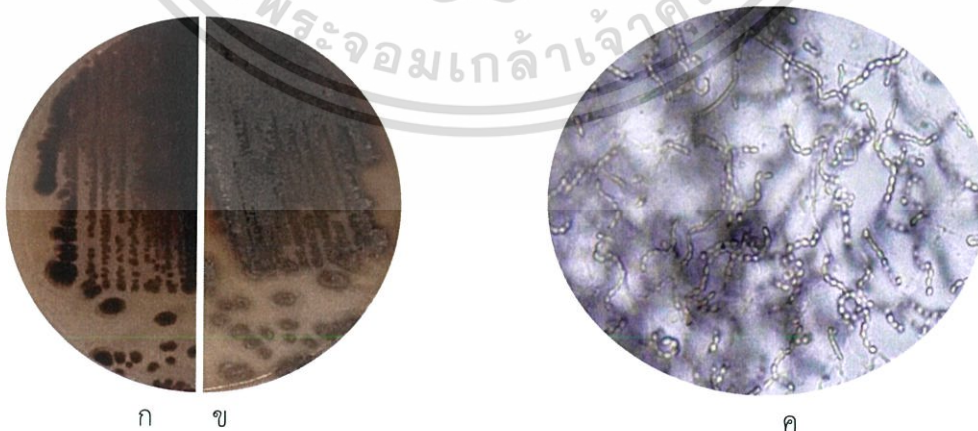
ก

ข

รูปที่ 4.52 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 8

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 8 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 8 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN31 สามารถตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ และย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.53)



ก ข

ค

รูปที่ 4.53 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN31 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN31 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN31 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN33 สามารถตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.54)

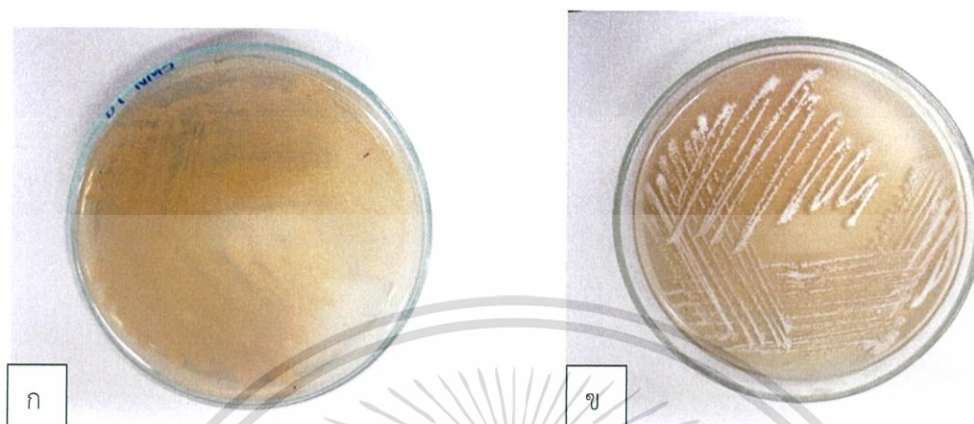


รูปที่ 4.54 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN33

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN33 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN33 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN33 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 9 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Dark Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.55) มีสมาชิกทั้งหมด 6 ไอโซเลต ได้แก่ GWN14, GWN18, GWN47, GWN48, GWN49 และ GWN53



รูปที่ 4.55 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทในกลุ่มที่ 9

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 9 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 9 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN14 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้เล็กน้อย สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ย่อยสลายไนเตรตและแป้งได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.56)



รูปที่ 4.56 แสดงลักษณะของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีทไอโซเลต GWN14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ง) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN14 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (จ) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN14 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ฉ) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN14 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN18 สามารถย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้ แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.57)

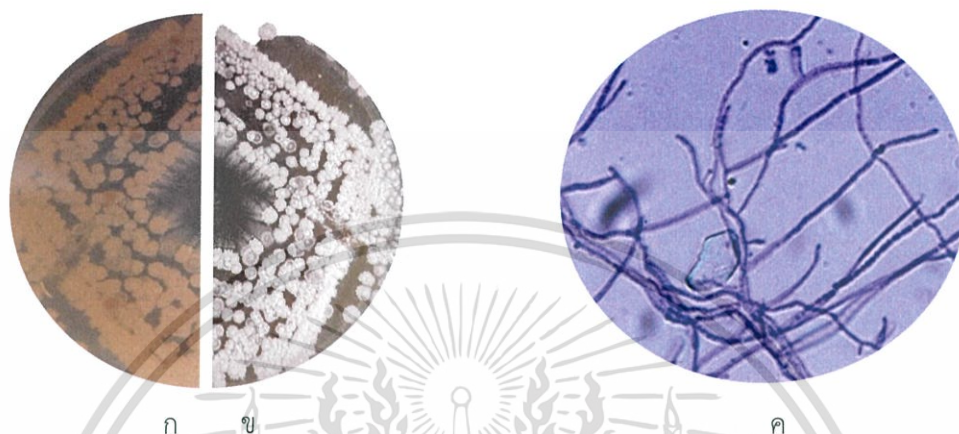


รูปที่ 4.57 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN18

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN18 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN18 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN18 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต GWN47 สามารถย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้ แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.58)



รูปที่ 4.58 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN47

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN47 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN47 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN47 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

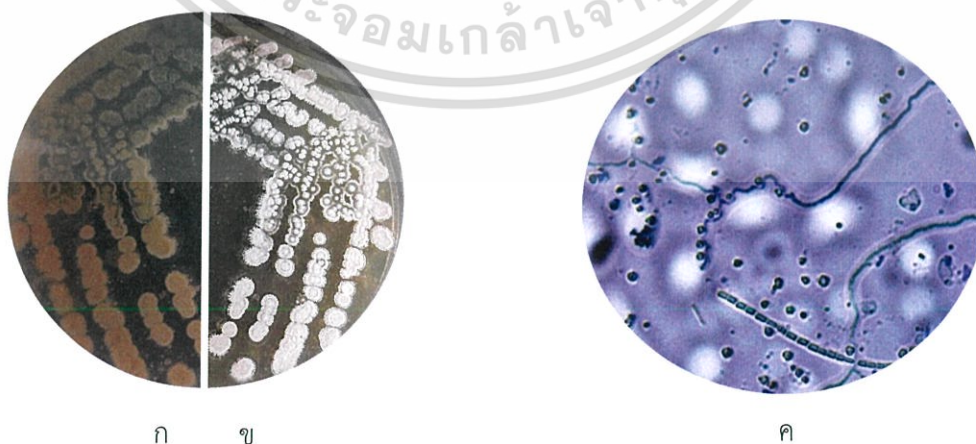
ไอโซเลต GWN48 สามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถตกตะกอนนมและย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* TISTR 074 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.59)



รูปที่ 4.59 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN48

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN48 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN48 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN48 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN49 สามารถย่อยสลายโปรตีนนมและย่อยสลายเจลาตินได้ สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนมและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารพิษภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.60)

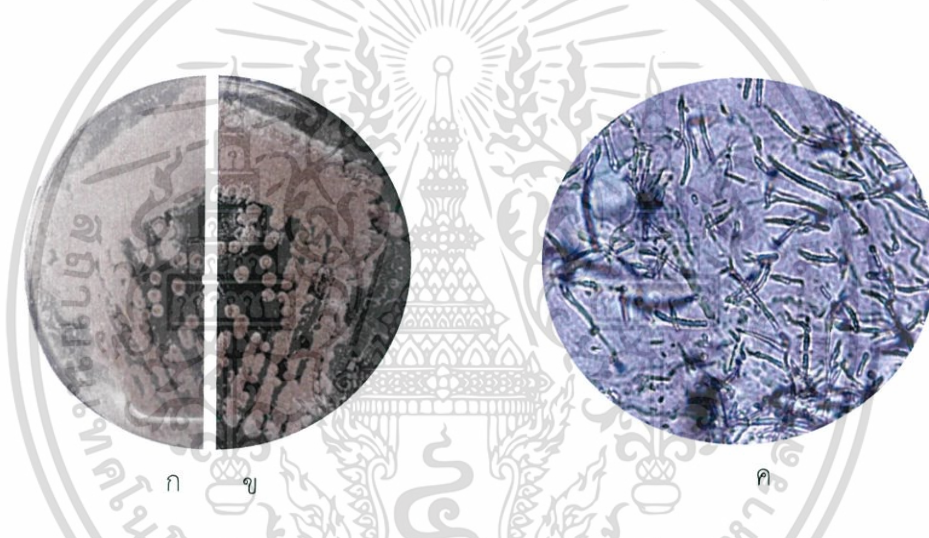


รูปที่ 4.60 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN49 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN49 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN49 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

ไอโซเลต GWN53 สามารถย่อยเจลาติน สามารถตกตะกอนโปรตีน แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ และสามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* TISTR 074 ได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.61)

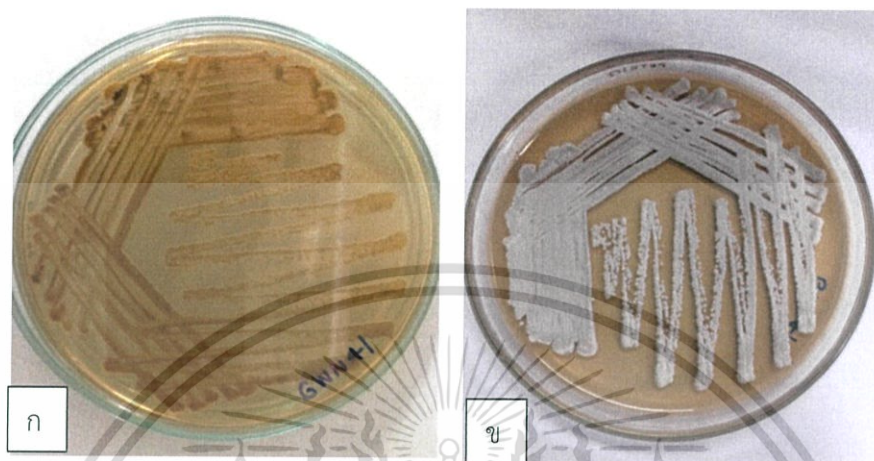


รูปที่ 4.61 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN53

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN53 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN53 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN53 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

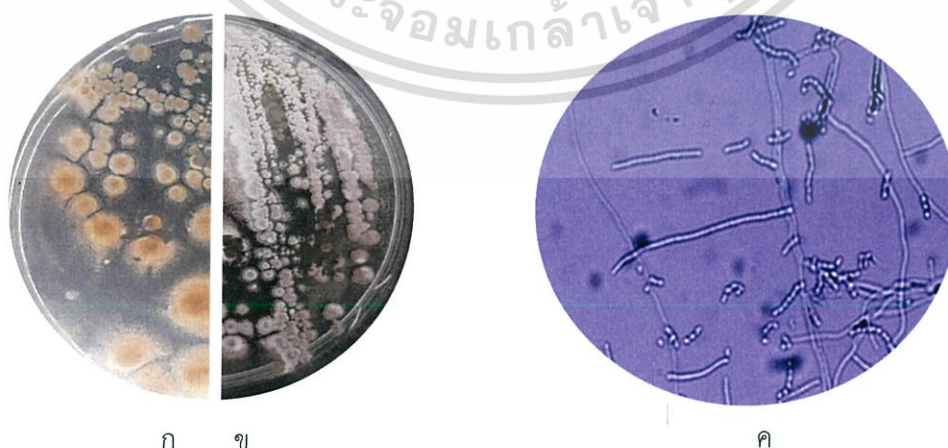
กลุ่มที่ 10 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Strong Yellowish brown และสร้างเส้นใยอาหารสี Light Olive brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.62) มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ได้แก่ GWN41



รูปที่ 4.62 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 10

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 10 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 10 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN41 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมและย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตและย่อยแป้งได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.63)



รูปที่ 4.63 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN41 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลต GWN41 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN41 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 11 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสคิตินมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Yellow green และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.64) มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ได้แก่ GWN42

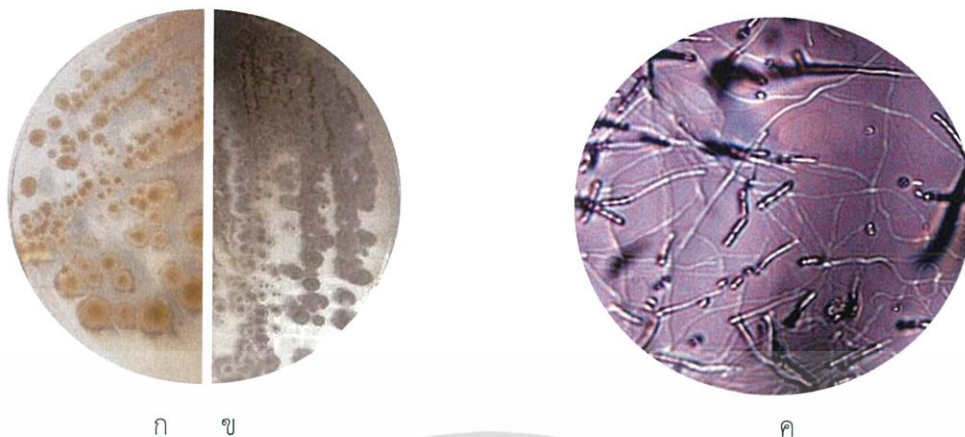


รูปที่ 4.64 แสดงลักษณะของเชื้อแอสคิตินมัยซีทในกลุ่มที่ 11

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 11 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสคิตินมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 11 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN42 สามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ และสามารถย่อยแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรด (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.65)

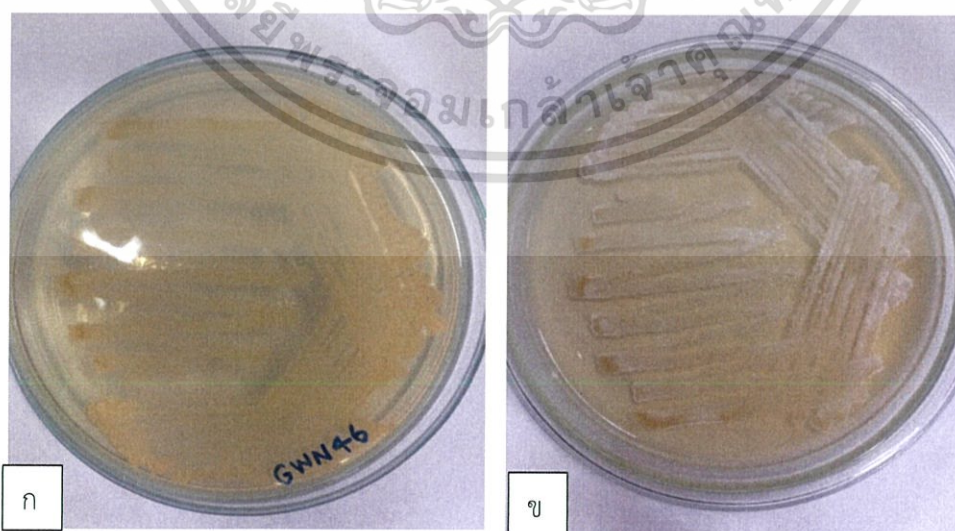
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.65 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN42

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN42 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN42 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN42 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

กลุ่มที่ 12 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellow green และสร้างเส้นใยอาหารสี Brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ บนอาหาร ISP medium no.2 (ดังรูปที่ 4.66) มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ได้แก่ GWN46



รูปที่ 4.66 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 12 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลตกลุ่มที่ 12 บนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract – malt extract agar) ระยะเวลา 7-14 วัน

ไอโซเลต GWN46 สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ ไม่สามารถตกตะกอนนมและย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายแป้งและย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบการผลิตสารทุติยภูมิเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต (ดังรูปที่ 4.67)



รูปที่ 4.67 แสดงลักษณะของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN46

- (ก) แสดงลักษณะโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN46 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ข) แสดงลักษณะโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN46 บนอาหาร SCA (Starch casein agar) ระยะเวลา 5-7 วัน
- (ค) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของไอโซเลต GWN46 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (กำลังขยายภาพ 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อทดสอบ

4.4.1 ผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยการทดสอบชั้นต้น (Agar cross streak)

เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 55 ไอโซเลต ถูกนำมาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อทดสอบ 6 ชนิด ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 และ *Escherichia coli* TISTR 074 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 1248, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* TISTR 5239 โดยใช้วิธีการทดสอบชั้นต้น (ดังวิธีการทดลองที่ 3.10) จากการทดสอบพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท 13 ไอโซเลตที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และมีจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ดังนี้

1. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 มีทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วยไอโซเลต GWN06 มีบริเวณยับยั้ง 32 มิลลิเมตร
2. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Escherichia coli* TISTR 074 มีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ประกอบด้วยไอโซเลต GWN06 มีบริเวณยับยั้ง 5 มิลลิเมตร, GWN37 มีบริเวณยับยั้ง 9 มิลลิเมตร, GWN38 มีบริเวณยับยั้ง 10 มิลลิเมตร, GWN48 มีบริเวณยับยั้ง 20 มิลลิเมตร และ GWN53 มีบริเวณยับยั้ง 12 มิลลิเมตร
3. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* TISTR 1248 มีทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN16 มีบริเวณยับยั้ง 18 มิลลิเมตร
4. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Micrococcus luteus* TISTR 2374 มีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN16 มีบริเวณยับยั้ง 23 มิลลิเมตร, GWN25 มีบริเวณยับยั้ง 30 มิลลิเมตร, GWN26 มีบริเวณยับยั้ง 12 มิลลิเมตร, GWN34 มีบริเวณยับยั้ง 11 มิลลิเมตร, และ GWN55 มีบริเวณยับยั้ง 20 มิลลิเมตร
5. เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR 746 มีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN03 มีบริเวณยับยั้ง 33 มิลลิเมตร, GWN04 มีบริเวณยับยั้ง 15 มิลลิเมตร, GWN06 มีบริเวณยับยั้ง 32 มิลลิเมตร, GWN40 มีบริเวณยับยั้ง 15 มิลลิเมตร และ GWN55 มีบริเวณยับยั้ง 10 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของแอคติโนไมซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

หมายเลข ไอโซเลต	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M.luteus</i>
	TISTR 5239	TISTR 746	TISTR 2870	TISTR 074	TISTR 1248	TISTR 42374
GWN01	-	-	-	-	-	-
GWN02	-	-	-	-	-	-
GWN03	-	33	-	-	-	-
GWN04	-	15	-	-	-	-
GWN05	-	-	-	-	-	-
GWN06	-	32	5	5	-	-
GWN07	-	-	-	-	-	-
GWN08	-	-	-	-	-	-
GWN09	-	-	-	-	-	-
GWN10	-	-	-	-	-	-
GWN12	-	-	-	-	-	-
GWN13	-	-	-	-	-	-
GWN14	-	-	-	-	-	-
GWN15	-	-	-	-	-	-
GWN16	-	-	-	-	18	23
GWN17	-	-	-	-	-	-
GWN18	-	-	-	-	-	-
GWN19	-	-	-	-	-	-
GWN20	-	-	-	-	-	-
GWN21	-	-	-	-	-	-
GWN22	-	-	-	-	-	-
GWN23	-	-	-	-	-	-
GWN24	-	-	-	-	-	-
GWN25	-	-	-	-	-	30
GWN26	-	-	-	-	-	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลต	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M.luteus</i>
	TISTR 5239	TISTR 746	TISTR 2870	TISTR 074	TISTR 1248	TISTR 42374
GWN28	-	-	-	-	-	-
GWN29	-	-	-	-	-	-
GWN30	-	-	-	-	-	-
GWN31	-	-	-	-	-	-
GWN32	-	-	-	-	-	-
GWN33	-	-	-	-	-	-
GWN34	-	-	-	-	11	11
GWN36	-	-	-	-	-	-
GWN37	-	-	-	9	-	-
GWN38	-	-	-	10	-	-
GWN39	-	-	-	-	-	-
GWN40	-	15	-	-	-	-
GWN41	-	-	-	-	-	-
GWN42	-	-	-	-	-	-
GWN44	-	-	-	-	-	-
GWN45	-	-	-	-	-	-
GWN46	-	-	-	-	-	-
GWN47	-	-	-	-	-	-
GWN48	-	-	-	20	-	-
GWN49	-	-	-	-	-	-
GWN50	-	-	-	-	-	-
GWN52	-	-	-	-	-	-
GWN53	-	-	-	12	-	-
GWN54	-	-	-	-	-	-
GWN55	-	10	-	-	-	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นของแอคติโนมัยซีที่ที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ต่อ)

หมายเลข ไอโซเลต	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)					
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M.luteus</i>
	TISTR 5239	TISTR 746	TISTR 2870	TISTR 074	TISTR 1248	TISTR 42374
GWN56	-	-	-	-	-	-
GWN57	-	-	-	-	-	-
GWN58	-	-	-	-	-	-
GWN59	-	-	-	-	-	-
GWN60	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ (+) : เชื้อแอคติโนมัยซีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้

(-) : เชื้อแอคติโนมัยซีที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

4.4.2 ผลทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพด้วยเทคนิค Agar disc diffusion

จากการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR1248, *Escherichia coli* TISTR074, *Micrococcus luteus* TISTR2374, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2870, *Staphylococcus aureus* TISTR746 และ *Candida albicans* TISTR5239 โดยลากเชื้อทดสอบตั้งฉากกับแอคติโนมายซีท (ดังวิธีการทดลอง 3.10) พบว่ามีเชื้อแอคติโนมายซีท 13 ไอโซเลตสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด แต่มีเชื้อแอคติโนมายซีท 6 ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด จึงได้นำทั้ง 6 ไอโซเลตนี้ มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อที่จะนำมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อสร้างขึ้น โดยสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตต และเมทานอล จากนั้นนำมาทำการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion (ดังวิธีการทดลองที่ 3.11) กับเชื้อทดสอบข้างต้น พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตและเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ พบว่าน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังตารางที่ 4.6) พบว่าเชื้อแอคติโนมายซีททั้ง 6 ไอโซเลตออกฤทธิ์ ด้านเชื้อทดสอบได้ดังนี้

1. เชื้อแอคติโนมายซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Bacillus subtilis* TISTR1248 มีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03, GWN04, GWN06, GWN48 และ GWN55 โดยไอโซเลต GWN06 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดได้ถึง 7.45 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)
2. เชื้อแอคติโนมายซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus luteus* TISTR2374 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ GWN16 และ GWN55 โดยไอโซเลต GWN16 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดถึง 9.45 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)
3. เชื้อแอคติโนมายซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 มีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ ได้แก่ GWN03, GWN06, GWN16, GWN48 และ GWN55 โดยไอโซเลต GWN03 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดถึง 8.45 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)

และจากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ พบว่าน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตต ที่ ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังตารางที่ 4.6) พบว่าเชื้อแอคติโนมายซีททั้ง 6 ไอโซเลตออกฤทธิ์ ด้านเชื้อทดสอบได้ดังนี้

1. เชื้อแอคติโนมายซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Bacillus subtilis* TISTR1248 มีทั้งหมด 6 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03, GWN04, GWN06, GWN16, GWN48 และ GWN55 โดยไอโซเลต GWN03 และ GWN06 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดได้ถึง 23.35 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)

2. เชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Escherichia coli* TISTR074 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03, และ GWN04 โดยไอโซเลต GWN03 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดได้ถึง 7.85 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)
3. เชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Micrococcus luteus* TISTR2374 มีทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03, GWN16, GWN48, และ GWN55 โดยไอโซเลต GWN55 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดได้ถึง 18.15 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)
4. เชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR2870 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03, GWN04 และ GWN55 โดยไอโซเลต GWN03 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดได้ถึง 10.45 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)
5. เชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Staphylococcus aureus* TISTR746 มีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03, GWN06, GWN16, GWN48 และ GWN55 โดยไอโซเลต GWN03 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดได้ถึง 23.35 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)
6. เชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Candida albicans* TISTR5239 มีทั้งหมด 6 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03, GWN04, GWN06, GWN16, GWN48 และ GWN55 โดยไอโซเลต GWN55 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดได้ถึง 12.64 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำหมักในชั้นของเอทิลอะซิเตต โดยเทคนิค agar disc diffusion

หมายเลขไอโซเลต	สารสกัดหยาบใน ชั้นเอทิลอะซิเตต (mg/ml)	บริเวณยับยั้ง (mm)					
		<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>M.luteus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
GWN03	1	7.14	-	-	-	8.45	-
	50	23.35	7.85	-	10.45	23.35	12.21
GWN04	1	6.45	-	-	-	-	-
	50	11.50	7.70	-	6.65	-	7.15
GWN06	1	7.40	-	-	-	8.15	-
	50	23.35	-	-	-	22.35	10.82
GWN16	1	-	-	-	-	7.45	-
	50	11.45	-	11.45	-	10.55	7.75
GWN48	1	7.45	-	-	-	7.5	-
	50	15.84	-	11.45	-	10.21	10.05
GWN55	1	6.50	-	7.45	-	-	-
	50	8.60	-	18.15	10.4	10.25	12.64

หมายเหตุ : รวมขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางแผ่นทดสอบ (ขนาด 6 มิลลิเมตร)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ พบว่าน้ำหมักจากตัวเซลล์ในชั้นเมทานอล ที่ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.7 พบว่าเชื้อแอสคิตินอิมยซีททั้ง 6 ไอโซเลตออกฤทธิ์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ พบว่าน้ำหมักจากตัวเซลล์ในชั้นเมทานอล ที่ ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.7 พบว่าเชื้อแอสคิตินอิมยซีททั้ง 6 ไอโซเลตออกฤทธิ์ ด้านเชื้อทดสอบได้ดังนี้

1. เชื้อแอสคิตินอิมยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Bacillus subtilis* TISTR1248 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03, GWN04 และ GWN06 โดยไอโซเลต GWN06 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดได้ถึง 10.40 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)
2. เชื้อแอสคิตินอิมยซีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Staphylococcus aureus* TISTR746 มีทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03 และ GWN06 โดยไอโซเลต GWN03 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดได้ถึง 10.55 มิลลิเมตร (รวมขนาดของแผ่นทดสอบ)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวเซลล์ในชั้นของเอทิลอะซิเตต โดยเทคนิค agar disc diffusion

หมายเลขไอโซเลต	สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต (mg/ml)	บริเวณยับยั้ง (mm)					
		<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>M.luteus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
GWN03	1	-	-	-	-	-	-
	50	10.40	-	-	-	10.55	-
GWN04	1	-	-	-	-	-	-
	50	10.00	-	-	-	-	-
GWN06	1	-	-	-	-	-	-
	50	9.00	-	-	-	9.00	-
GWN16	1	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
GWN48	1	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
GWN55	1	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-

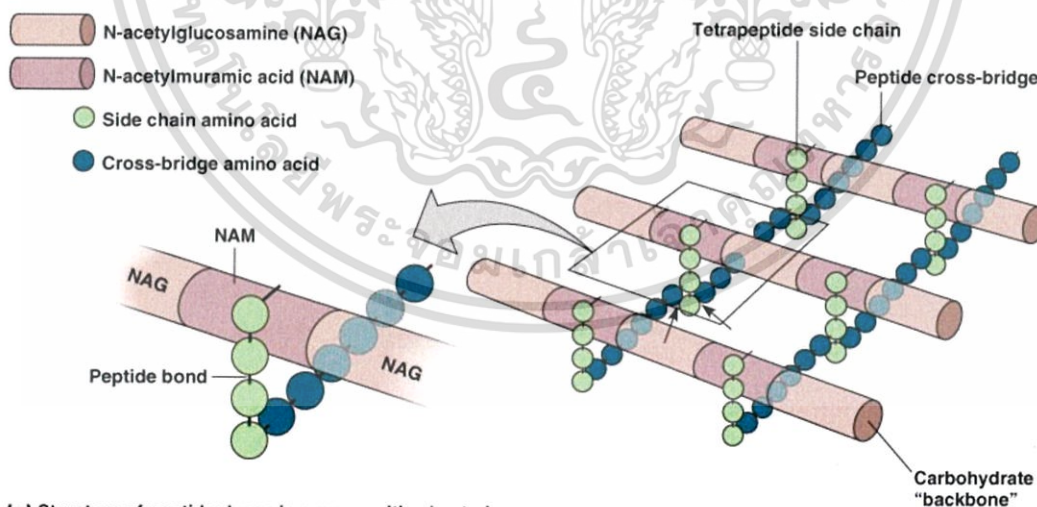
หมายเหตุ : รวมขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางแผ่นทดสอบ (ขนาด 6 มิลลิเมตร)

จากการทดสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตตออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 6 ชนิดได้ดีกว่าสารสกัดจากตัวเซลล์ในชั้นเมทานอล โดยพบว่าสารสกัดจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าไอโซเลต GWN48 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248 ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 7.45 มิลลิเมตร และสารสกัดที่ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลต GWN03 และ GWN06 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248 ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้งเท่ากันคือ 23.35 มิลลิเมตร สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* TISTR074 ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลต GWN03 มีบริเวณยับยั้ง 7.85 มิลลิเมตร สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลต GWN55 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 7.45 มิลลิเมตร และที่ความเข้มข้นของสารสกัด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าไอโซเลต GWN55 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดถึง 18.15 มิลลิเมตร สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลต GWN03 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 10.45 มิลลิเมตร สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไอโซเลต GWN03 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 8.45 มิลลิเมตร และที่ความเข้มข้นของสารสกัด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าไอโซเลต GWN03 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งสูงที่สุดถึง 23.35 มิลลิเมตร และสารสกัดจากน้ำหมักที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* TISTR 5239 ได้ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าไอโซเลต GWN55 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 12.64 มิลลิเมตร

สารสกัดที่ได้จากตัวเซลล์ในชั้นของเมทานอลพบว่า สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 1248 ได้ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าไอโซเลต GWN03 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 10.40 มิลลิเมตร และสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าไอโซเลต GWN03 สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งถึง 10.55 มิลลิเมตร

แอกติโนมัยซีทที่คัดแยกได้จากดินศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร, ดินป่าชายเลนอำเภอบางประกง จังหวัดฉะเชิงเทรา และดินศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี พบว่าส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Janpen *et al.* (2017) ที่รายงานว่าได้ทำการคัดแยกแอกติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี พบว่าแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* ได้ และพบว่าแอกติโนมัยซีทที่ทำการคัดแยกได้นั้นยับยั้งแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Wongsakorn *et al.* (2014) รายงานว่าแอกติโนมัยซีทจากจังหวัดสมุทรสาคร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการทดสอบเบื้องต้นพบว่าแอกติโนมัยซีททั้งหมด 55 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 22 สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้

สาเหตุที่แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ เนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม และกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่แอกติโนมัยซีทสร้างขึ้น โดยกลไกของยามีผลต่อการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) (Kusakabe *et al.*, 1998) ซึ่งจะไปทำลายพันธะระหว่าง N-acetyl glucosamine และ N-acetyl muramic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (รูปที่ 4.68) ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย



(a) Structure of peptidoglycan in gram-positive bacteria

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

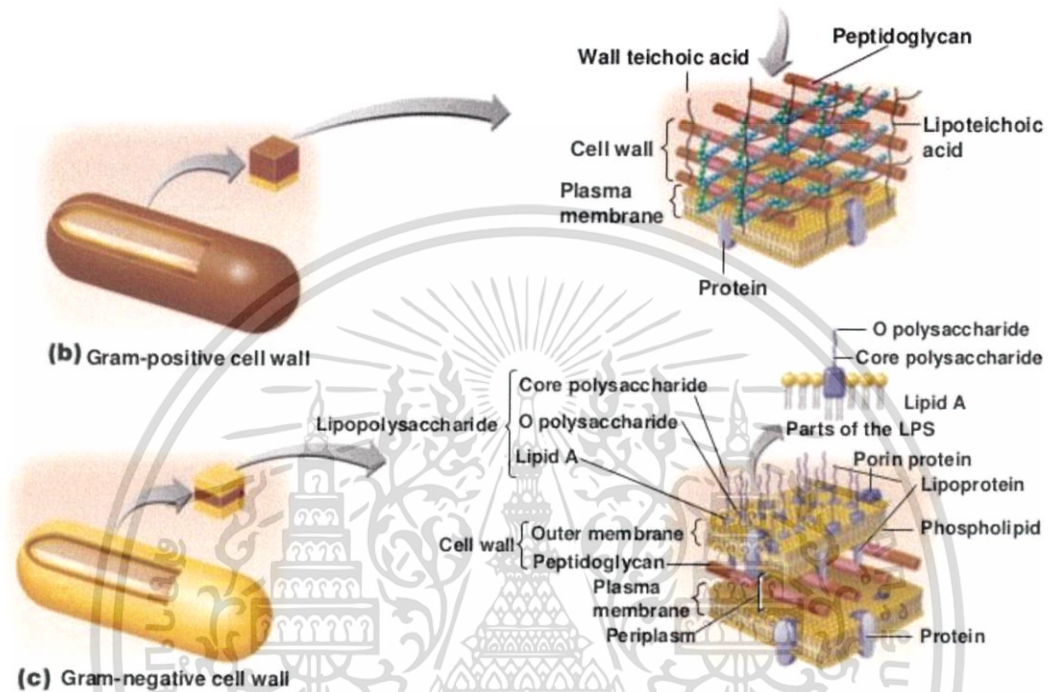
รูปที่ 4.68 โครงสร้างเปปติโดไกลแคนในแบคทีเรีย

ที่มา <http://antibioticslvsm.weebly.com/mechanism-of-action.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของเปปติโดไกลแคนมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะมีชั้นของเปปติโดไกลแคนที่บางกว่า และจะมีชั้นไขมันหนา (lipopolysaccharide) ทำให้ยาปฏิชีวนะที่มีกลไกในการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ส่งผลกับแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ (Byrne, 2011) ดังรูปที่ 4.69

Figure 4.13b-c Bacterial cell walls.



รูปที่ 4.69 แสดงโครงสร้างของชั้นเปปติโดไกลแคนของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม
ที่มา <https://www.slideshare.net/beltonrachel/1-microbial-world-and-prokaryotic-cell-anatomy>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทโดยการใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

ในการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทเริ่มจากการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีความโดดเด่นในการสร้างสารปฏิชีวนะมาจำนวน 6 ไอโซเลต จากนั้นทำการเชื้อเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็งมาลงในอาหารเหลว Yeast extract – malt extract agar (YEME) broth แล้วเอามาเลี้ยงในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อทำการ pre-germination เพื่อให้เชื้อมีความพร้อมก่อนที่จะถ่ายเชื้อไปทำการเลี้ยงต่อในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 250 ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เซลล์มากที่สุดและเพียงพอที่จะนำมาใช้ศึกษา จากนั้นเอาน้ำหมักที่ได้มาปั่นเหวี่ยงเลือกเก็บตะกอนเซลล์ใส่ลงใน microcentrifuge tube ชั่งตะกอนเซลล์ให้ได้ 100 มิลลิกรัม (ดังวิธีการทดลองที่ 3.12.1.1) จากนั้นนำไปทำการสกัดฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วยการเติม คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำไปผสมบนเครื่อง vertex เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นนำมาระเหยแห้ง และทำการ resuspention ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 6-9 ไมโครลิตร จากนั้นใช้อัตราเปิดดูดสารที่ได้มาสปอตลงบนแผ่น TLC ครั้งละ 2 ไมโครลิตร และเว้นจุดแรกไว้เพื่อทำการหาค่า standard 3 ชนิด ได้แก่ L- α -phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt from egg yolk lecithin (PG), 3-sn phosphatidylethanolamine from bovine brain (PE) และ cardiolipin sodium salt from bovine heart (CL) เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบกับ unknown spot

Mobile phase ที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:12:15:4 จากนั้นนำแผ่น TLC ที่สปอตแล้วรอให้แห้งนำมาใส่ไว้ใน tank บล๊อคให้ตัวทำละลายขึ้นมาจนประมาณ $\frac{3}{4}$ ของความสูงของแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ออกและทำเครื่องหมายตามแนวของตัวทำละลาย เมื่อแผ่น TLC แห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำแผ่นไปฉีดพ่นด้วยสารละลาย ammonium molybdate จะเห็นจุดสีน้ำเงินบริเวณที่มีสารตัวอย่าง และนำไปอบในตู้ incubator ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นให้ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดต่างๆบนแผ่น TLC แล้วจึงวัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการคำนวณหาอัตราค่า rate of flow (R_f)

จากการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีท 6 ไอโซเลตมาทำ Thin layer chromatography สามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 4.70 ซึ่งเปรียบเทียบกับจุด unknown spot กับ standard ที่หยดไว้ซึ่งจะเกิดสปอต 3 จุดเรียงกันได้แก่ CL PE และ PG จุดที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำไปใช้เป็นจุดอ้างอิงและระบุชนิดของสารตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษา

ผลจากการทำ TLC และฉีดพ่นด้วยสารละลาย molybdenum blue spray reagent ที่ทิ้งไว้ 2-3 นาที จะเห็นจุดสีฟ้าเกิดขึ้นบนแผ่น TLC ที่ได้จากการสปอตสารตัวอย่างของไอโซเลต GWN03 , GWN04 , GWN06 , GWN16 , GWN48 และ GWN55 ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวพบว่า 6 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03 , GWN04 , GWN06 , GWN16 , GWN48 และ GWN55 สร้างพอสโพลิปิด ชนิด PE และ PG ไม่พบ unknown spot ในตำแหน่ง CL



รูปที่ 4.70 แสดงชนิดของพอสโพลิปิดบนแผ่นโครมาโตกราฟีเทียบกับสาร standard ผลจากการทำ thin layer chromatography เพื่อศึกษาพอสโพลิปิดจากสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีท ในระยะ log phase ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ของเชื้อ 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต GWN03, GWN04 , GWN06 , GWN16 , GWN48 และ GWN55 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

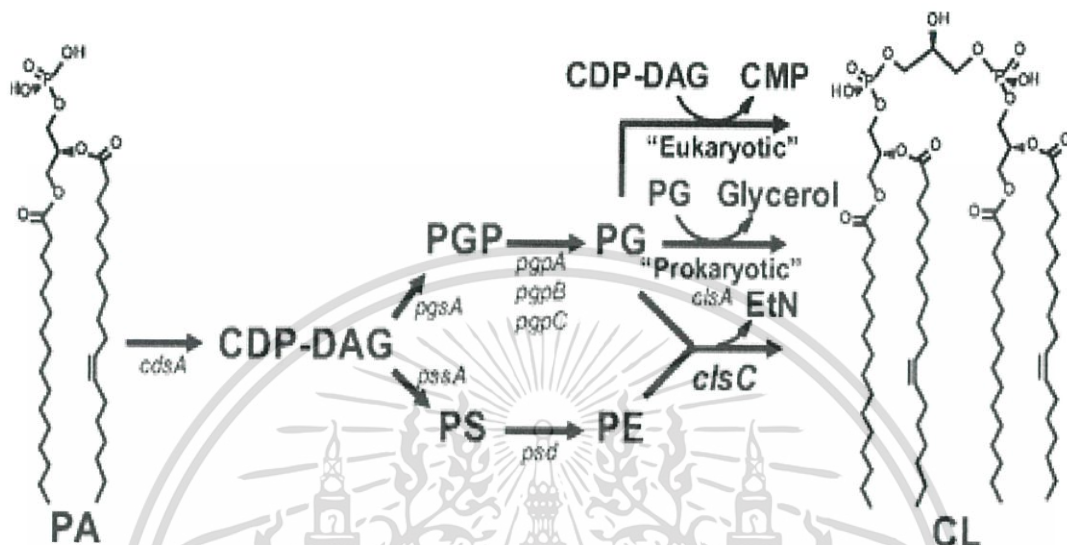
$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัซซีท์ที่ถูกคัดเลือก 6 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

หมายเลข ไอโซเลต	ชนิดของฟอสโฟลิปิด					
	Phosphatidylglycerol (PG)		Phosphatidylethaolamine (PE)		Cardiolipin (CL)	
	ตำแหน่ง	ค่า R_f	ตำแหน่ง	ค่า R_f	ตำแหน่ง	ค่า R_f
standard	PG	0.36	PE	0.72	CL	0.81
3	C1	0.37	B1	0.65	-	-
4	C2	0.35	B2	0.63	-	-
6	C3	0.35	B3	0.63	-	-
16	C4	0.36	B4	0.63	-	-
48	C5	0.39	B5	0.62	-	-
55	C6	0.38	B6	0.64	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

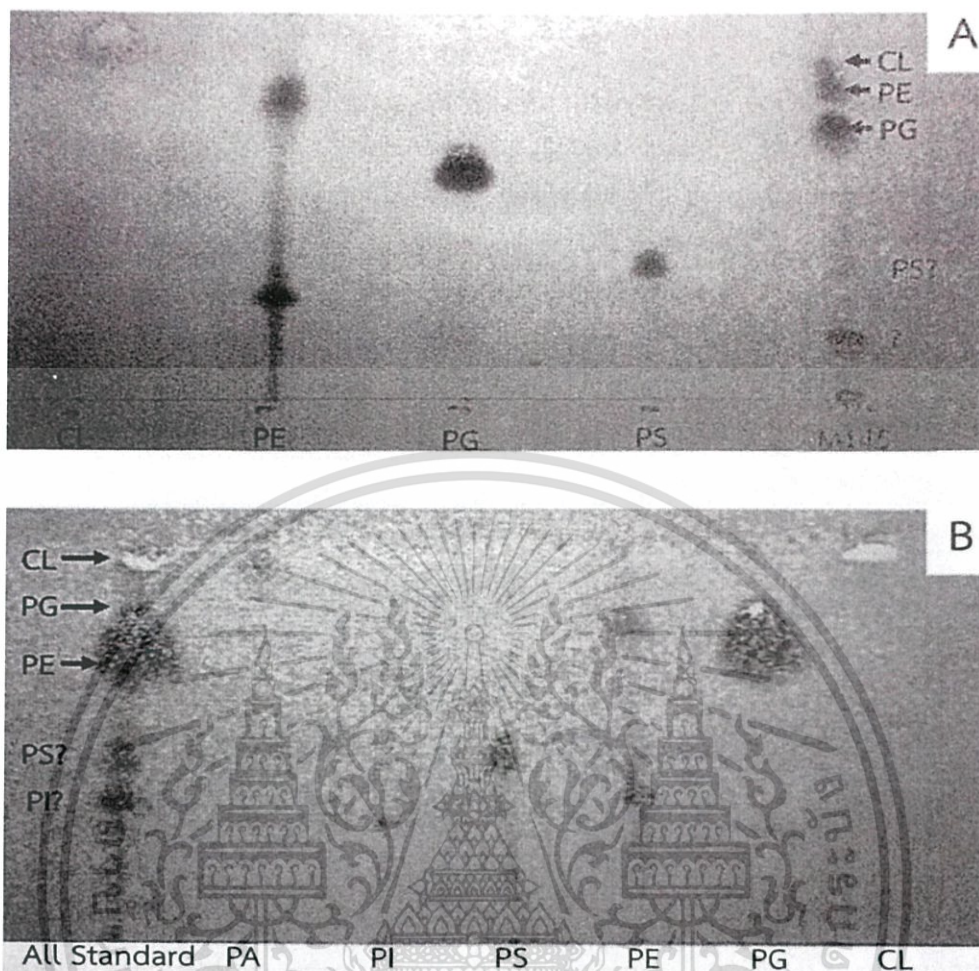
จากทฤษฎีการสร้างฟอสโฟลิปิดในแบคทีเรีย พบว่า PG และ PE เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ CL ดังรูปที่ 4.71 ดังนั้นหากเกิดสปอตของ CL นั้นหมายความว่ามีการเปลี่ยน PG และ PE ไปเป็น CL เนื่องจากว่าการสร้าง CL ต้องอาศัยสารตัวกลางเป็น PG และ PE เท่านั้น (Tan *et al.*, 2012)



รูปที่ 4.71 แสดงยีนที่เกี่ยวข้องและวิถีในการสังเคราะห์คาร์ดิโอลิพินในแบคทีเรีย (Tan *et al.*, 2012)

จากการทดลองข้างต้นพบว่าในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทในอาหารเหลวแล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงพบว่า มีปริมาณเซลล์น้อยมากไม่ถึง 100 มิลลิกรัม ทำให้เกิดสปอตของ PE จางๆ ไม่พบสปอตของ CL จึงได้ทำการทดลองโดยอ้างอิงจากวิธีการทดลองของ Klanbut (2013) ที่ได้ทำการศึกษา การสร้าง CL, PE และ PG โดยการเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทบนอาหารแข็ง และศึกษาฟอสโฟลิปิดโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography พบว่าทำให้เห็นสปอตของฟอสโฟลิปิดที่ชัดเจนกว่าดังรูป 4.73 และเทียบระยะเวลาการพา (R_f) ของสารละลายฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน (PLs standard) ดังรูปที่ 4.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.72 แสดงระยะการพา (R_f) ของสารละลายฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน (PLs standard)

A: แผ่นโครมาโตกราฟฟีที่แสดงตำแหน่งของฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน 4 ชนิด ได้แก่ phosphatidic acid (PA), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ช่องที่ 1, 2, 3, 4 และช่องที่ 5 เมื่อจุดสารละลายตัวอย่างทั้ง 4 จุด ในจุดเดียวกัน จากนั้นปล่อยให้สาร developed ในสารละลาย chloroform/methanol/acetic acid/water ในอัตราส่วน 80:12:15:4 ตามลำดับ

B: แผ่นโครมาโตกราฟฟีที่แสดงตำแหน่งของฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน 6 ชนิด คือ phosphatidic acid (PA), phosphatidylinosol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) โดยช่องที่ 1 เป็นการ spot สารละลายตัวอย่างทั้ง 6 ชนิดภายในจุดเดียวกัน ส่วนในช่องที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เป็นการ spot phospholipid standard แบบแยกจุด spot จากนั้นปล่อยให้สาร developed ในสารละลาย chloroform/methanol/acetic acid/water ในอัตราส่วน 80:12:15:4 ตามลำดับ (Klanbut, 2013)

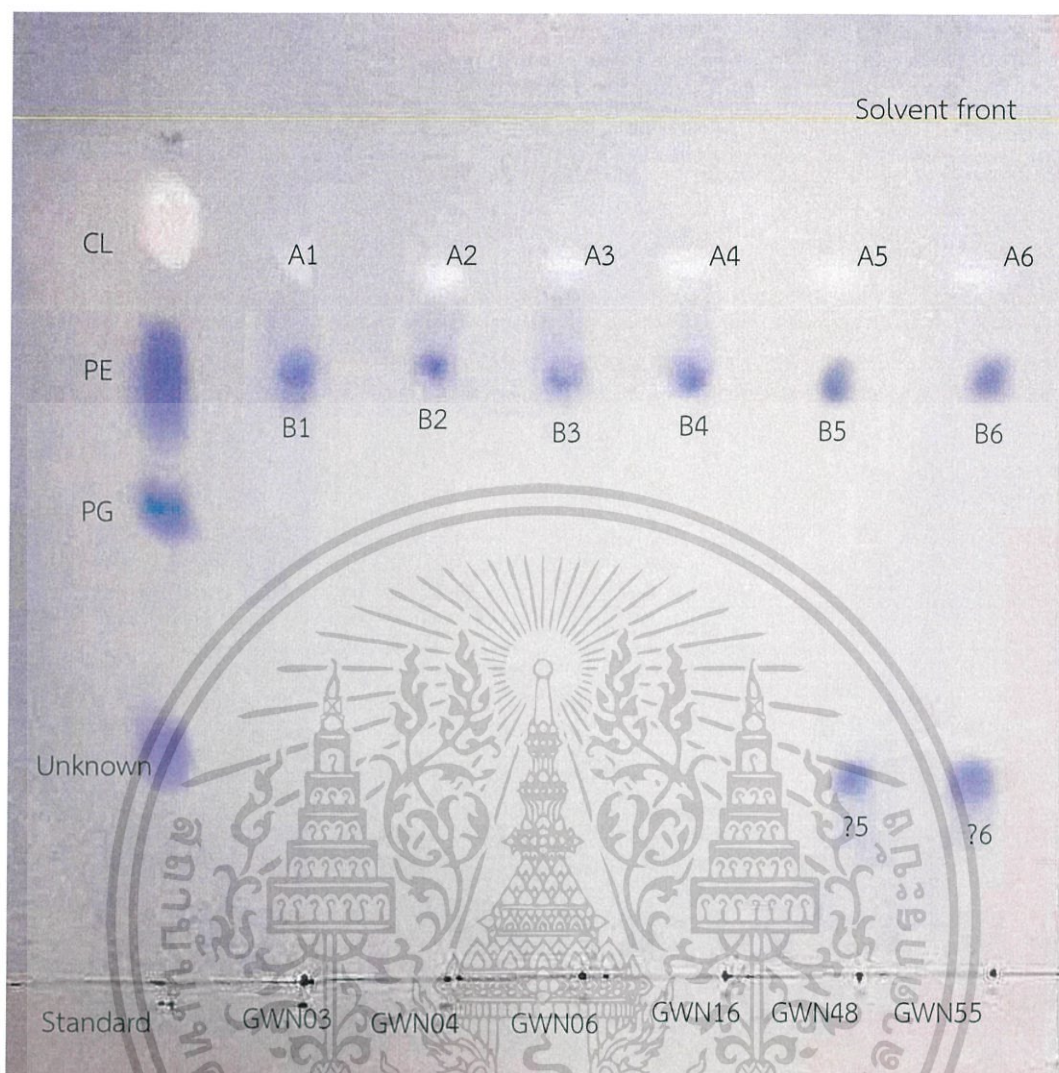
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการสร้างฟอสโฟลิปิดโดยการเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทบนอาหารแข็งจึงเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Starch casein agar (SCA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำไปมิดค้อยๆชุดเชื้อแอกติโนมัยซีทออกจากผิวอาหาร นำใส่หลอด Eppendorf จนเต็ม จากนั้นทำการสกัดฟอสโฟลิปิด (ดังวิธีการทดลองที่ 3.12.1.2) จากนั้นนำไปทำการสกัดฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วยการเติม คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วนำไปผสมบนเครื่อง vertex เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นนำมาระเหยแห้ง และทำการ resuspension ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 6-9 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ออโต้ปิเปตดูดสารที่ได้มาสปอตลงบนแผ่น TLC ครั้งละ 2 ไมโครลิตร และเว้นจุดแรกไว้เพื่อทำการหัด standard 3 ชนิด ได้แก่ L- α phosphatidyl- DL- glycerol sodium salt from egg yolk lecithin (PG), 3 - sn phosphatidylethanolamine from bovine brain (PE) และ cardiolipin sodium salt from bovine heart (CL) เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบกับ unknown spot

Mobile phase ที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:12:15:4 จากนั้นนำแผ่น TLC ที่สปอตแล้วรอให้แห้งนำมาใส่ไว้ใน tank ปลอ่ยให้ตัวทำละลายขึ้นมาจนประมาณ $\frac{3}{4}$ ของความสูงของแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ออกและทำเครื่องหมายตามแนวของตัวทำละลาย เมื่อแผ่น TLC แห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงนำแผ่นไปฉีดพ่นด้วยสารละลาย ammonium molybdate จะเห็นจุดสีน้ำเงินบริเวณที่มีสารตัวอย่าง และนำไปอบในตู้ incubator ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นให้ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดต่างๆบนแผ่น TLC แล้วจึงวัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการคำนวณนำไปหาค่า rate of flow (R_f)

จากการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีท 6 ไอโซเลตมาทำ Thin layer chromatography สามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 4.74 ซึ่งเปรียบเทียบจุด unknown spot กับ standard ที่หยดไว้ซึ่งจะเกิดสปอต 3 จุดเรียงกัน ได้แก่ CL PE และ PG จุดที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำไปใช้เป็นจุดอ้างอิงและระบุชนิดของสารตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษา แต่ไม่จำเป็นว่าจุดสปอตของสารตัวอย่างที่เกิดขึ้นจะตรงกับจุด standard เนื่องจากว่า standard ได้มาจากสิ่งมีชีวิตคนละชนิดกัน

ผลจากการทำ TLC และฉีดพ่นด้วยสารละลาย molybdenum blue spray reagent ทิ้งไว้ 2-3 นาทีที่จะเห็นจุดสีฟ้าเกิดขึ้นบนแผ่น TLC ที่ได้จากการสปอตสารตัวอย่างของไอโซเลต GWN03, GWN04 , GWN06 , GWN16 , GWN48 และ GWN55 ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพบว่า 6 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03 , GWN04, GWN06 , GWN16 , GWN48 และ GWN55 สร้างฟอสโฟลิปิดชนิด CL และ PE ซึ่งสอดคล้องตามทฤษฎีที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น นั่นคือ PG ถูกเปลี่ยนไปเป็น CL ดังรูป 4.71 นอกจากนี้ไอโซเลต GWN48 และ GWN55 สร้างฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นชนิดใด ซึ่งอาจเป็นอนุพันธ์ของ PE ก็ได้ ดังรูปที่ 4.73



รูปที่ 4.73 แสดงชนิดของฟอสโฟลิปิดบนแผ่นโครมาโตกราฟีเทียบกับสาร standard ผลจากการทำ thin layer chromatography เพื่อศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีท ในระยะ log phase ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ของเชื้อ 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต GWN03, GWN04 , GWN06 , GWN16 , GWN48 และ GWN55 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นระยะทางที่สารเคลื่อนที่จะถูกนำมาคำนวณค่า rate of flow (R_f) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากบริเวณที่ได้ทำการ spot สารตัวอย่าง เทียบกับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (solvent front) โดยใช้ mobile phase คือ คลอโรฟอร์ม เมทานอล กรดอะซิติก น้ำกลั่น อัตราส่วน 80:12:15:4 เช่นเดียวกัน สารแต่ละชนิดจะมีค่า R_f คงที่เสมอ ค่า R_f ของสารซึ่งจะหาได้จากอัตราส่วนระยะทางที่สารเคลื่อนที่เทียบกับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

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

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัซซีท์ที่ถูกคัดเลือก 6 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

หมายเลขไอโซเลต	ชนิดของฟอสโฟลิปิด							
	Phosphatidyl glycerol (PG)		Phosphatidyl ethanolamine (PE)		Cardiolipin (CL)		Unknown	
	ตำแหน่ง	ค่า R_f	ตำแหน่ง	ค่า R_f	ตำแหน่ง	ค่า R_f	ตำแหน่ง	ค่า R_f
standard	PG	0.65	PE	0.70	CL	0.84	unknown	0.25
3	-	-	B1	0.67	A1	0.83	-	-
4	-	-	B2	0.66	A2	0.83	-	-
6	-	-	B3	0.64	A3	0.82	-	-
16	-	-	B4	0.64	A4	0.81	-	-
48	-	-	B5	0.63	A5	0.80	?5	0.22
55	-	-	B6	0.64	A6	0.83	?6	0.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

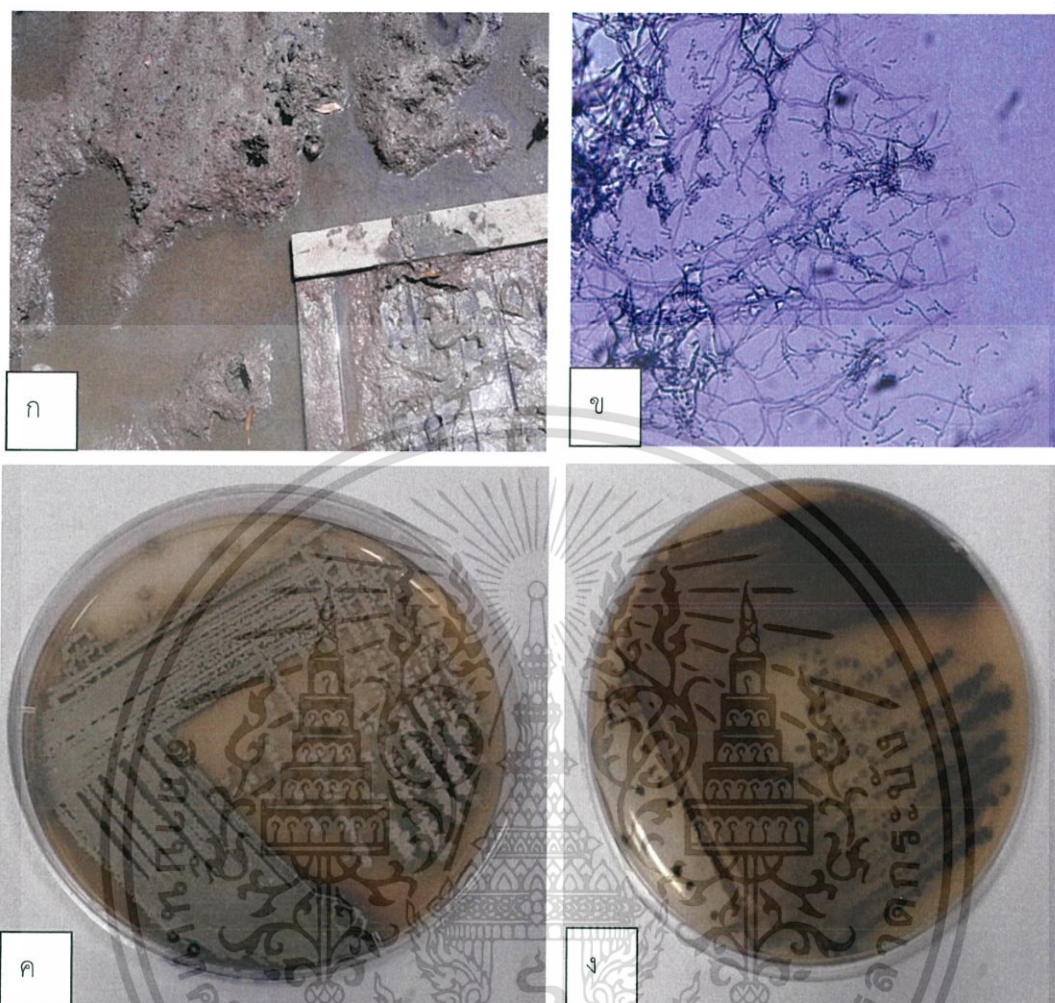
4.6 รวมผลการทดลองของเชื้อแอกติโนมัยซีท 6 ไอโซเลตที่ได้รับการคัดเลือก

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยการทดสอบเบื้องต้น สามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ให้ผลเด่น 6 ไอโซเลต ได้แก่ GWN03, GWN04, GWN06, GWN16, GWN48 และ GWN55 จากนั้นนำมาทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดที่เชื้อสร้างขึ้น โดยแต่ละไอโซเลตมีลักษณะดังต่อไปนี้

หมายเลขไอโซเลต GWN03 แยกได้จากตัวอย่างดินหมายเลข SMK02 ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ตารางที่ 4.1) ลักษณะตัวอย่างของดินที่เก็บมา มีน้ำหนักดิน 7.239 กรัม มีความชื้น 35.21 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรด - เบส เท่ากับ 7.55 ณ จุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 4.2) จากนั้นนำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP2 พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN03 สร้างเส้นใยอาหารสี Pale Yellow และเส้นใยอากาศสี Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ (ตารางที่ 4.3) จากการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนม ไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน และไม่ย่อยสลายไนเตรต (ตารางที่ 4.4) จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Staphylococcus aureus* TISTR746 (ตารางที่ 4.5) จึงนำสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้เทคนิค Agar Disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตทที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (มีบริเวณยับยั้ง 23.35 มิลลิเมตร), *Escherichia coli* TISTR 074 (มีบริเวณยับยั้ง 7.85), *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 (มีบริเวณยับยั้ง 10.45), *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (มีบริเวณยับยั้ง 23.35 มิลลิเมตร) และ *Candida albicans* TISTR 5239 (มีบริเวณยับยั้ง 12.21 มิลลิเมตร) (ตารางที่ 4.6)

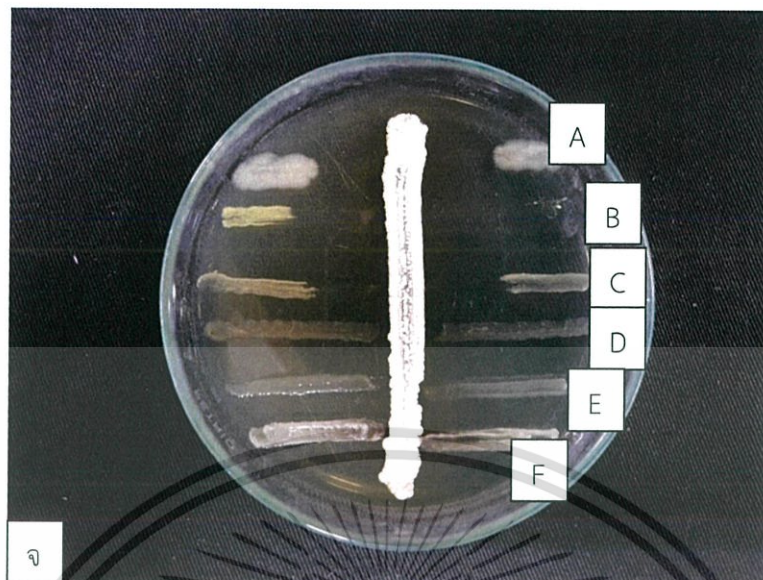
และจากการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN03 สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (ตารางที่ 4.9)



รูปที่ 4.74 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN03

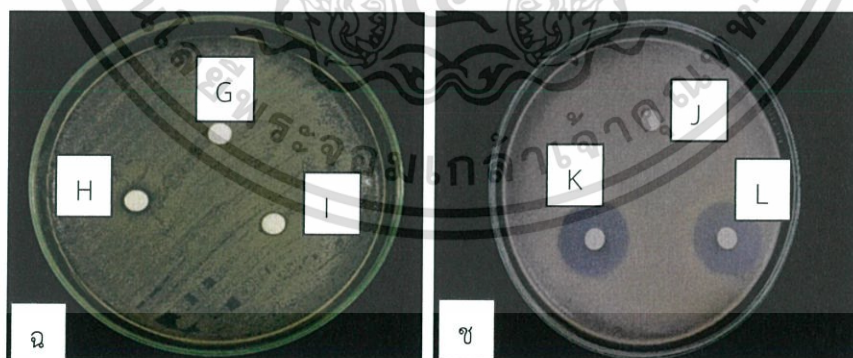
(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างจากดินหมายเลข SMK02 ศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ข) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN03 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 1000 เท่า (ค) ลักษณะของโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีท GWN03 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน (ง) ลักษณะของโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีท GWN03 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.75 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

(จ) การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของไอโซเลต GWN03 (A) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (B) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (C) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (D) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 (E) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074 และ (F) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Candida albicans* TISTR 5239



รูปที่ 4.76 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ฉ) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN03 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (G) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเมทานอล

(H,I) ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ผลบวกขนาด 9.45 มิลลิเมตร และ 7.45 มิลลิเมตร

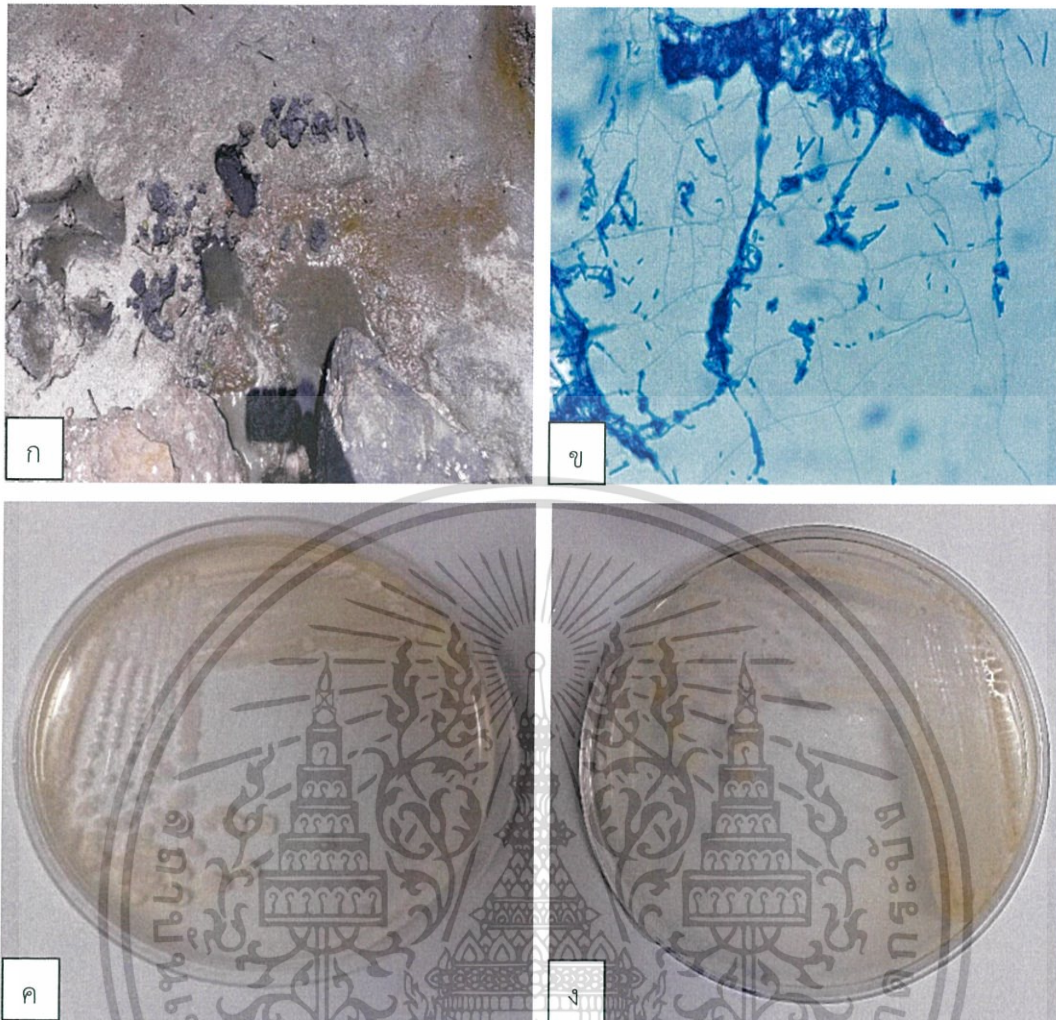
(ข) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN03 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (J) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตต (K,L) ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ผลบวกขนาด 23.7 และ 23.0

หมายเลขไอโซเลต GWN04 แยกได้จากตัวอย่างดินหมายเลข SMK03 ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ตารางที่ 4.1) ลักษณะตัวอย่างของดินที่เก็บมา มีน้ำหนักดิน 7.073 กรัม มีความชื้น 47.15 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็น กรด - เบส เท่ากับ 7.61 ณ จุดที่ทำให้การเก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 4.2) จากนั้นนำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP2 พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN03 สร้างเส้นใยอาหารสี Strong Orange Yellow และเส้นใยอากาศสี Pale Pink ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ (ตารางที่ 4.3) จากการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสามารถย่อยสลายโปรตีนนมได้ และย่อยสลายแป้งได้เล็กน้อย สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ แต่ไม่ตกตะกอนโปรตีนนม (ตารางที่ 4.4)

นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (ตารางที่ 4.5) จึงนำสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้เทคนิค Agar Disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (มีบริเวณยับยั้ง 11.50 มิลลิเมตร), *Escherichia coli* TISTR 074 (มีบริเวณยับยั้ง 7.70 มิลลิเมตร), *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 (มีบริเวณยับยั้ง 6.65 มิลลิเมตร), และ *Candida albicans* TISTR 5239 (มีบริเวณยับยั้ง 7.15 มิลลิเมตร) (ตารางที่ 4.6)

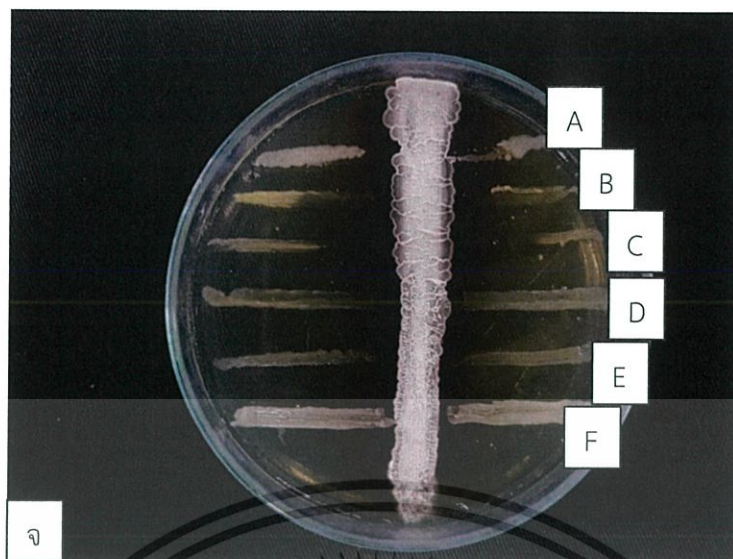
และจากการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทาด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN04 สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (ตารางที่ 4.9)



รูปที่ 4.77 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต GWN04

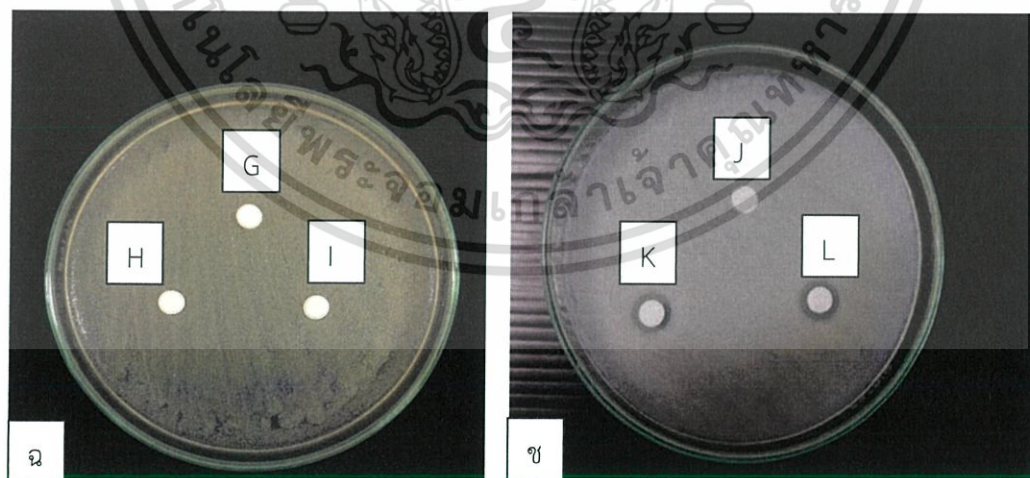
(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างจากดินหมายเลข SMK03 ศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ข) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต GWN04 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 1000 เท่า (ค) ลักษณะของโคโลนีด้านบนของเชื้อแอคติโนมัยซีท GWN04 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน (ง) ลักษณะของโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอคติโนมัยซีท GWN04 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.78 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

(จ) การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของไอโซเลต GWN04 (A) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (B) ผลการทดสอบบวก(+) กับเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (C) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (D) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 (E) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074 และ (F) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Candida albicans* TISTR 5239



รูปที่ 4.79 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ฉ) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN04 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (G) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเมทานอล (H,I) ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248 ผลบวกขนาด 6.4 มิลลิเมตร และ 6.5 มิลลิเมตร

(ช) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN04 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (J) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตต (K,L) ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248 ผลบวกขนาด 11.5 มิลลิเมตร

หมายเลขไอโซเลต GWN06 แยกได้จากตัวอย่างดินหมายเลข SMK04 ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ตารางที่ 4.1) ลักษณะตัวอย่างของดินที่เก็บมา มีน้ำหนักดิน 7.319 กรัม มีความชื้น 48.46 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรด - เบส เท่ากับ 7.41 (ตารางที่ 4.2) ณ จุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP2 พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN03 สร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Olive brown และเส้นใยอากาศสี Moderate Olive brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ (ตารางที่ 4.3)

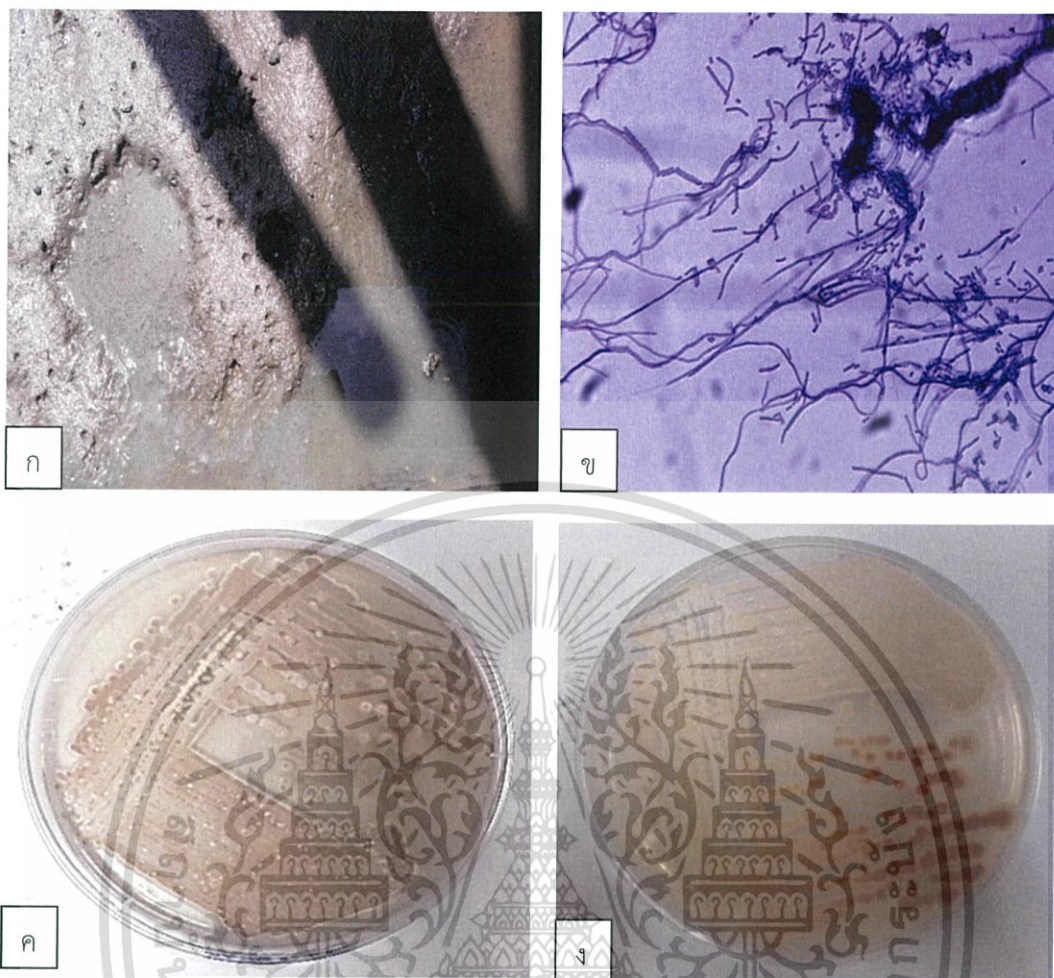
จากการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ สามารถย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนนม และไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4)

นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870, และ *Escherichia coli* TISTR 074 (ตารางที่ 4.5) จึงนำสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้เทคนิค Agar Disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (มีบริเวณยับยั้ง 23.35 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (มีบริเวณยับยั้ง 22.35 มิลลิเมตร), และ *Candida albicans* TISTR 5239 (มีบริเวณยับยั้ง 10.82 มิลลิเมตร) (ตารางที่ 4.6)

และจากการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN06 สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (ตาราง 4.9)

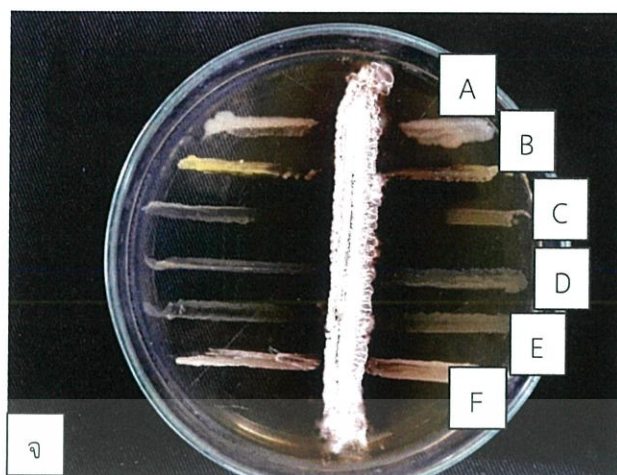
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.80 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอสเพอริลลัสฟูมิกัส GWN06

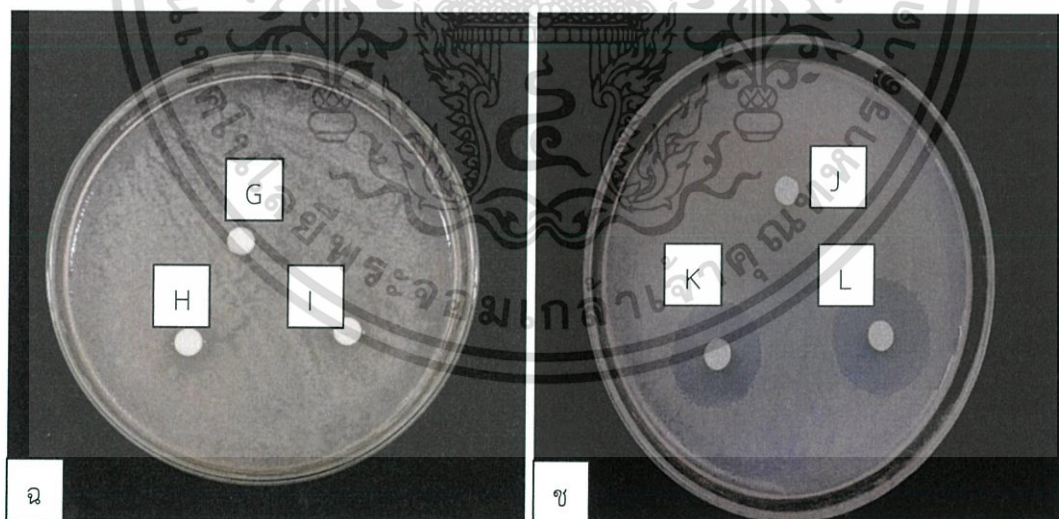
(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างจากดินหมายเลข SMK04 ศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ข) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัส GWN06 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 1000 เท่า (ค) ลักษณะของโคโลนีด้านบนของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัส GWN06 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน (ง) ลักษณะของโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกัส GWN06 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.81 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

(จ) การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของไอโซเลต GWN06 (A) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (B) ผลการทดสอบลบ(-) กับเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (C) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (D) ผลการทดสอบลบ (+) กับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 (E) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074 และ (F) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Candida albicans* TISTR 5239



รูปที่ 4.82 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ฉ) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN06 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (G) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเมทานอล (H,I) ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248 ผลบวกขนาด 7.45 และ 7.35 มิลลิเมตร

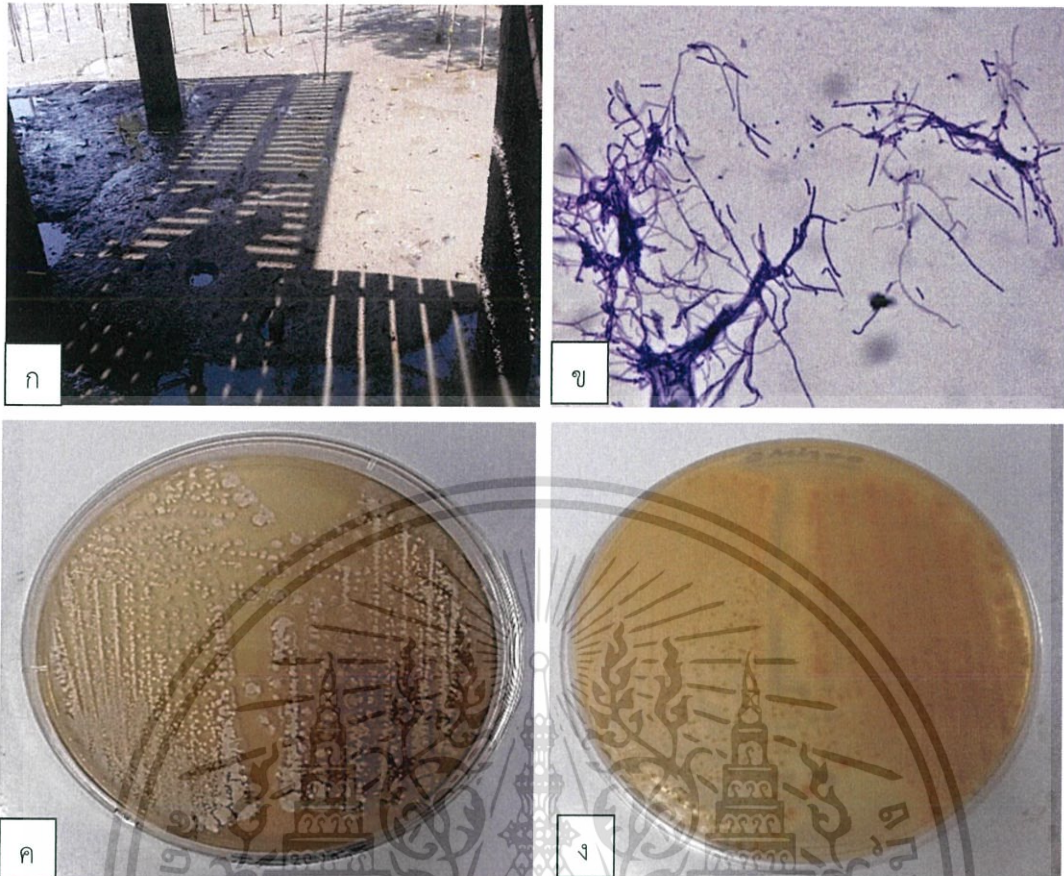
(ช) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN06 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (J) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตต (K,L) ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248 ผลบวกขนาด 24 และ 22.7 มิลลิเมตร

หมายเลขไอโซเลต GWN16 แยกได้จากตัวอย่างดินหมายเลข SMK07 ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ตารางที่ 4.1) ลักษณะตัวอย่างของดินที่เก็บมา มีน้ำหนักดิน 6.494 กรัม มีความชื้น 43.43 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรด – เบส เท่ากับ 7.33 ณ จุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 4.2) จากนั้นนำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP2 พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN16 สร้างเส้นใยอาหารสี Light Olive Brown และเส้นใยอากาศสี White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ (ตารางที่ 4.3) จากการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสามารถตกตะกอนโปรตีนนมได้ ย่อยสลายโปรตีนนมได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถย่อยแป้ง ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4)

นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 และ *Micrococcus luteus* TISTR 2374, (ตารางที่ 4.5) จึงนำสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้เทคนิค Agar Disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (มีบริเวณยับยั้ง 12.21 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (มีบริเวณยับยั้ง 10.55 มิลลิเมตร), *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (มีบริเวณยับยั้ง 11.45) และ *Candida albicans* TISTR 5239 (มีบริเวณยับยั้ง 7.75 มิลลิเมตร) (ตารางที่ 4.6)

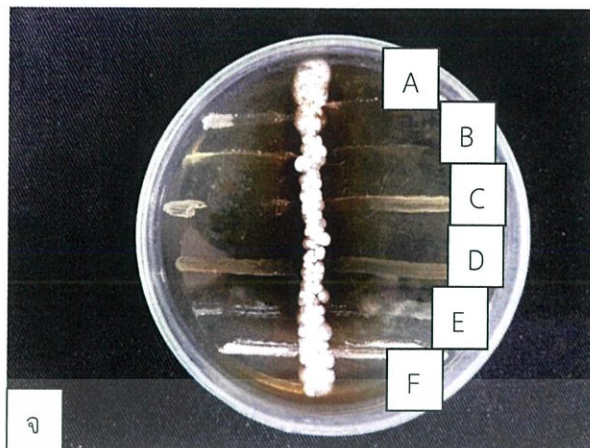
และจากการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN16 สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (ตารางที่ 4.9)



รูปที่ 4.83 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN16

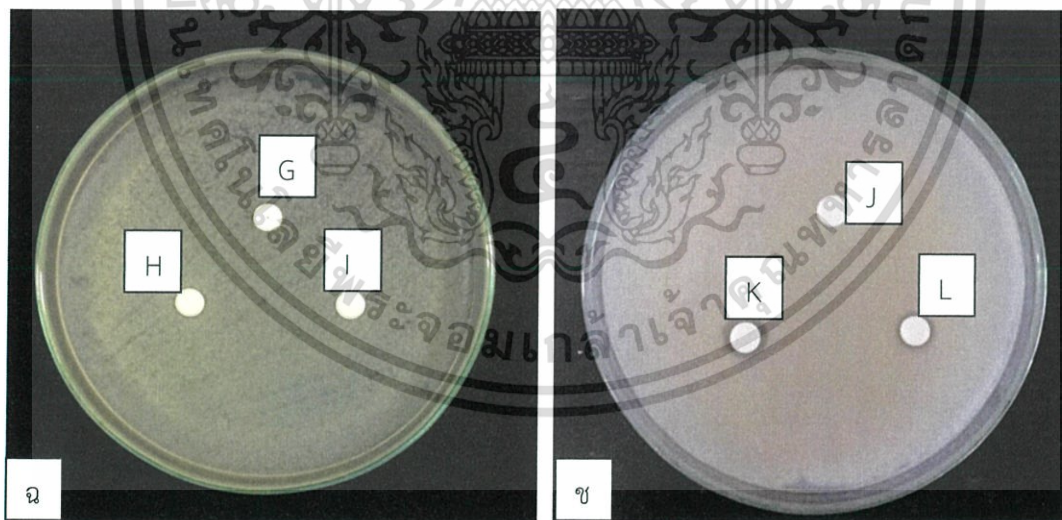
(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างจากดินหมายเลข SMK07 ศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ข) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN16 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 1000 เท่า (ค) ลักษณะของโคโลนีด้านบนของเชื้อแอกติโนมัยซีท GWN16 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน (ง) ลักษณะของโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอกติโนมัยซีท GWN16 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.84 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

(จ) การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของไอโซเลต GWN16 (A) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (B) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (C) ผลการทดสอบบวก (-) กับเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (D) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 (E) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074 และ (F) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Candida albicans* TISTR 5239



รูปที่ 4.85 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ฉ) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN16 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (G) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเมทานอล (H,I) ให้ผลลบในการ ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248

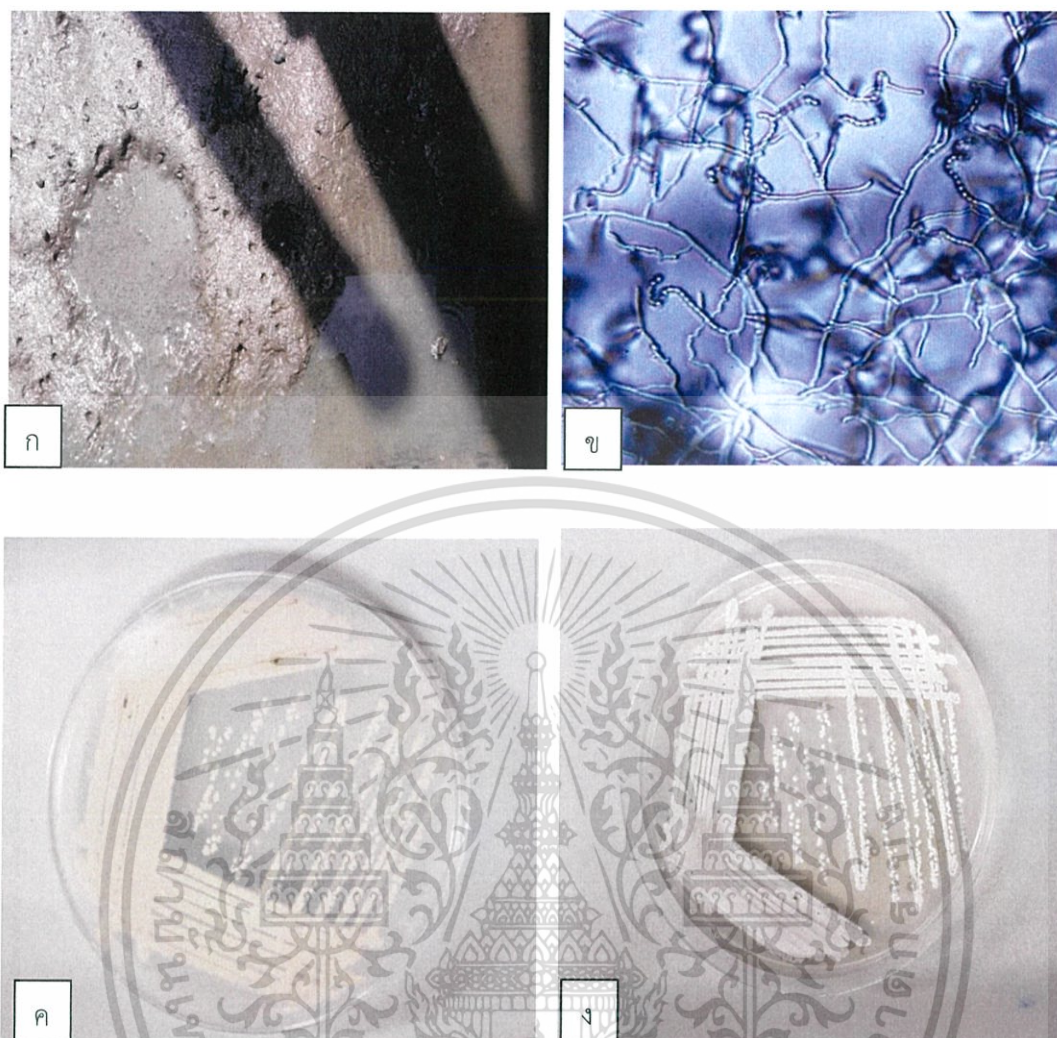
(ข) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN16 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (J) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตต (K,L) ให้ผลบวก ในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248 ผลบวกขนาด 12.45 และ 10.45 มิลลิเมตร

หมายเลขไอโซเลต GWN48 แยกได้จากตัวอย่างดินหมายเลข CHB01 ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี (ตารางที่ 4.1) ลักษณะตัวอย่างของดินที่เก็บมา มีน้ำหนักดิน 7.530 กรัม (มี ความชื้น 44.43 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรด – เบส เท่ากับ 7.28 ณ จุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 4.2) จากนั้นนำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP2 พบว่า หมายเลข ไอโซเลต GWN48 สร้างเส้นใยอาหารสี Dark Yellow และเส้นใยอากาศสี White ไม่สร้างรงควัตถุที่ ละลายน้ำ (ตารางที่ 4.3) จากการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสามารถย่อยสลายแป้งได้ แต่ไม่สามารถ ตกตะกอนโปรตีนนม และย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและไนเตรตได้

นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074 (ตารางที่ 4.5) จึงนำสารสกัดหยาบของเชื้อแอก คติโนมัยซีมาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยเทคนิค Agar disc diffusion และ ทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้เทคนิค Agar Disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (มีบริเวณยับยั้ง 15.84 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (มีบริเวณยับยั้ง 10.21 มิลลิเมตร), *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (มีบริเวณยับยั้ง 11.45) และ *Candida albicans* TISTR 5239 (มีบริเวณยับยั้ง 10.05 มิลลิเมตร) (ตารางที่ 4.6)

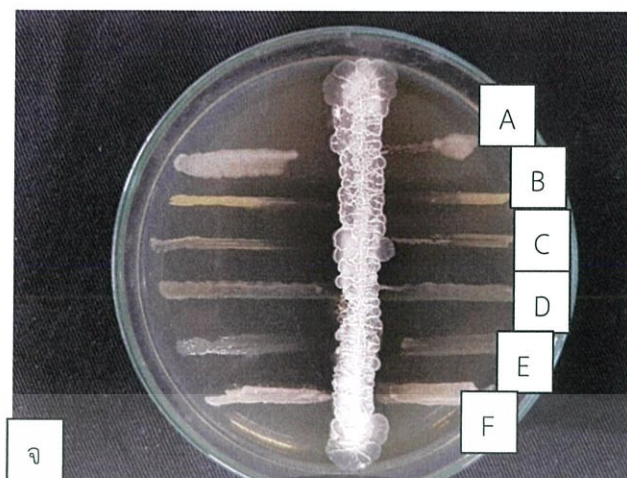
และจากการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกคติโนมัยซีด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN48 สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (ตารางที่ 4.9) และยังสร้าง ฟอสโฟลิปิด unknown ที่คาดว่าจะน่าจะเป็น PS หรือ PI เมื่อเทียบกับรูป 4.73



รูปที่ 4.86 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทไอโซเลต GWN48

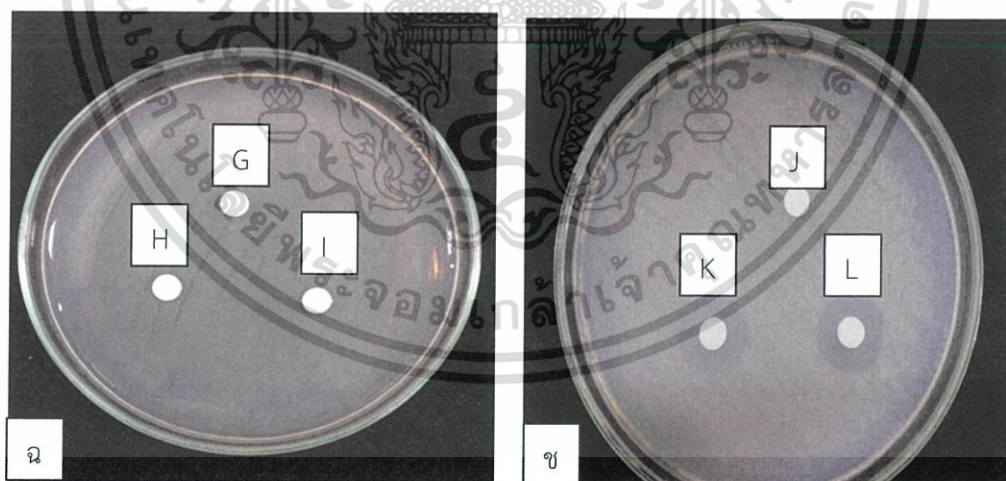
(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างจากดินหมายเลข SMK07 ศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ข) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต GWN16 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 1000 เท่า (ค) ลักษณะของโคโลนีด้านบนของเชื้อแอคติโนมัยซีท GWN48 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน (ง) ลักษณะของโคโลนีด้านล่างของเชื้อแอคติโนมัยซีท GWN48 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.87 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

(จ) การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของไอโซเลต GWN48 (A) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (B) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (C) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (D) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 (E) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074 และ (F) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Candida albicans* TISTR 5239



รูปที่ 4.88 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ฉ) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN48 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (G) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเมทานอล (H,I) ให้ผลลบในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248 ผลบวกขนาด 7.5 และ 6.5 มิลลิเมตร

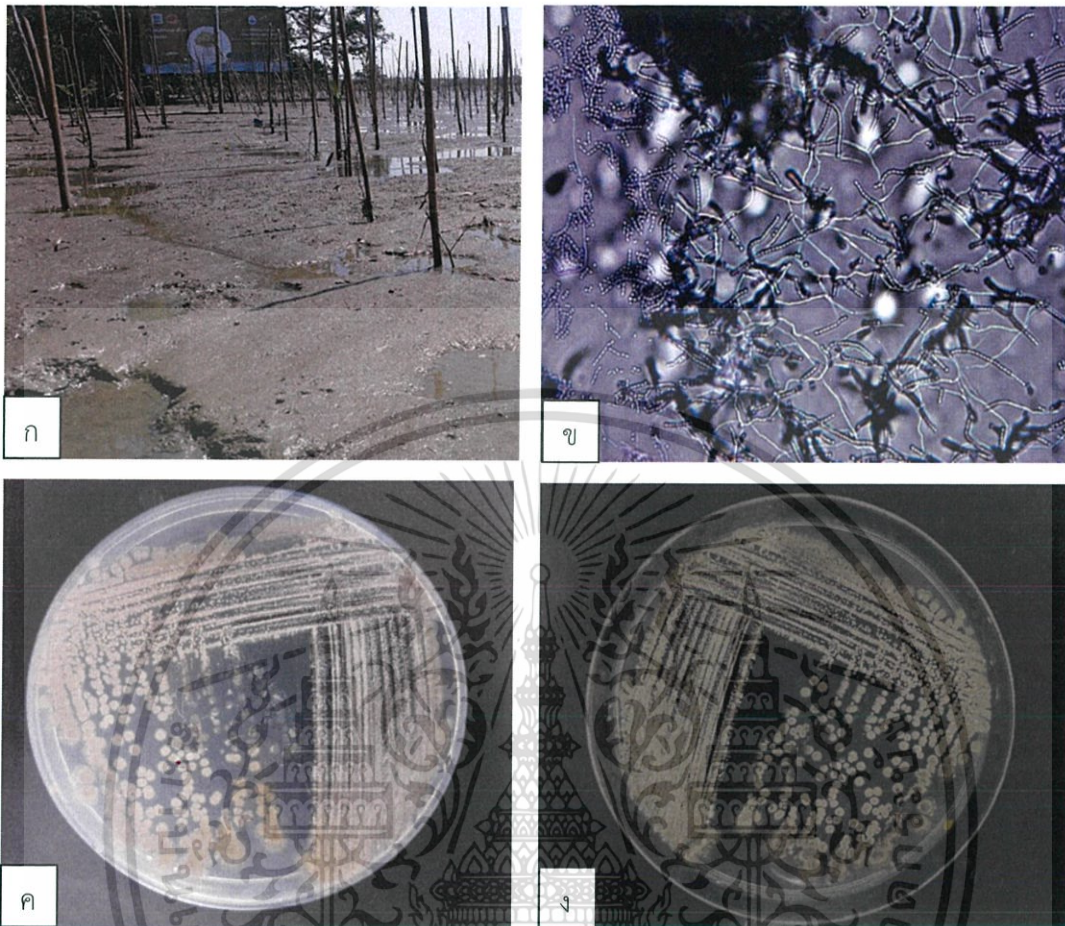
(ช) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN48 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (J) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตต (K,L) ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR1248 ผลบวกขนาด 15.45 และ 16.23 มิลลิเมตร

หมายเลขไอโซเลต GWN55 แยกได้จากตัวอย่างดินหมายเลข CHB09 ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี (ตารางที่ 4.1) ลักษณะตัวอย่างของดินที่เก็บมา มีน้ำหนักดิน 6.831 กรัม มีความชื้น 35.31 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรด – เบส เท่ากับ 7.40 ณ จุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ตารางที่ 4.2) จากนั้นนำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร ISP2 พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN55 สร้างเส้นใยอาหารสี Light Olive Brown และเส้นใยอากาศสี White ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ (ตารางที่ 4.3) จากการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าสามารถย่อยสลายเจลาตินได้ สามารถย่อยแป้งได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนนมและย่อยสลายโปรตีนนมได้ ไม่สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ (ตารางที่ 4.4)

นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าไอโซเลตนี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้ (ตารางที่ 4.5) จึงนำสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยเทคนิค Agar disc diffusion และทำการศึกษาฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้เทคนิค Agar Disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (มีบริเวณยับยั้ง 15.84 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (มีบริเวณยับยั้ง 8.60 มิลลิเมตร), *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (มีบริเวณยับยั้ง 18.15 มิลลิเมตร) , *Candida albicans* TISTR 5239 (มีบริเวณยับยั้ง 12.64 มิลลิเมตร), *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (มีบริเวณยับยั้ง 10.25 มิลลิเมตร) และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 (มีบริเวณยับยั้ง 10.4 มิลลิเมตร) (ตารางที่ 4.6) และจากการศึกษาฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่า หมายเลขไอโซเลต GWN55 สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) ได้ (ตารางที่ 4.9) และยังสามารถสร้างฟอสโฟลิปิด unknown ที่คาดว่าน่าจะเป็น PS หรือ PI เมื่อเทียบกับรูป 4.73

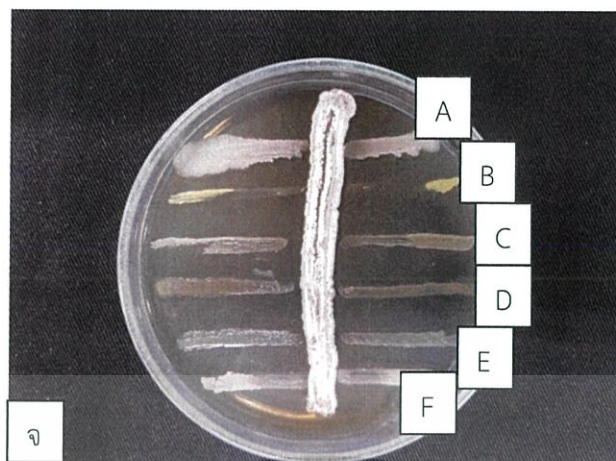
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.89 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอนโดนิวเมซีท์ไอโซเลต GWN55

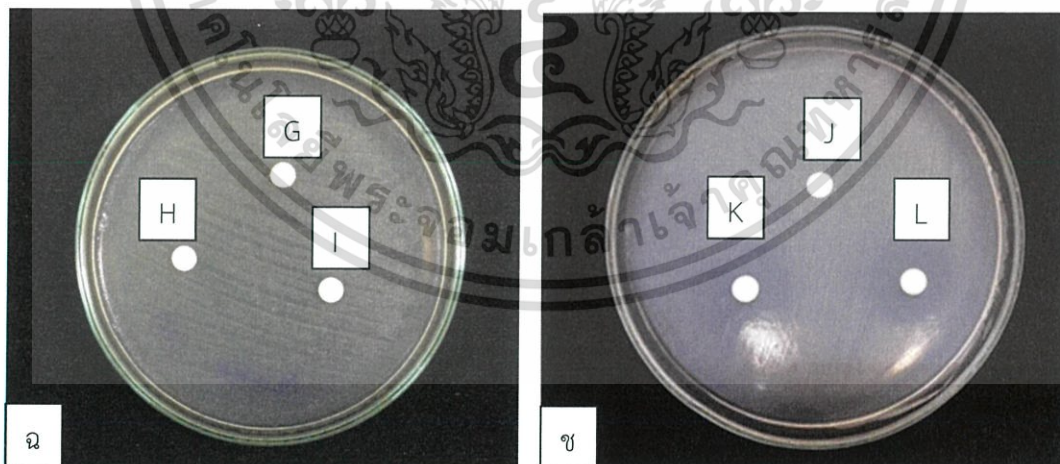
(ก) บริเวณหลุมเก็บตัวอย่างจากดินหมายเลข SMK07 ศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัด สมุทรสาคร (ข) แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อเอนโดนิวเมซีท์ไอโซเลต GWN16 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยายภาพ 1000 เท่า (ค) ลักษณะของโคโลนีด้านบนของเชื้อเอนโดนิวเมซีท์ GWN48 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน (ง) ลักษณะของโคโลนีด้านล่างของเชื้อเอนโดนิวเมซีท์ GWN48 บนอาหาร Starch casein agar (SCA) ระยะเวลา 5-7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.90 แสดงการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

(จ) การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของไอโซเลต GWN55 (A) ผลการทดสอบบวก (-) กับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR1248 (B) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 (C) ผลการทดสอบบวก (+) กับเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 (D) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 (E) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074 และ (F) ผลการทดสอบลบ (-) กับเชื้อ *Candida albicans* TISTR 5239



รูปที่ 4.91 แสดงผลการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของไอโซเลต GWN55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ฉ) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN55 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (G) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเมทานอล (H,I) ให้ผลลบในการยับยั้งการเจริญ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ผลบวกขนาด 7.35 และ 7.55 มิลลิเมตร

(ช) ผลออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบจากสารสกัดของไอโซเลต GWN55 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Agar disc diffusion : (J) ชุดควบคุมที่หยดด้วยเอทิลอะซิเตต (K,L) ให้ผลบวกในการยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ผลบวกขนาด 18.5 และ 17.5 มิลลิเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการศึกษาฟอสโฟลิปิด และฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร, ดินป่าชายเลนอำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา และดินป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 55 ไอโซเลต จากจุดเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 30 จุด (แอกติโนมัยซีท 16 ไอโซเลต จากดินป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร , 21 ไอโซเลตจากดินป่าชายเลนอำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา และ 18 ไอโซเลต จากดินป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดชลบุรี) โดยบริเวณจุดเก็บตัวอย่างดินที่สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 7-8 มีค่าความชื้นโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 41.32 และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีท บนอาหาร International Streptomyces Project พบว่าเฉลี่ยแล้วเชื้อแอกติโนมัยซีทจะมีการเจริญและสร้างสปอร์ในระยะเวลา 10 – 14 วัน นอกจากนี้เชื้อแอกติโนมัยซีทมีการสร้างสีของเส้นใยอากาศ และสีของเส้นใยอาหาร ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์และจับกลุ่มได้ทั้งหมด 12 กลุ่ม (ดังตารางที่ 4.3)

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Grayish Yellow และสร้างเส้นใยอาหารสี Pale Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 19 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN01, GWN03, GWN08, GWN12, GWN19, GWN20, GWN22, GWN23, GWN24, GWN26, GWN30, GWN32, GWN36, GWN38, GWN44, GWN45, GWN50, GWN52 และ GWN58

กลุ่ม 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Yellow และสร้างเส้นใยอาหารสี Greenish Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 4 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN02, GWN05, GWN21 และ GWN54

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Pink และสร้างเส้นใยอาหารสี Deep Greenish yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN04 และ GWN34

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Brilliant Greenish yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN25 และ GWN28

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Moderate Olive brown และสร้างเส้นใยอาหารสี Moderate Olive brown สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สี Strong Yellowish brown มีสมาชิกทั้งหมด 8 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN06, GWN10, GWN15, GWN17, GWN29, GWN37, GWN39 และ GWN40

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Light Green และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong Greenish yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN07 และ GWN59

กลุ่มที่ 7 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Light Olive brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 6 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN09, GWN13, GWN55, GWN56, GWN57 และ GWN60

กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong Yellowish brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 2 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN31 และ GWN33

กลุ่มที่ 9 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี White และสร้างเส้นใยอาหารสี Dark Yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 6 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN14, GWN47, GWN48, GWN49 และ GWN53

กลุ่มที่ 10 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Strong Yellowish brown และสร้างเส้นใยอาหารสี Light Olive brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN41

กลุ่มที่ 11 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Yellow green และสร้างเส้นใยอาหารสี Strong brown ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN42

กลุ่มที่ 12 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอากาศสี Pale Yellow green และสร้างเส้นใยอาหารสี Grayish Greenish yellow ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ มีสมาชิกทั้งหมด 1 ไอโซเลต ประกอบด้วย GWN46

จากการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถตกตะกอนของโปรตีนในหลอดอาหาร Skim milk 10% กว่าร้อยละ 21.81 ให้ผล [+] คือ มีการตกตะกอนโปรตีนนมลงมาที่ก้นหลอด และจากการทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar พบว่าแอกติโนมัยซีทกว่าร้อยละ 34.34 ให้ผล [+] คือ สามารถย่อยสลายโปรตีนนมเกิดเป็นโซนใส การทดสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเจลาตินพบว่าแอกติโนมัยซีทกว่าร้อยละ 25.45 ให้ผล [+] คือสามารถสร้างเอนไซม์ Gelatinase ออกมาย่อยสลายเจลาตินได้ การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตพบว่าร้อยละ 10.90 ของเชื้อแอกติโนมัยซีทให้ผล [+] คือ สามารถย่อยสลายไนเตรตได้ และในการทดสอบความสามารถในการ

ย่อยสลายแบ่งของเชื้อแอกติโนมัยซีทพบว่า กวาร์้อยละ 25.15 ให้ผล [+] คือ สามารถย่อยสลายแบ่งได้ เกิดโซนใสเมื่อทดสอบกับไอโอดีน

ในการทดสอบความสามารถเบื้องต้นของแอกติโนมัยซีทในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านเชื้อทดสอบ 6 ชนิด ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2870 และ *Escherichia coli* TISTR 074 แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 1248, *Micrococcus luteus* TISTR 2374 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* TISTR 5239 พบว่า แอกติโนมัยซีททั้งหมด 55 ไอโซเลตสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ คิดเป็นร้อยละ 16.36 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ คิดเป็นร้อยละ 9.09 สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อยีสต์ได้ คิดเป็นร้อยละ 0 และสามารถยับยั้งได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ คิดเป็น ร้อยละ 3.63

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีท 6 ไอโซเลตที่ให้ผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบดีที่สุด จากการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยการทดสอบขั้นต้น (ตารางที่ 4.5) ซึ่งประกอบไปด้วยไอโซเลต GWN03, GWN04, GWN06, GWN16, GWN48 และ GWN55 ถูกนำมาเลี้ยงต่อเพื่อสกัดสารทุติยภูมิที่เชื้อสร้างขึ้น จากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากน้ำหมักในชั้นเอธิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า แอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN03 และ GWN04 ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 1248 ได้ดีที่สุด โดยโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นมีขนาดเท่ากันคือ 23.35 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 074 พบว่าแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN03 ให้ผลการยับยั้งเชื้อที่ดีที่สุด โดยโซนยับยั้งมีขนาด 7.85 มิลลิเมตร แอกติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 พบว่าเป็นไอโซเลต GWN55 มีโซนยับยั้งถึง 18.15 มิลลิเมตร แอกติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้ พบว่าเป็นไอโซเลต GWN03 ซึ่งให้ผลยับยั้งถึง 23.35 มิลลิเมตร และแอกติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus luteus* TISTR 2374 ได้ พบว่าเป็นไอโซเลต GWN55 ซึ่งให้ผลยับยั้งการเจริญขนาด 12.64 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.6)

จากการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทและการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารสกัดจากน้ำหมักในชั้นเอธิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต GWN03 ที่คัดแยกมาจากศูนย์วิจัยป่าชายเลนบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ได้ถึง 23.35 มิลลิเมตร ซึ่งให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับแอกติโนมัยซีทที่คัดแยกมาจากป่าชายเลนที่ Sundarbans ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้อยู่ในช่วง $\geq 10-19$ มิลลิเมตร (Sohan et al., 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีท 6 ไอโซเลต ประกอบไปด้วยไอโซเลต GWN03, GWN04, GWN06, GWN16, GWN48 และ GWN55 โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) พบว่าแอกติโนมัยซีทสามารถสร้างฟอสโฟลิปิดได้ทั้ง 3 ชนิด คือ Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylglycerol (PG) และ Cardiolipin (CL) โดยทุกไอโซเลตสร้าง Cardiolipin และ Phosphatidylethanolamine และมี 2 ไอโซเลต ได้แก่ GWN48 และ GWN 55 ที่สร้างฟอสโฟลิปิด unknown ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นชนิดใด ซึ่งอาจเป็นอนุพันธ์ของ PE

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

จากข้อมูลที่ได้ทำการศึกษา ทำให้ทราบว่าดินตัวอย่างจากศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร, ป่าชายเลนตำบลคลองสอง จังหวัดฉะเชิงเทรา และศูนย์วิจัยป่าชายเลนตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี เป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญแห่งหนึ่ง ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี ซึ่งเหมาะสำหรับการวิจัยค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สามารถค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ จึงควรศึกษาวิจัยต่อเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทถึงระดับโมเลกุลและสปีชีส์

5.2.2 จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สามารถค้นพบเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ดี จึงควรมีการศึกษาถึงสถานะในการเลี้ยงเชื้อ ชนิดของอาหาร รวมถึงปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแอกติโนมัยซีท

5.2.3 จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสกัดฟอสโฟลิปิดต่างๆ ของแอกติโนมัยซีทได้ จึงควรเพิ่มชนิดของฟอสโฟลิปิดมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบเพื่อช่วยในการจำแนกเอกลักษณ์ของ Unknown spot ได้

5.3.4 การพบ cardiolipin ในช่วงกลางของการเจริญ mid log phase ถึง early stationary phase อาจนำมาทำการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อควบคุมการแตกกิ่งก้านของแอกติโนมัยซีทให้ผลิตชีวมวล (biomass) ให้มากขึ้น เนื่องจากการแตกกิ่งก้านของแอกติโนมัยซีทจะทำให้ปริมาณของสารทุติยภูมิมากขึ้นตามลำดับ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กนกวรรณ เสรีภาพ. 2554. คู่มือประกอบสื่อการสอนวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย. สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน และ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- กำธร มาลาธรรม. 2548. หลักการใช้จ่ายปฏิชีวนะในเวชปฏิบัติทั่วไป. หน่วยโรคติดเชื้อ. สำนักบริหารการสาธารณสุข โรงพยาบาลราชวิถี.
- กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. 2555. “ความหลากหลายของแอกติโนมัยซีทที่เรียในดิน.” สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- เกษแก้วกัลยา วงษ์สวัสดิ์. ปัทมาภา คาศวิบูลย์ และ สุพิชา แสงสว่าง. 2556. การคัดกรองและการศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- กิตามาศ ศิริชัย. 2547. “การแยกและคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินในถ้ำธารลอดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ” ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- คณิงกานต์ กลิ่นบุศย์. 2558. เอกสารประกอบวิชาปฏิบัติการสรีรวิทยาของจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- จิตติ ท่าไผ่. 2553. กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์และการกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีททางทะเล. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จิตติ ท่าไผ่. 2556. การคัดกรอง และศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อต้นตอยืดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้. กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จินตนา อาจสันเทียะ 2549. “จุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับพยาบาล” กรุงเทพฯ : บางกอกบล็อก.
- จรินทร์ พุดงาม. 2014. การแยกและคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สามารถย่อยสลายสารประกอบลิโกลูโลสได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช.
- ณิชา สรินนธ์ธนา, จารุพันธ์ ประทุมยศ และจันทร์จรัส วัฒนะโชติ. 2557. ศักยภาพของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
- ทัวร์ออนไทย. 2560. ศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ. [Online]. Available :<http://www.touronthai.com/article/2541>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ธนภพ โสตร์โยม, เกศรินทร์ เพ็ชรรัตน์, นพพร สกุลยีนยงสุข, ดวงกมล ตั้งสถิตพร, ดวงรัตน์ แซ่ตั้ง และกิตติ ช้องประเสริฐ. 2558. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่. คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.
- ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์. 2557. “ความหลากหลายทางชีวภาพ คุณสมบัติทางเคมี และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและเซลล์มะเร็งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนแบคทีเรียในดินป่าไม้ อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว.” กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. 2551. “บทที่ 4 ลิควิดโครมาโตกราฟี.” หน้า 156. ใน เทคนิคการแยก. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
- ทายาท ศรียาภัย, พิชากค์ ศรียาภัย, กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์, อรินทม์ งามนิยม และ วิรงรอง ดวงใจ. 2558. “ศักยภาพด้านชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีตจากดินป่าชายเลนจังหวัดสตูล” วารสารวนศาสตร์ 34 (2) : 51-61 (2558)
- นิตยา บุญทิม, พรรณเพ็ญ เครือไทย, ชินกฤต สุวรรณศิริ และถกลวรรณ ศิริสวัสดิ์. การเพิ่มศักยภาพและสรรพคุณของพืชผักสมุนไพรในตำรับยาล้านนา: การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการให้ผลผลิต. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2556.
- นิตยา อินทราวัดนา และมูทิตา วนาภรณ์. 2558. โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและสถานการณการดื้อยา. ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล. *Journal of Medicine and Health Sciences.* (Vol.22 No.1).
- ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร, ศิวาพร ลงยันต์, ภัทริน ศรีตุลยกุลย์ และไพศาล สิทธิกรกุล. 2552. การโคลนยีนและการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบจีโนมและการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ปวีณา อุดมะดิง. 2554. ประสิทธิภาพการใช้เชื้อรา *Trichoderma virens* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนสบนผลพริกชี้ฟ้า. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร) สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.
- พงชัย หาญยุทธนากร. 2555. Triacylglycerol และ phospholipid. สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน (สพฐ.) และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พงษ์พิสุทธิ์ จงอุดมสุข, (ผู้รวบรวม). 2555. HSRI forum จุลสารรายเดือน. สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข. นนทบุรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- พิกุลทอง.2560. บทปฏิบัติการ โครมาโทกราฟี. คณะ วิศวกรรมอาหาร วิทยาลัยเทคโนโลยีและ
สหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา
- พินิจ กล้าคลองตัน. 2553. การแพร่กระจายเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในสถานพยาบาล:
กรณีศึกษาโรงพยาบาลนภลัย จังหวัดสมุทรสงคราม. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พัฒนวรรณ หมู่คุ้ม , ณีฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ และ ชาญยุทธ สุดทองคง.2555. ชีวิตวิทยาการสืบพันธุ์ของ
ปูก้ามดาบ *Uca perplexa* (H. Milne Edwards, 1837) จากแหล่งอาศัยบริเวณป่าชายเลน
คลองสีเทา จังหวัดตรัง. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 4(2) : 10-22
(2555)
- พนาวรรณ คุณดีสุข. 2554. “การใช้ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic drugs) อย่างถูกต้องและเหมาะสม.”
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. 21(3) : 193-196
- พานทอง กุลสันติวงศ์. 2550. ความหลากหลายของเชื้อแอคติโนมัยซีทีสจากดินบริเวณภูหินลาด
ข้อฟ้า. คณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- พิพิธภัณฑสถาน 50 พรรษา. สายใยอาหารในระบบนิเวศป่าชายเลน. คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- พรรณรวี โพธิ์เทียนทอง.2559. “Antimicrobial Resistance A Global Concern Antimicrobial
Resistance A Global Concern” วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม
- ภริภัทร หุระนันท์. 2548 ความหลากหลายทางชีวภาพ. [Online]. Available:
http://chm-thai.onep.go.th/chm/MarineBio/WEBPAGE_USED/MANGROVE.html
- มุกดา สุขสวัสดิ์. 2544. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. กรุงเทพฯ: โอเดียมสโตร์.
- ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. 2546. การแยกแอคติโนมัยซีทีสที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินรังกปลวกใน
ประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.
- รัตนารณ ศรีวิบูลย์. 2541. “การเก็บรวบรวมและการตรวจหา Actinomycetes จากดินป่าชายเลน
ที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพ”, วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 6(1), 23-33.
- รัตนารณ ศรีวิบูลย์ และ จันทรจรัส วัฒนะโชติ. 2558. การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจาก
แอคติโนมัยซีทีและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก. สถาบันวิทยาศาสตร์ทาง ทะเล. มหาวิทยาลัย
บูรพา.
- ลักขมี ศุกระกาญจนะ. 2556. การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแอคติโนมัยซีทีที่สามารถผลิต
เอนไซม์ย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

- ลลิตา วังเงิน. 2554. การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอกติโนมัยซีทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- วชิร ใจภักดี. 2544. การคัดแยกแอกติโนมัยซีทที่สร้างสารต้านทานเชื้อราจากดินในประเทศไทยและตรวจลำดับเบสของยีน 16S rDNA. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2550. แบคทีเรียคุณค่าสูงจากธรรมชาติ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และหน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งมหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยไอซอาก้า (MU-OU:CRC) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วราภรณ์ พาราสุข. 2544. สารชีวโมเลกุล. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วัลญา เลขยันต์. 2541. การศึกษาจำนวน Actinomycetes ในดินใต้ต้นไม้ต่างๆ บริเวณภูตกาในเดือนเมษายน, มิถุนายน และพฤศจิกายน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วสุ ปฐมอารีย์. 2554. ปฏิบัติการแอกติโนมัยซีทเบื้องต้น. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศิริลักษณ์ อนันต์ณัฐศิริ. 2549. หลักการขยายด้านจุลชีพ. พิมพ์ครั้งที่ 2: กรุงเทพฯ: บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้ง กรุ๊ป.
- ศูนย์ศึกษารรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี. 2560. [Online] Available : <http://www.saensukcity.com/ป่าชายเลนชลบุรี.html>
- ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. 2560. [Online] Available : http://chm-thai.onep.go.th/chm/data_province/chachoengsao/marine.html
- สถานีวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 5 สมุทรสาคร. 2559. สมุทรสาคร: บริษัท พี.เอส.พี สเปเชียลตี้ส์ จำกัด
- สุรชัย รัตนสุข. 2557. ประสิทธิภาพของสมุนไพรพื้นบ้านในการยับยั้ง *Candida albicans* Efficiency of local medicinal plant on growth inhibition of *Candida albicans*. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สทวท.). มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด.
- สุภานันท์ ซาลิม. 2548. สารต้านแบคทีเรียจากแอกติโนมัยซีทในทะเลของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อนุเทพ ภาสุระ. 2558. “การใช้ชีวภัณฑ์จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวที่ปลูกในสภาวะดินเค็มจากน้ำทะเล” คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อรอนงค์ พริงสุลกะ. 2555. จุลชีววิทยาทางการแพทย์: แบคทีเรียก่อโรค. กรุงเทพฯ : จรัสสินทวงศ์ การพิมพ์.
- อิสยา จันทรวิธานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. 2556. แบคทีเรียทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Ahmed E., S. J. M. Holmström. 2014. "Siderophores in environmental research: roles and applications" *Microb Biotechnol.* 7(3): 196–208.
- Ahmad F., Ahmad I., Mohd S., 2004. "Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of Azotobacter and Fluorescent Pseudomonas in the Presence and Absence of Tryptophan." 29-34
- Albert L. McQuown. 1995. "Actinomycosis and Nocardiosis" *Am J Clin Pathol* (1995) 45 (2): 115.
- Alternative Medicine.2002. Phosphatidylcholine. *Thorne Research, Inc.* p 150
- Arasu M, Asha KRT, Duraipandiyan V., Ignacimuthu S. and Agastain P. 2012 " Characterization and phylogenetic analysis of novel polyene type antimicrobial metabolite producing actinomycetes from marine sediments : Bay of Bengal India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.*2(10) pp: 803-810
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. Moisture in Animal Feed. (7.007) Official Methods of Analysis. 15th ed. Animal feeding stuffs – Determination of moisture and other volatile matter content ISO 6496.
- Azman A., Othman, S. Velu, K., Chan, and L., Lee. 2015. Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Front Microbiol.* 2015; 6: 856.
- Balachandran C., Duraipandiyan V., Ignacimuthu S. 2012. "Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549)" *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (2012)S392-S400
- Ballav, S., Kerkar, S., Thomas, S. and Augustine, N. 2014. "Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites." *Journal of Bioscience and Bioengineering.*n.d.: 1-8
- Barkar EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. 2016. Taxonomy, physiology and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1– 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bbosa G. S, Mwebaza N. , Odda J, Kyegombe D. B. and Ntale M. 2014. “Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance.” *SciRes.* 6(5) : 410-425
- Benimeli, C.S., Fuentes, M.S., Abate, C.M. and Amoroso, M.J. 2008. “Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth.” *Int. Biodeterior. Biodegrad*, 61, 233-239.
- Bele, A. A. and Khale A. 2010. An Overview on Thin Layer Chromatography. *International Journal of pharmaceutical Sciences and Reserch.* 6 : 256–267
- Bentley S. D. , K. F. Chater†, A.-M. Cerden˜ o-Ta´ rraga, G. L. Challis, N. R. Thomson K. D. James *et al.*, 2002. “Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).” *Nature vol. 417*
- Berdy JC. 1995. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58:1-28
- Byrne J. 2011. Peptidoglycan - The bacterial wonder wall. [Online] Available : <https://blogs.scientificamerican.com/disease-prone/peptidoglycan-the-bacterial-wonder-wall/>
- Calderón, S. M., Nguyen, D. D., Kapono, A. C., Herron, P., Dorrestein, C. P., and Sohlenkamp, C. “Plasticity of *Streptomyces coelicolor* Membrane Composition Under Different Growth Conditions and During Development” *Front. Microbiol.*6:1465.
- Calderón, S. M., Nguyen, D. D., Kapono, A. C., Herron, P., Dorrestein, C. P., and Sohlenkamp, C. “Plasticity of *Streptomyces coelicolor* Membrane Composition Under Different Growth Conditions and During Development” *Front. Microbiol.*6:1465.
- Castillo, U. 2003. “Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol. Lett*, 224, 183-190.
- Castillo, M.A., Felis, N., Arago, P., Cuesta, G. and Sabater, C. 2006. “Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil.” *Int. Biodeterior. Biodegrad*, 58, 196-202.
- Claude C., 2001. “Comparison of Side Effects of Levofloxacin versus Other Fluoroquinolones.” *Chemotherapy* 2001;47(suppl 3):9–14
- Das, K.D. 1996. *Introductory soil science*. Kalyani Publishers. India: New Delhi.

- Drawnz M., Bonobo R. 2010 “Three Decades of β -Lactamase Inhibitors” *Clin Microbiol* 23(1); 2010
- Edberg S.C., E.W. Rice, R.J. Karlin, M.J. Allen.2000. Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*.
- Emerson R., Ingrid R., da Silvaa, Mayra K., M., João L., Janete M., Araújo. 2012 “Antibiotics produced by Streptomyces.” Review article: *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 466–471
- El-Hamshary. 2015. Thin Layer Chromatography (TLC). Organic Chemistry at CU Boulder.
- Fried, B. and Sherma, J. 1999. Thin-Layer Chromatography. Lafayette College Easton, Pennsylvania.
- Ghooi R. B. and Thatte S. M. 1995. “Inhibition of cell wall synthesis— is this the mechanism of action of penicillins?.” US National Library of Medicine National institutes of Healths. 44(2) : 127-131.
- Gonzalez S. , PHARM.D., JEANNE P. 1998. A Practical Review: Aminoglycosides. *Am Fam Physician*. 1998 58(8):1811-1820
- Hara ,O. and Beppu T. ,1981 “ Mutants blocked in Streptomycin production in *Streptomyces griseus* – the role of a factor.” The Journal of Antibiotics, Department of Agricultural industry, Japan.
- Harris L., James. 1986 “Modified Method for Fungal Slide Culture.” *Journal Of Clinical Microbiology*, p. 460-461
- Hasani , A., Kariminik, A. and Issazadeh., K. 2014. “Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities.” International journal of Advanced Biological and Biomedical Research. 2(1) : 63–75
- Held P., 2012 “Enzymatic Digestion of Polysaccharides” Biofuel Research. *Applications Dept*, BioTek Instruments, Inc.
- Himaman W., Thamchaipenet , Pathom-Aree, Duangmal K,. Actinomycetes from Eucalyptus and their biological activities for controlling Eucalyptus leaf and shoot blight. *Microbiological Research*. 188-189

- Holtmann D., Vernen F., Müller J.M., Kaden D., Risse J.M., Friehs K., Dähne L., Stratmann A. and Schrader J. 2016. “ Effects of particle addition to *Streptomyces* cultivations to optimize the production of actinorhodin and streptavidin.” *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. n.d. : 1-5.
- Hui Dafeng. 2012. *Food Web: Concept and Applications*. *Nature Education Knowledge* 3(12):6
- IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, (the "Gold Book"). 2nd [Online] Available: <https://goldbook.iupac.org/html/R/R05359.html>
- Jaya Sureshbabu. 2016. *Drugs & Diseases : Shigella Infection*. [Online] Available: <http://emedicine.medscape.com/article/968773-overview>
- Janpen T. [a], Rungnapa T., Waraporn Y. and Roongtawan S. 2017. “*In vitro* Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Mangrove Actinomycetes from Eastern Thailand” *Chiang Mai J. Sci.* 2017; 44(2) : 322-337
- Jyothikumar, V., Klanbut, K., Tiong., Rouxburgh, J.S, Hunter, I.S., Smith, T.K. and Herron, P.R. 2012. Cardiolipin synthase is required for *Streptomyces coelicolor* morphogenesis. *Molecular Microbiology*. 84(1): 181-197
- Karin A. , and Daum G.,1999. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.* 266
- Kataoka, A., Sakai, M., Ebina, R., Nonaka, C., Asano, T. and Miyamori, T. 2010. “Soybean-Derived Phosphatidylserine Improves Memory function of the Elderly Japanese Subjects with Memory Complaints.” *J Clin Biochem Nutr.* 47(3) : 246–255
- Kelvin K. P. Lim, Dennis H. Murphy, T. Morgany, N. Sivasothi, Peter K. L. Ng, B. C. Soong, Hugh T. W. Tan, K. S. Tan & T. K. Tan. 2001. “The Ecosystem: Biotic components” *A Guide to Mangroves of Singapore* ; Singapore Science Centre
- Kieser T. , Bibb, M. J. , Buttner, M. J. , Chater, K. F. and Hopwood, D. A. , (2000) . *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Klanbut, K. 2013. “ The role of phospholipids in the growth and development of *Streptomyces*.” *Strathclyde Institute of Pharmacy and Biochemical Sciences*, Glasgow, United Kingdom.
- Kong F. K. , Lisa S. , Kali M. , 2010. “Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology” 118(1): 1–36.

- Kumar V., Bharti A., Negi Y.K., Gusain O.P. and Bisht G.S. 2011. "Taxonomy and antimicrobial activity of moderately salt-tolerant and alkaliphilic *Streptomyces* sp. MN 9(V) isolated from solitary wasp mud nest." Springer-Verlag and the University of Milan.
- Kusakabe H., Hiroyuki O. and Kiyoshi I. 1998. "New Types of Liposidomycins that Inhibit Bacterial Peptidoglycan Synthesis and are Produced by *Streptomyces*" *The Journal of Antibiotics* (1998) 640
- Kye Joon Lee, YONG TAIK RHO. 1993. "Characteristics of spores formed by surface and submerged cultures of *Streptomyces albidoflavus* SMF301" *Journal of General Microbiology* (1993), 139, 3 13 1-3 137
- Lekshmi, M., Ayona J., Navami, S.S. 2014. "Isolation and screening of actinomycetes from marine samples for enzyme production" *International Journal of Scientific & Engineering Research* 12;(5)
- Li, Qinyuan, Xiu Chen, Y., Jiang and Chenglin J., 2016. "Morphological Identification of Actinobacteria, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications" (Ed.), InTech, 10.5772/61461. [Online] Available: <https://www.intechopen.com/books/actinobacteriabasicsandbiotechnologicalapplications/morphologicalidentification-of-actinobacteria>
- Lima, R.E., Silva, I.R., Martins, M.K., Azevedo, J.L. and Araujo, J. M. 2012. "Antibiotics produced by *Streptomyces*." *The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES*. 16(5) : 466-471
- Magda M., Hadeel A., Huda A., Quria., Madeha N.,. 2011. "Spore Forming Bacterium from Oil Contaminated Soil as a Source of a Lipase Enzyme with Exogeneous Lipolytic Activity." *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. P 105-114
- Maitra, P.K. and Roy, S.C. 1960. "Trace elements and the synthesis of vitamin B12 by *Streptomyces olivaceus*." *Biochem. J*, 75, 483-487.
- Martin, A. 1961. *Actinomycetes. Introduction to Soil Microbiology*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Mayo clinic. 2017 "Low Blood Pressure (Hypotension)" [Online] Available: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/low-blood-pressure/symptoms-causes/dxc-20316599>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Müllera, A.O., Klaus, C.M., Schmidt, J., Hofmann, R.U. and Dippe, M. 2012. "New cardiolipin analogs synthesized by phospholipase D- catalyzed transphosphatidylation". *Chemistry and Physics of Lipids*. 165, 787-793
- Parekh J and Chanda S. 2007. "In vitro screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of various Indian plant species against selected pathogens from Enterobacteriaceae" *African Journal of Microbiology Research*. 1 (6) pp. 092-099,
- Parsons B.J. and Rock, O.C. 2013. "Bacterial lipids: Metabolism and membrane homeostasis" *Progress in Lipid Research* 52, 249-276
- Ruan I., 2013. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second edition) Volume 5 and the study of Actinomycetes systematic in China" 2013 Jun 4;53(6):521-30.
- Sandoval-Calderón M., Geiger O., Guan Z., Barona-Gómez F., Sohlenkamp C. 2009. A eukaryote-like cardiolipin synthase is present in *Streptomyces coelicolor* and in most actinobacteria. *J Biol Chem* ;284(26):17383-90
- Santos, P.S., Abad, E.J., Paguia, A.G. and Lat, B.S. 1976. "Vitamin B12 and antibiotics of actinomycetes isolated by a selective method from soil samples." *Philips J. Res.*, 103, 208-220.
- Sette, L.D., de Oliveira, V.M. and Manfio, G.P. 2005. "Isolation and characterization of alachlor-degrading actinomycetes from soil." *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, 81-89.
- Shah, A.M., Wani, A., Qazi, P.H., Rehman, S.-U., Mushtaq, S., Ali, S.A., Hussein, A., Shah, A., Qazi, A.K., Makhdoomi, U.S., Hamid, A. and Kumar, A. 2016. "Isolation and characterization of alborixin from *Streptomyces scabrissporus*: A potent cytotoxic agent against human colon (HCT-116) cancer cells." *Indian Institute of Integrative Medicine, India*
- Sharma, M., Pinki D., and Choudhary M., 2014. "Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Review article. 3(2): 801-832
- Shih H., Liu, Y. Hsu, F. Mulabagal, V. Dodda, R. and Huang, J. 2003. "Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*." *J. Agricult. Food Chem*, 51, 95-99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sohan, S., Arnab P., Abhrajyoti G., and Maitree B. 2015. "Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem" *BMC Microbiol.* 2015; 15: 170.
- Subramani R., Aalbersberg W., 2013. "Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery." 97(21):9291-321
- Tan, B.K> Bogdanov, M., Zhou. J., Dowhan, W., Raetz, C.R.H. and Guan, Z. 2012. Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates. *PNAS.* 109(41): 16504-16509
- Tanvir, R., Sajid, I., Hasnain, S., Kulik, A. and Grond, S. 2016 "Rare actinomycetes *Nocardia caishijiensis* and *Pseudonocardia carboxydivorans* as endophytes, their bioactivity and metabolites evaluation" *Microbiological Research* 185. 22–35.
- Wheeler, G.E., Michell R.H. and Rose A.H. 1970. "Phosphatidylinositol Kinase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*." University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, U.K., 64
- Wildermult H. 1970. "Development and Organization of the Aerial Mycelium in *Streptomyces coelicolor*" *J. gen. Microbiol.* 1970, 60, 43-50
- Wongsakorn P., Khanit S. and Somboon T. 2014. " Identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from Thai mangrove sediment" *TJPS* 2014, 38 (1): 49-56
- Xu, X., Qu, Z., Wang, H., Lin H. D., Wang, C., Xie, Q. Y., Ruan, J.S. and Hong, K. 2011. "*Asanoa hainanensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Acrostichum speciosum* in a mangrove, and emended description of the genus *Asanoa*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 61, 2384 –2388



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

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

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

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

2. Muller Hinton Agar (Himedia)

Beef Extract	2.00	กรัม
Casein acid hydrolysate	17.50	กรัม
Starch	1.50	กรัม
Agar	17.00	กรัม
pH 7.2-7.4		

3. Nutrient agar (NA)

Peptone	5.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Skim milk agar

Skim milk powder	28.0	กรัม
Casein enzymatic hydrolysate	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 7.0 – 7.2

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

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

6. Bouillon gelatin broth (Arai, 1975)

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO ₃	5.0	กรัม
Gelatin	150.0	กรัม

pH 7.0 – 7.2

7. Peptone KNO₃ broth (Arai, 1975)

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO ₃	1.0	กรัม

pH 7.0 – 7.2

8. ISP medium no.4 (Inorganic salt-starch agar : HiMedia laboratories Pvt. Ltd.

A-516, SwastikDishaBusiness park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India)

Soluble starch	10.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	กรัม
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1.0	กรัม
CaCO ₃	2.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NaCl	1.0	กรัม
Trace salt solution	1.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
pH 7.0 – 7.4		
Trace salt solution		
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0.1	กรัม
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.1	กรัม
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

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

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

10. International Streptomyces Project medium no.2 (ISP2) (Atlas, 1993)

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

11. Yeast extract – Malt extract (YEME) (Klanbut, 2013)

Malt extract	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Glucose	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.3		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. Glucose yeast extract agar (GYE) (Gordon & Mihm, 1962)

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Agar	15	กรัม

pH 7.2



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลาย McFarland No 0.5 (JAMA, 1907)

สารละลาย McFarland standard No. 0.5 ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความขุ่นมาตรฐานของการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบสำหรับทดสอบกิจกรรมการด้านการเจริญของเชื้อซึ่งสารละลาย McFarland standard No. 0.5 สามารถเทียบเท่ากับจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1.0×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

ส่วนประกอบของสารละลาย McFarland standard No. 0.5

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

ขั้นตอนการเตรียม

1. ปิเปตกรดซัลฟิวริก 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรที่น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
2. ชั่งสารแบเรียมคลอไรด์ 1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายจากข้อ 1 ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร และสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า absorbance อยู่ในช่วง (0.08-0.1)
4. นำสารละลาย McFarland standard No. 0.5 ที่ได้มาบรรจุใส่หลอดฝาเกลียวปิดสนิทกันการระเหย แล้วนำไปเก็บในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 2 – 30 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งานต้องเขย่าสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน รวมทั้งตรวจสอบความขุ่นทุกเดือน

วิธีการใช้

1. นำสารละลาย McFarland standard No. 0.5 ใส่หลอดทดลอง ทำการเจือจางเชื้อที่ต้องการในน้ำเกลือ 0.85% ให้ความขุ่นเทียบเท่ากับ สารละลาย McFarland standard No. 0.5 โดยเทียบกับแถบกระดาษสีดังรูปภาพที่ 1



รูปที่ 1 การเทียบสารละลาย McFarland standard No. 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายทดสอบไนเตรต Sulfanilic acid reagent

ส่วนประกอบของสารละลาย

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

ขั้นตอนการเตรียม

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

การเตรียมสาร α - naphtholreagent

ส่วนประกอบของสารละลาย

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

ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียมโดยการนำ α -naphthol 1 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. ทำการปิเปตสารละลายกรดอะซีติก 5 นอร์มอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันส่วนสารละลายกรดอะซีติก ความเข้มข้น 5 นอร์มอล เตรียมได้ด้วยการเติม glacial acetic acid 28.75 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 71.25 กรัม

วิธีการเก็บรักษา

ควรเก็บสารเคมีทั้งสองชนิด ไว้ในขวดสีชาซึ่งมีจุกที่ใช้ในการดูดสาร

ภาคผนวก ข

การคำนวณคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

ดัดแปลงมาจาก (AOAC,1990)

วิธีคำนวณน้ำหนักดิน

ตัวอย่างดิน จุดที่ 1 น้ำหนักบีกเกอร์	43.839 กรัม
น้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจางที่ 10^{-1} ก่อนอบ	7.845 กรัม
น้ำหนักของสารแขวนลอยของดินและบีกเกอร์หลังอบ	44.484 กรัม

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเกอร์และสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจางที่ 10^{-1} (กรัม) ก่อนอบ
ได้จาก

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักของบีกเกอร์และดินก่อนอบ} &= \text{น้ำหนักบีกเกอร์ (กรัม)} + \text{น้ำหนักสารแขวนลอยของ} \\ &\text{ดินที่ความเจือจางที่ } 10^{-1} \text{ ก่อนอบ} \\ &= 43.839 + 7.845 \text{ กรัม} \\ &= 51.684 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินที่ใช้ในการแยกเชื้อ (กรัม) ได้จาก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณน้ำหนักดิน (กรัม)} &= \text{น้ำหนักสารแขวนลอยดินและบีกเกอร์ก่อนอบ} - \text{น้ำหนักสารแขวนลอย} \\ &\text{ของดินและบีกเกอร์หลังอบ} \\ &= 51.684 - 44.484 \text{ กรัม} \\ &= 7.200 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ตัวอย่างดินจุดที่ 1 มีปริมาณน้ำหนักดินที่ใช้ในการแยกเชื้อเท่ากับ 7.2 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณหาปริมาณความชื้นในดิน

ตัวอย่างดิน : จุดที่ 1

น้ำหนักบีกเกอร์	45.840	กรัม
น้ำหนักดินก่อนอบ	1.518	กรัม
น้ำหนักดินและบีกเกอร์หลังอบ	46.792	กรัม

คำนวณหาปริมาณน้ำหนักดินหลังอบ (กรัม) จาก

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักดินหลังอบ(กรัม)} &= \text{น้ำหนักดินและบีกเกอร์หลังอบ(กรัม)} - \text{น้ำหนักบีกเกอร์ก่อนอบ} \\ &= 46.792 - 45.840 \text{ กรัม} \\ &= 0.952 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

คำนวณหาปริมาณความชื้นในดิน (%) จาก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณความชื้นในดิน (%)} &= \frac{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักดินหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ (กรัม)}} \times 100\% \\ &= \frac{1.518 - 0.952}{1.518} \times 100\% \\ &= 0.566 \times 100\% \\ &= 37.28 \% \end{aligned}$$

ตัวอย่างดินจุดที่ 1 มีปริมาณความชื้นในดิน (%) เท่ากับ 37.28 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการคำนวณหาน้ำหนักดิน

ตารางที่ แสดงปริมาณของน้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจางหลังอบ

จุดเก็บตัวอย่างดิน	น้ำหนักภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจางที่ 10^{-1} ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักบีกเกอร์กับน้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจางที่ 10^{-1} ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักบีกเกอร์กับน้ำหนักสารแขวนลอยของดินที่ความเจือจางที่ 10^{-1} หลังอบ (กรัม)	ปริมาณน้ำหนักดินที่ใช้ในการแยกเชื้อ (กรัม)
1	43.893	7.845	51.684	44.484	7.200
2	47.689	8.177	55.866	48.484	7.239
3	41.317	8.190	59.507	42.434	7.073
4	46.114	8.223	54.337	47.018	7.319
5	46.113	8.217	51.365	44.048	7.360
6	43.148	8.217	51.365	44.048	7.317
7	44.781	7.234	52.015	45.521	6.494
8	44.594	7.981	52.575	45.670	6.095
9	46.214	8.016	54.230	47.017	7.159
10	44.032	7.464	51.496	44.880	6.616
11	41.026	7.154	48.180	41.784	6.396
12	42.788	8.144	50.932	43.477	7.455
13	50.195	7.817	58.012	50.838	7.174
14	46.206	8.543	54.749	47.085	7.664
15	49.340	8.724	58.064	50.325	7.739
16	42.990	7.782	50.772	43.955	6.817
17	47.857	7.757	55.614	48.922	6.692
18	49.720	8.170	57.890	50.502	7.388
19	40.980	8.090	49.070	41.811	7.259
20	46.547	8.178	54.725	47.282	7.443
21	46.776	8.421	55.197	47.667	7.530
22	41.452	7.967	49.419	42.163	7.256
23	50.205	7.774	57.979	51.223	6.756
24	48.423	8.326	56.785	49.286	7.499

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง แสดงปริมาณของน้ำหนักรวมของดินที่ความเค็มของดินที่ความเค็มของดิน (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่าง ดิน	น้ำหนัก ภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักสาร แขวนลอยของดิน ที่ความเค็มที่ 10^{-1} (กรัม)	น้ำหนักบีกเกอร์ กับน้ำหนักสาร แขวนลอยของดิน ที่ความเค็มที่ 10^{-1} ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักบีกเกอร์ กับน้ำหนักสาร แขวนลอยของดิน ที่ความเค็มที่ 10^{-1} หลังอบ (กรัม)	ปริมาณน้ำหนักดิน ที่ใช้ในการแยกเชื้อ (กรัม)
25	43.483	8.153	51.636	44.172	7.464
26	46.544	8.049	54.593	47.318	7.275
27	43.398	7.554	50.952	43.958	6.994
28	45.627	8.106	53.733	46.318	7.415
29	44.159	7.684	51.843	45.012	6.831
30	42.723	7.189	49.912	43.455	6.457

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง แสดงปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินจากน้ำหนักของดินที่หายไป หลังจากนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่

จุดเก็บ ตัวอย่างดิน	น้ำหนัก ภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักดิน ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน และภาชนะ หลังอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน หลังอบ (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ปริมาณ ความชื้น (%)
1	45.840	1.518	46.792	0.952	0.566	37.28
2	42.671	1.556	43.679	1.008	0.548	35.21
3	41.328	1.707	42.230	0.902	0.805	47.15
4	46.704	1.789	47.626	0.922	0.867	48.46
5	42.822	1.785	43.700	0.878	0.907	50.81
6	41.030	1.736	41.977	0.947	0.789	45.44
7	40.934	1.416	41.735	0.801	0.615	43.43
8	48.696	1.791	49.620	0.924	0.867	48.40
9	41.975	1.690	42.892	0.917	0.773	45.73
10	44.354	1.495	45.180	0.826	0.669	44.75
11	42.582	1.100	43.220	0.638	0.462	42
12	48.325	1.020	48.923	0.598	0.422	58.62
13	47.044	1.040	47.660	0.616	0.424	40.77
14	48.278	1.057	48.938	0.660	0.397	37.55
15	43.233	1.045	43.868	0.635	0.410	39.23
16	45.613	1.174	48.850	0.687	0.487	41.48
17	42.816	1.005	43.374	0.558	0.447	44.47
18	48.181	1.103	48.859	0.678	0.425	38.53
19	41.567	1.036	42.200	0.633	0.403	38.89
20	46.826	1.129	47.528	0.702	0.427	37.82
21	46.537	1.177	47.191	0.654	0.523	44.43
22	41.336	1.217	42.117	0.781	0.436	35.82
23	42.475	1.019	43.469	0.695	0.324	31.79
24	44.308	1.277	45.006	0.698	0.579	45.34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง แสดงปริมาณความชื้นในตัวอย่างดินจากน้ำหนักของดินที่หายไป หลังจากนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ (ต่อ)

จุดเก็บ ตัวอย่างดิน	น้ำหนัก ภาชนะ (กรัม)	น้ำหนักดิน ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน และภาชนะ หลังอบ (กรัม)	น้ำหนักดิน หลังอบ (กรัม)	น้ำหนัก ของน้ำ (กรัม)	ปริมาณ ความชื้น (%)
25	42.617	1.290	43.461	0.844	0.446	34.57
26	41.713	1.172	42.505	0.792	0.380	32.42
27	41.114	1.246	41.955	0.841	0.405	32.50
28	46.203	1.122	46.980	0.777	0.345	30.74
29	42.614	1.158	43.363	0.749	0.409	35.31
30	44.817	1.340	45.512	0.695	0.645	48.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง แสดงค่าความเป็นกรดเบสของตัวอย่างดิน

จุดเก็บตัวอย่างดิน	ค่าความเป็นกรด-เบส	
	ณ จุดเก็บตัวอย่าง	ห้องปฏิบัติการ
1	7.49	7.59
2	7.55	8.12
3	7.61	7.86
4	7.41	7.57
5	7.35	7.78
6	7.54	8.04
7	7.33	8.15
8	7.35	8.03
9	7.43	7.70
10	7.32	8.16
11	7.28	8.14
12	7.35	7.71
13	7.14	8.01
14	7.23	7.89
15	7.41	8.10
16	7.47	7.80
17	7.45	7.59
18	7.41	7.77
19	7.65	8.03
20	7.32	7.62
21	7.28	7.48
22	7.35	8.14
23	7.45	7.89
24	7.36	7.51
25	7.33	7.74
26	7.50	7.96
27	7.27	8.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง แสดงค่าความเป็นกรดเบสของตัวอย่างดิน (ต่อ)

จุดเก็บตัวอย่างดิน	ค่าความเป็นกรด-เบส	
	ณ จุดเก็บตัวอย่าง	ห้องปฏิบัติการ
28	7.28	8.05
29	7.40	7.74
30	7.30	8.18



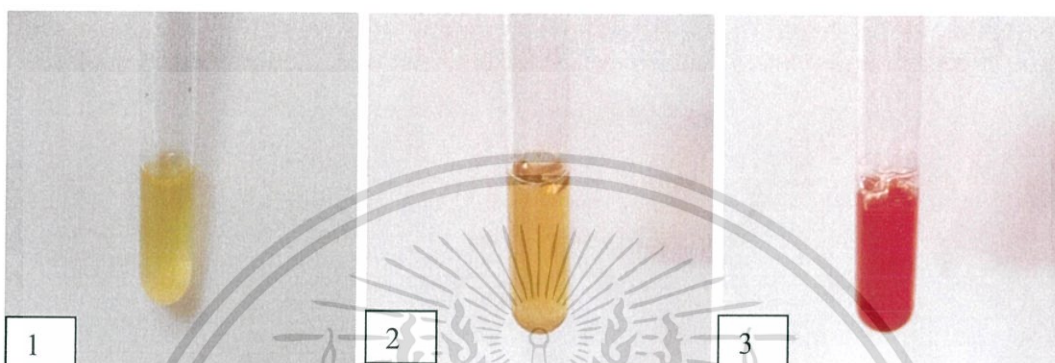
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบการย่อยสลายไนเตรต

การย่อยสลายไนเตรตในอาหารเหลว Peptone KNO₃ broth



- (1) ชุดควบคุมการย่อยสลายไนเตรต
- (2) แสดงผล [-] สีอาหารไม่เปลี่ยน ไม่เกิดการย่อยสลายไนเตรต
- (3) แสดงผล [+] สีอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดง เกิดการย่อยสลายไนเตรต

การทดสอบการตกตะกอนและการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนม

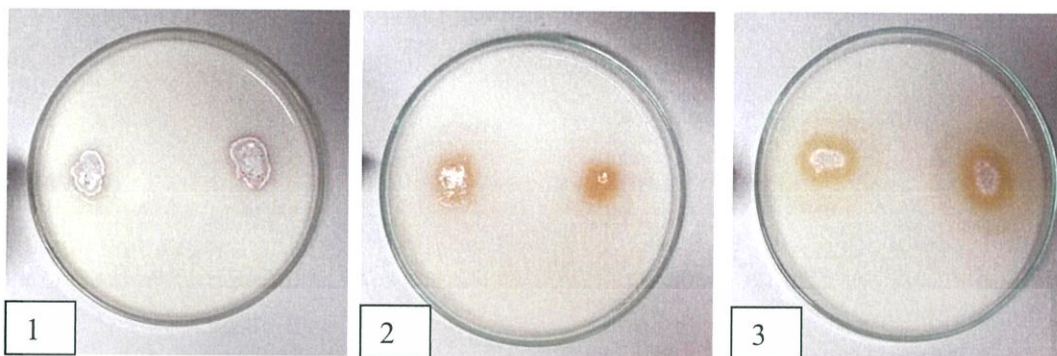
การทดสอบการตกตะกอนโปรตีนนมในหลอดอาหาร skim milk 10%



- (1) ชุดควบคุมการตกตะกอนโปรตีนนม
- (2) แสดงผล [-] ไม่เกิดการตกตะกอนโปรตีนนมที่บริเวณก้นหลอดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- (3) แสดงผล [W] เกิดการตกตะกอนโปรตีนนมเล็กน้อยที่บริเวณก้นหลอดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- (3) แสดงผล [+] เกิดการตกตะกอนโปรตีนนมที่บริเวณก้นหลอดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

การทดสอบการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร Skim milk agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- (1) แสดงผล [-] ไม่เกิดการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร อาหารไม่เปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีขาวใส
 (2) แสดงผล [W] เกิดการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร อาหารเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีขาวใสไม่มีสีเล็กน้อย
 (3) แสดงผล [+] เกิดการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร อาหารเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีขาวใส

การทดสอบการย่อยสลายแป้ง

การทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Inorganic salt starch agar

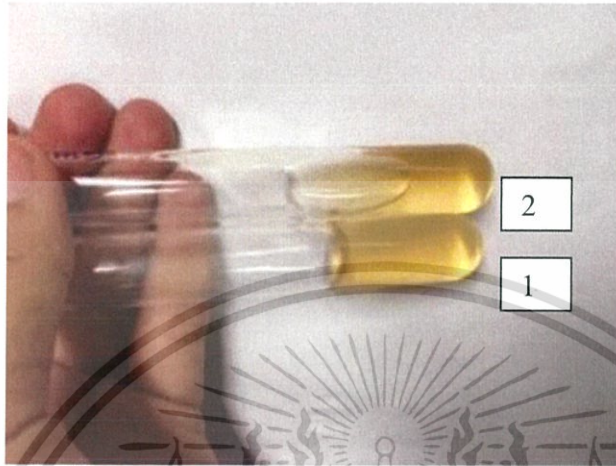


- (1) แสดงผล [-] ไม่เกิดการย่อยสลายแป้ง
 (2) แสดงผล [W] เกิดการย่อยสลายแป้งเล็กน้อย
 (3) แสดงผล [+] เกิดการย่อยสลายแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการย่อยสลายเจลาติน

การทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหาร Bouillion gelatin broth



- (1) แสดงผล [-] ไม่เกิดการย่อยสลายเจลาติน
 (2) แสดงผล [+] เกิดการย่อยสลายเจลาติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

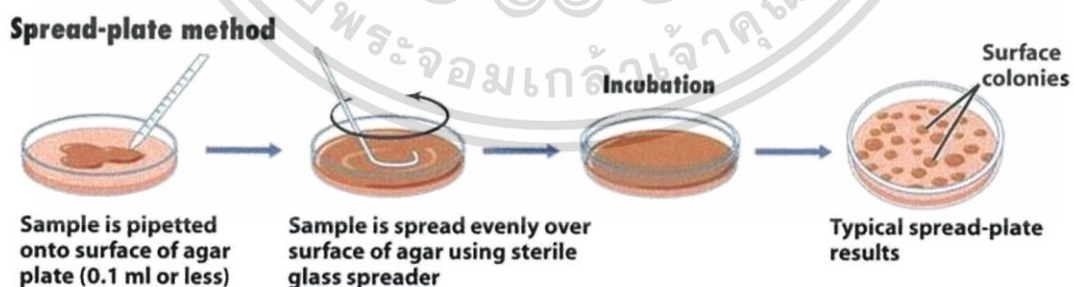
ภาคผนวก ง

เทคนิคทางจุลชีววิทยา

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (บทปฏิบัติการจุลอาหาร ,2556)

ในการศึกษาทางจุลชีววิทยาสิ่งที่ขาดไม่ได้ คือ หลักการและเทคนิคพื้นฐานในการปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาอย่างถูกวิธี เพราะงานทางจุลชีววิทยาต้องการความสะอาดและปลอดภัยเป็นอย่างสูง ดังนั้น การฝึกเทคนิคพื้นฐาน เช่น การแยกเชื้อบริสุทธิ์ (Isolation of pure culture) และการถ่ายเชื้อ (Culture transfer) นอกจากจะฝึกให้สามารถแยกเชื้อและถ่ายเชื้อได้ ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อให้หลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดการปนเปื้อน (Contamination) ของเชื้ออื่นที่ไม่ต้องการจากสภาพแวดล้อมที่กำลังทำการทดลอง

1. Spread-Plate Technique ในแหล่งธรรมชาตินั้นปกติเชื้อแบคทีเรียจะเติบโตอยู่รวมกันหลายๆสายพันธุ์ เพื่อการคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องมีขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) โดยเทคนิคที่ทำได้ง่ายคือ Spread plate technique ซึ่งเทคนิคนี้แบคทีเรียที่ถูกทำให้เจือจางให้มีจำนวนประมาณ 100-200 เซลล์หรือน้อยกว่าจะถูกนำไปวางตำแหน่งตรงกลางของจานเพาะเชื้อ แล้วทำการเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วด้วยแท่งแก้วรูปตัว L หลังจากบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม จะเกิดโคโลนี (Colony) ของเชื้อแบคทีเรียขึ้น ดังนั้นจะทำให้เกิดการแยกจุลินทรีย์ออกมาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ขึ้นโดยการนำโคโลนีที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารใหม่ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Streak-Plate Technique

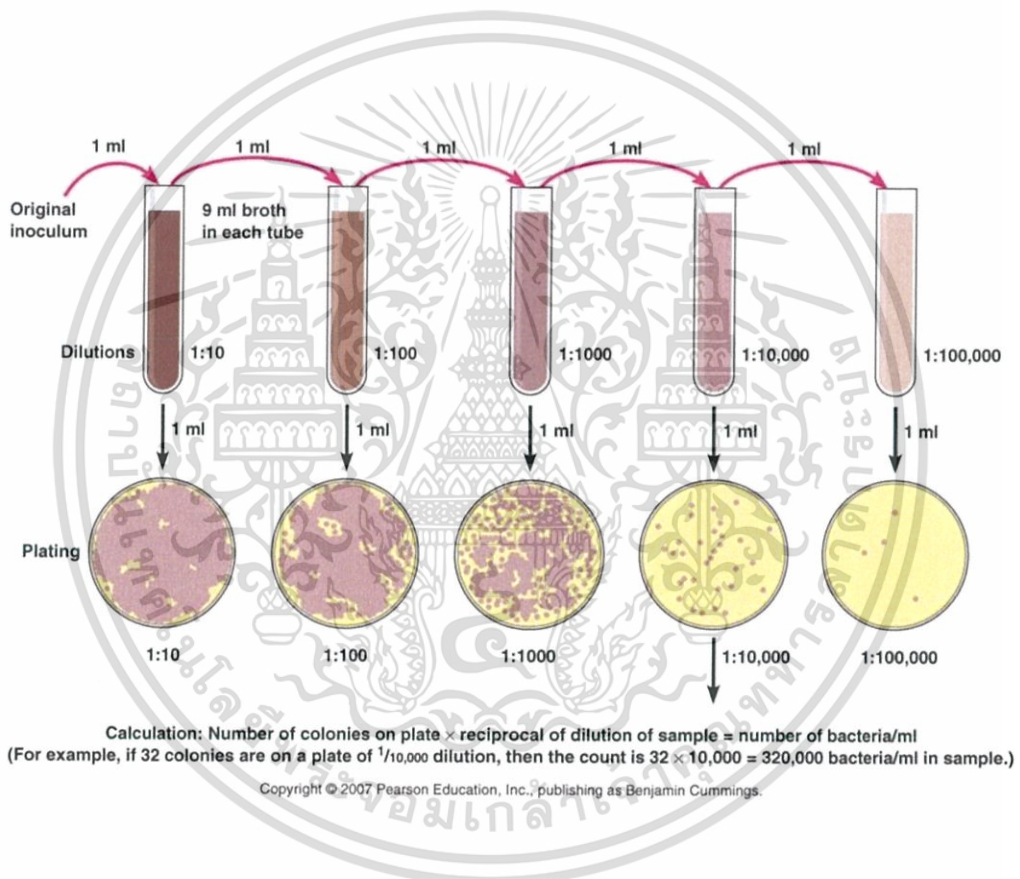


รูป เทคนิคการ spread plate

ที่มา <https://www.pinterest.com/pin/430164201880950008/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Pour Plate Technique เทคนิคการเพาะเชื้อแบบ Pour-plate technique ก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้เช่นกัน โดยตัวอย่างเริ่มต้นจะถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นหลายๆ ระดับด้วยเทคนิค Serial dilution เพื่อให้เชื้อถูกเจือจางมากพอที่จะทำให้เกิดโคโลนีเดี่ยวๆ บนจานเพาะเชื้อ โดยนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเติมลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วทำการเทอาหาร Agar Media ไปในจานเพาะเชื้อ (โดยอุณหภูมิของอาหารเพาะเชื้อประมาณ 48-50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะไม่ทำให้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตายได้) ผสมอาหารและเชื้อให้เข้ากันและให้เกิดการกระจาย อย่างสม่ำเสมอด้วยการหมุนจานเพาะเชื้อ เมื่อวันเกิดการแข็งตัว เซลล์จุลินทรีย์จะถูกตรึงให้อยู่ด้านในของอาหาร และจะเกิดโคโลนีเดี่ยวของเชื้อขึ้น

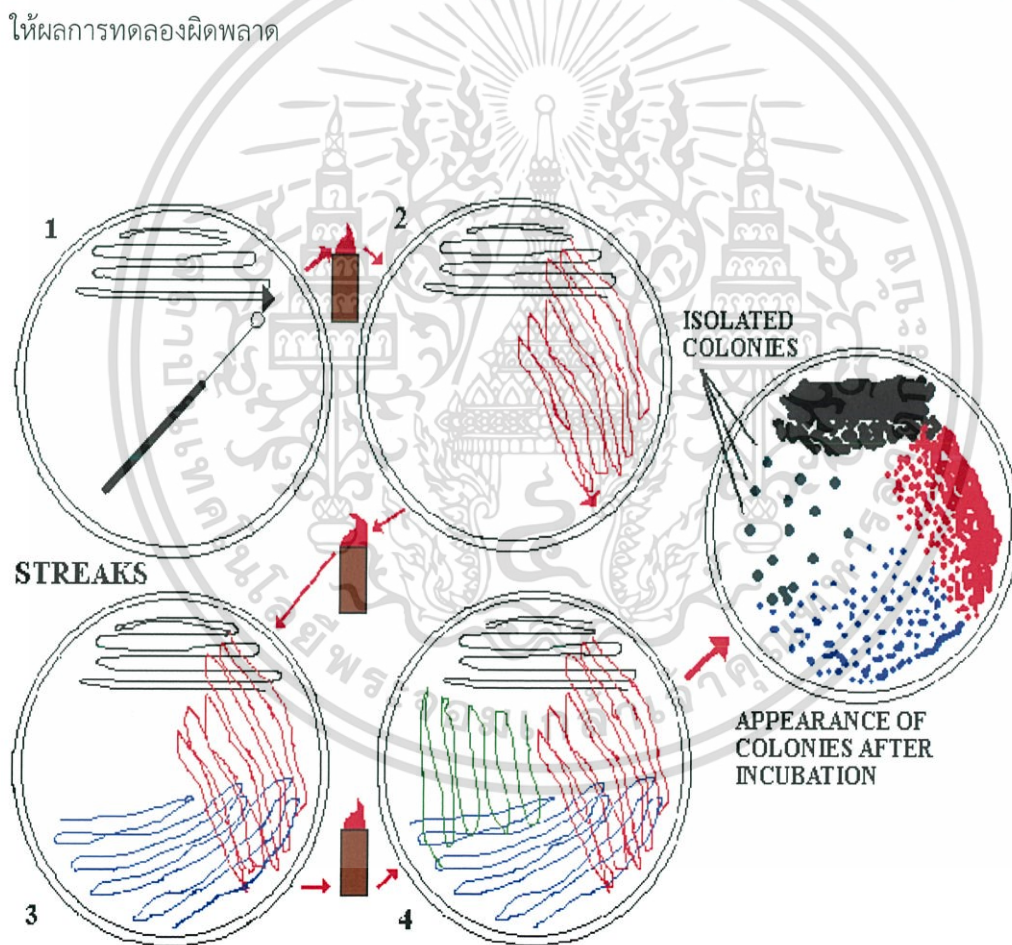


รูป วิธีการ pour plate

ที่มา <http://microbeonline.com/pour-plate-method-principle-procedure-uses-dis-advantages/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Streak-Plate Technique เทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์คือ วิธี cross streak plate ซึ่งทำได้โดยใช้ Loop ตะวอย่างแล้วลากหรือขีด (Streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (Agar plate) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุด ให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกัน โดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบเมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจะมีการศึกษาเชื้อต่อไปในด้านต่างๆ ซึ่งจะต้องมีการถ่ายเชื้อจากอาหารเดิมไปยังอาหารใหม่ หรือมีการเพาะเชื้อลงในอาหารเพื่อการทดสอบและการวิเคราะห์ต่างๆ ดังนั้นการเรียนรู้เทคนิคที่ถูกต้องในการถ่ายเชื้อจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งต้องอาศัยหลักการของ aseptic technique เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นซึ่งจะทำให้ผลการทดลองผิดพลาด



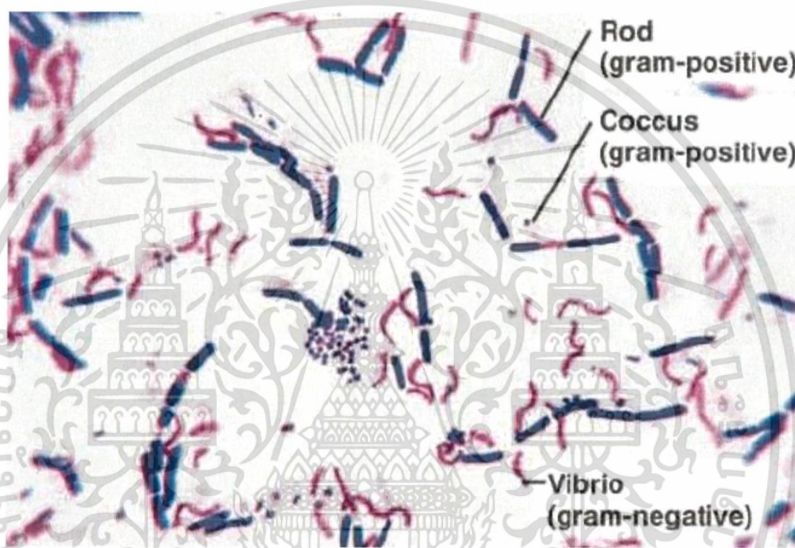
รูป เทคนิคการ streak plate

ที่มา www.personal.psu.edu/faculty/k/h/khb4/enve301/301labs/lab4pureculture.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย้อมแกรม

เป็นวิธีการเบื้องต้นในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ การย้อมแบบนี้จัดเป็นการย้อมแบบ differential staining ซึ่งหมายถึงการใช้สีย้อมตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปสีย้อมแรกเรียกว่า primary stain ซึ่งได้แก่สี crystal violet ส่วนสีที่ 2 เรียกว่า counter stain หรือ secondary stain สีที่ใช้คือ safranin o แบคทีเรียที่ย้อมติดสีแรก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียที่ย้อมติดสีที่ 2 เป็นแบคทีเรียแกรมลบระหว่างการย้อมสีแรกกับสีที่ 2 จะมีการใส่สารละลายไอโอดีน ซึ่งทำหน้าที่เป็น mordant ช่วยให้ crystal violet จับกับแบคทีเรียแกรมบวกได้แน่นไม่หลุดเมื่อล้างออกด้วย สารละลายแอลกอฮอล์



รูป ลักษณะการติดสีของเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ

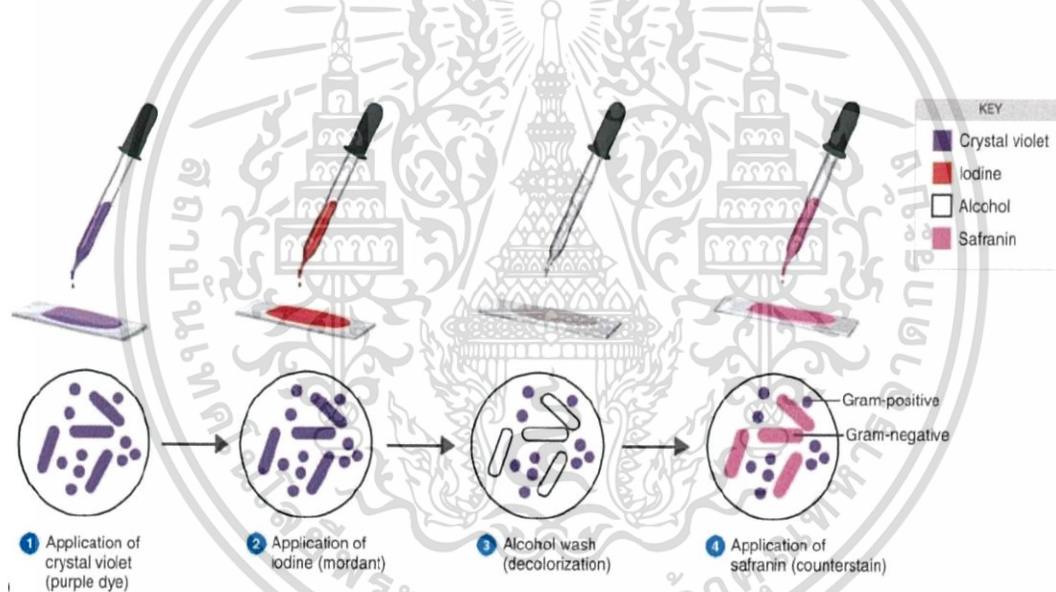
ที่มา: <http://www.medicinehack.com/2012/02/gram-staining-procedure-mechanism.html>

การที่แบคทีเรียจะติดสีแบบใดนั้น เนื่องจากส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียต่างกัน พวกแกรมลบจะมีปริมาณไขมันที่ผนังเซลล์สูงทำให้เมื่อชะล้างสีด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ ไขมันจะถูกล้างออกและสารประกอบเชิงซ้อน crystal violet – iodine จะหลุดออกจากเซลล์ได้ง่ายเพราะผนังเซลล์จะเกิดรูพรุนมากขึ้น อย่างไรก็ตามการติดสีของแบคทีเรียโดยเฉพาะอย่างยิ่ง crystal violet มีผลจากปัจจัยภายนอกหลายประการ เช่น ปริมาณความร้อนที่ใช้ระหว่างการตรึงรอย smear การใช้ปริมาณเซลล์มากเกินไปบนรอย smear ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมแต่ละขั้นตอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารละลายไอโอดีนและการชะล้างสีด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ อายุของแบคทีเรีย (ปกติควรมีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง) ดังนั้นในการย้อมสีแบบนี้ไม่ควรให้ปัจจัยภายนอกมีอิทธิพลต่อผลของการย้อม การจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มนี้ มีประโยชน์อย่างมากในการค้นคว้าวิจัยทางจุลชีววิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีปฏิบัติ

1. ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง
2. เตรียมรอย smear และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน
3. หยดสี crystal violet ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที
4. เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอย smear และทิ้งไว้ 1 นาที
5. เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าเกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำ ผ่านเบา ๆ
6. ชับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี safranin o ให้ทั่วรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที
7. เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้ง
8. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100x แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง



รูป วิธีการย้อมแกรม

ที่มา: <http://www.medicinehack.com/2012/02/gram-staining-procedure-mechanism.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำ Slide culture (บงกชวรรณ, 2550)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทบนแผ่นสไลด์ (slide culture technique) เป็นวิธีการที่ประยุกต์มาจากการศึกษาลักษณะของเซลล์และสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียเส้นสายมีลักษณะคล้ายเชื้อราจึงสามารถนำเทคนิค slide culture มาประยุกต์ใช้ได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์จะช่วยให้เห็นลักษณะของเส้นใย และการเรียงตัวของสปอร์ที่แท้จริงชัดเจน และสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาไลต์ไว้สำหรับอ้างอิง และเป็นตัวอย่างในการศึกษาต่อไปได้



รูป การทำ slide culture

ที่มา: <http://blog.labplanet.com/2011/10/28/fungi-slide-culture/>

ขั้นตอนการทำ

1. การเตรียม sterile culture plates

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

3. การ inoculate เชื้อ

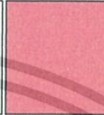



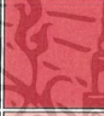
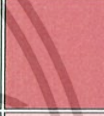








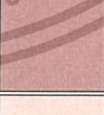


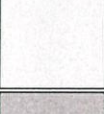




- 3.1 ใช้ใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อตัดก้อนวุ้นขนาด 1 x 1 เซนติเมตร นำไปวางบนแผ่นสไลด์ที่อยู่ในจานอาหารให้อยู่บริเวณกลางแผ่นสไลด์
- 3.2 ใช้ needle ปลายงอเขี่ยเชื้อจากโคโลนีขนาดประมาณหัวไม้ขีดไฟ นำไปจิ้มลงด้านข้างแต่ละด้านของก้อนวุ้นจนครบ 4 ด้าน แล้วคีบแผ่นกระจกปิดสไลด์ที่อยู่ในจานอาหารปิดลงบนก้อนวุ้น
- 3.3 เติมน้ำกลั่นให้กระดาษซับมีความชื้นทั่วแผ่นสไลด์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 7 – 14 วัน จนกระทั่งเชื้อมีการเจริญของเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ตรวจสอบได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยไม่ต้องมีการย้อมสี

4. การย้อมสีเส้นใย




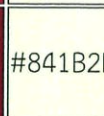

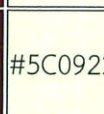

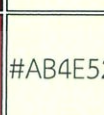

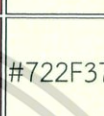
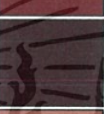
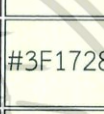







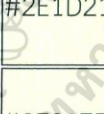





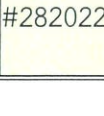


- 4.1 หยด methylene blue ลงบนสไลด์ที่สะอาด 1 – 2 หยดแล้วคีบกระจกปิดสไลด์ที่มีเชื้อวางทับลงไปให้แนบสนิทระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
- 4.2 นำแผ่นสไลด์ไปตรวจดูรูปร่างลักษณะของเส้นใย การเรียงตัวของสปอร์ของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก จ

กระดาศสีมาตรฐาน (the NBs/ABCC color system) (Mundie,1995)

Abbreviation, number, color	Munsell (chart span) centroid	Mundie RGB	Mundie Swatch	convert from Munsell	Foster Swatch
Pink					
v.Pk 1 Vivid Pink	(9RP-1R,1-4R) 1R8/13 OUT	#FF7E93		#FFB5BA	
s.Pk 2 Strong Pink	(9RP-1R,1-4R) 1.2R6.9/8.2	#FD7B7C		#EA9399	
deep Pk 3 Deep Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.1R6/11.1	#F3545E		#E4717A	
l.Pk 4 Light Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.6R8.5/4	#FFBCAD		#F9CCCA	
m.Pk 5 Moderate Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.8R7.2/5.3	#EE9086		#DEA5A4	
d.Pk 6 Dark Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.7R5.9/6.1	#C76864		#C08081	
p.Pk 7 Pale Pink	(9RP-1R,1-6R) 2.0R8.7/2.1	#FFCBBB		#EAD8D7	
gy.Pk 8 Grayish Pink	(9RP-1R,1R-6R) 2.6R7.2/2.3	#CF9B8F		#C4AEAD	
pkWhite 9 Pinkish White	(1-9R,9R-1YR,1- 7YR) 5.8R9/0.8	#F9DBC8		#EAE3E1	
pkGy 10 Pinkish Gray	(1-9R,9R-1YR,1- 7YR) 9.8R7.4/1	#C8A696		#C1B6B3	
Red					
v.R 11 Vivid Red	(1-9R) 5R3.9/15.4 OUT	#C10020		#BE0032	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

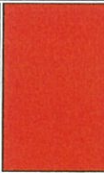

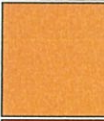

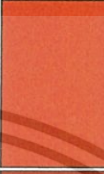















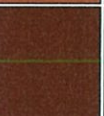
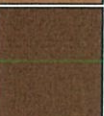
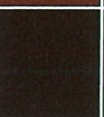
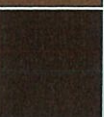
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

s.yPk 26 Strong Yellowish Pink	(4-9R,9R-1YR,1- 2YR) 8.4R7/9.5	#FF7A5C		#F99379	
deep yPk 27 Deep Yellowish Pink	(4-7R) 5.5R5.8/12.1	#F64A46		#E66761	
l.yPk 28 Light Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1- 7YR) 1.9YR8.2/4.6	#FFB28B		#F4C2C2	
m.yPk 29 Moderate Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1- 7YR) 0.7YR7.2/4.9	#EE9374		#D9A6A9	
d.yPk 30 Dark Yellowish Pink	(6-8R) 7R6/6.1	#CC6C5C		#C48379	
p.yPk 31 Pale Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1- 8YR) 4.2YR8.6/2.2	#FFC8A8		#ECD5C5	
gy.yPk 32 Grayish Yellowish Pink	(6-9R,9R-1YR,1- 5YR) 1.3YR7.2/2.4	#D39B85		#C7ADA3	
Brownish Pink					
brPk 33 Brownish Pink	(5-8YR) 7YR7.1/2,3	#CD9A7B		#C2AC99	
Reddish Orange					
v.rO 34 Vivid Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1- 2YR) 9.8R5.4/14.5	#F13A13		#E25822	
s.rO 35 Strong Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1- 2YR) 9.3R5.4/12.2	#FFB961 see #70		#D9603B	
deep rO 36 Deep Reddish Orange	(7-9R,9R-1YR,1- 2YR) 9.2R3.9/12.1	#A91D11		#AA381E	


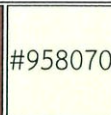

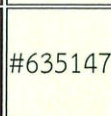

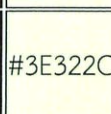

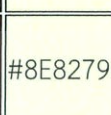

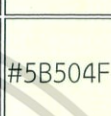
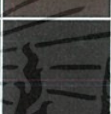







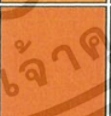

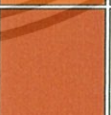
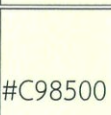

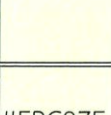
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

l.gy.Br 60 Light Grayish Brown	(5-8YR) 6.4YR5.4/2.2	#946B54		#958070	
gy.Br 61 Grayish Brown	(3-8YR) 5.5YR3.5/1.8	#5A3D30		#635147	
d.gy.Br 62 Dark Grayish Brown	(3-8YR) 5.5YR2/1.5	#32221A		#3E322C	
l.brGy 63 Light Brownish Gray	(2-8YR,8YR-1Y,1-4Y) 7YR5.4/1.2	#8B6D5C		#8E8279	
brGy 64 Brownish Gray	(1-8YR,8YR-1Y,1-4Y) 5.65R3.4/0.9	#503D33		#5B504F	
brBlack 65 Brownish Black	(1-8YR,8YR-1Y,1-4Y) 7.8YR0.6/0.9 OUT	#140F0B		#28201C	
Orange Yellow					
v.OY 66 Vivid Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 8.6YR7.3/15.2 OUT	#FF8E00		#F6A600	
brill.OY 67 Brilliant Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 0.1Y8.1/10.5 OUT	#FFB02E		#FFC14F	
s.OY 68 Strong Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.1YR7.1/11.6	#FF8E0D		#EAA221	
deep OY 69 Deep Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 8.6YR6/12.1 OUT	#D76E00		#C98500	
l.OY 70 Light Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.4YR8.3/6.8	#FFB961 see #35		#FBC97F	
m.OY 71 Moderate Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 8.7YR7.2/8.3	#F7943C		#E3A857	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

d.OY 72 Dark Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.3YR6/7.9	#C37629		#BE8A3D	
p.OY 73 Pale Orange Yellow	(7-8YR,8YR-1Y) 9.2YR8.7/4.4	#FFCA86		#FAD6A5	
Yellowish Brown					
s.yBr 74 Strong Yellowish Brown	(7-8YR,8YR-1Y) 8.8YR4.6/8.5	#95500C		#996515	
deep yBr 75 Deep Yellowish Brown	(8YR-1Y) 8.8YR3.1/5	#593315		#654522	
l.yBr 76 Light Yellowish Brown	(7-8YR,8YR-1Y) 8.7YR6.5/5	#BB8B54		#C19A6B	
m.yBr 77 Moderate Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.5YR4.4/3.9	#7D512D		#826644	
d.yBr 78 Dark Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.4YR2.3/3.3	#3F2512		#4B3621	
l.gy.yBr 79 Light Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.7YR6.4/2.5	#B48764		#AE9B82	
gy.yBr 80 Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 9.5YR4.6/2.1	#785840		#7E6D5A	
d.gy.yBr 81 Dark Grayish Yellowish Brown	(8YR-1Y) 8.8YR2.5/1.6	#3D2B1F		#483C32	
Yellow					
v.Y 82 Vivid Yellow	(1-7Y) 3.3Y8/14.3 OUT	#FFB300		#F3C300	
brill.Y 83 Brilliant Yellow	(1-7Y) 4.4Y8.7/8.9	#FFCF40		#FADA5E	
s.Y 84 Strong Yellow	(1-7Y) 3.7Y7.2/9.3	#E59E1F		#D4AF37	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

deep Y 85 Deep Yellow	(1-7Y) 3.7Y5.9/9.1	#B57900		#AF8D13	
l.Y 86 Light Yellow	(1-7Y) 4.3Y8.8/6.8	#FFD35F		#F8DE7E	
m.Y 87 Moderate Yellow	(1-7Y) 3.8Y7.1/6.5	#D79D41		#C9AE5D	
d.Y 88 Dark Yellow	(1-7Y) 3.9Y6/6.4	#B07D2B		#AB9144	
p.Y 89 Pale Yellow	(1-7Y) 4.7Y9/3.8	#FFDB8B		#F3E5AB	
gy.Y 90 Grayish Yellow	(1-9Y) 4.4Y7.2/3.8	#CEA262		#C2B280	
d.gy.Y 91 Dark Grayish Yellow	(1-7Y) 3.8Y5.9/4	#A47C45		#A18F60	
yWhite 92 Yellowish White	(7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 4.5Y9.2/1.2	#FFE2B7		#F0EAD6	
yGy 93 Yellowish Gray	(7-8YR,8YR-1Y,1-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 3.8Y7.4/1.4	#CAA885		#BFB8A5	
Olive Brown					
l.OLBr 94 Light Olive Brown	(1-4Y) 2.1Y4.9/7.9	#945D0B		#967117	
m.OLBr 95 Moderate Olive Brown	(1-4Y) 2.7Y3.6/5.5	#64400F		#6C541E	
d.OLBr 96 Dark Olive Brown	(1-4Y) 2Y1.9/2.2	#302112		#3B3121	
Greenish Yellow					
v.gY 97 Vivid Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.1Y8.2/12 OUT	#F4C800		#DCD300	
brill.gY 98 Brilliant Greenish Yellow	(7-9Y,9Y-2GY) 9.8Y8.8/9.5	#FFDC33		#E9E450	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OLGy 113 Olive Gray	(4-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 8.1Y3.5/0.9	#4D4234		#57554C	
OLBlack 114 Olive Black	(4-9Y,9Y-2GY,2-4GY) 9Y1.1/0.9	#121910		#25241D	
Yellow Green					
v.YG 115 Vivid Yellow Green not vivid yellowish green see #129	(2-8GY) 5.4GY6.8/11.2 OUT	#93AA00		#8DB600	
brill.YG 116 Brilliant Yellow Green	(2-8GY) 4.9GY8.2/9.1	#CED23A		#BDDA57	
s.YG 117 Strong Yellow Green	(2-8GY) 5.4GY6/8.7	#7F8F18		#7E9F2E	
deep YG 118 Deep Yellow Green	(2-8GY) 7.4GY4.2/7.1	#425E17		#467129	
l.YG 119 Light Yellow Green	(2-8GY) 5GY8.4/5.6	#DCD36A		#C9DC89	
m.YG 120 Moderate Yellow Green	(2-8GY) 4.8GY6/5	#8B8940		#8A9A5B	
p.YG 121 Pale Yellow Green not pale yellowish green	(9Y-2GY,2-8GY) 3.4GY8.7/2.4	#F0D698		#DADF87	
gy.YG 122 Grayish Yellow Green not grayish yellowish green	(9Y-2GY,2-8GY) 4.4GY6/2.3	#90845B		#8F9779	
Olive Green					
s.OLG 123 Strong Olive Green	(2-8GY) 4GY3/11 OUT	#0A4500		#404F00	
deep OLG 124 Deep Olive Green	(2-8GY) 4GY1.5/11 OUT	#142300		#232F00	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

m.OLG 125 Moderate Olive Green	(2-8GY) 5.7GY3.6/4.8	#434B1B		#4A5D23	
d.OLG 126 Dark Olive Green	(2-8GY) 8GY2.2/3.6	#232C16		#2B3D26	
gy.OLG 127 Grayish Olive Green	(2-8GY) 4.6GY3.5/2	#48442D		#515744	
d.gy.OLG 128 Dark Grayish Olive Green	(2-8GY) 5.4GY2/1.8	#27261A		#31362B	
Yellowish Green					
v.yG 129 Vivid Yellowish Green see #115	(8GY-3G) 1.1G5.9/11.2	#379931		#27A64C	
brill.yG 130 Brilliant Yellowish Green	(8GY-3G) 0.3G7.7/8.6	#8CCB5E		#83D37D	
s.yG 131 Strong Yellowish Green	(8GY-3G) 0.4G5.4/8.7	#478430		#44944A	
deep yG 132 Deep Yellowish Green	(8GY-3G) 0.9G3.5/9 OUT	#00541F		#00622D	
v.deep yG 133 Very Deep Yellowish Green	(8GY-3G) 10GY1.5/11 OUT	#002800		#003118	
v.l.yG 134 Very Light Yellowish Green	(8GY-3G) 0.2G8.6/4.6	#C6DF90		#B6E5AF	
l.yG 135 Light Yellowish Green	(8GY-3G) 0.7G7.4/5.2	#007BA7 see #167 #170		#93C592	
m.yG 136 Moderate Yellowish Green	(8GY-3G) 0.5G5.5/4.8	#657F4B		#679267	
d.yG 137 Dark Yellowish Green	(8GY-3G) 0.6G3.5/5	#304B26		#355E3B	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

v.d.yG 138 Very Dark Yellowish Green	(8GY-3G) 0.3G1.8/4.3	#132712		#173620	
Green					
v.G 139 Vivid Green	(3-9G) 3.2G4.9/11.1 OUT	#007D34		#008856	
brill.G 140 Brilliant Green	(3-9G) 6.2G6.5/8.3	#47A76A		#3EB489	
s.G 141 Strong Green	(3-9G) 5.8G4.4/8.7 OUT	#006B3C		#007959	
deep G 142 Deep Green	(3-9G) 5.1G3/8.1 OUT	#004524		#00543D	
v.LG 143 Very Light Green	(3-9G) 6.5G7.8/4.9	#98C793		#8ED1B2	
l.G 144 Light Green	(3-9G) 6G6.4/5.1	#719B6E		#6AAB8E	
m.G 145 Moderate Green	(3-9G) 6.3G4.5/5.1	#386646		#3B7861	
d.G 146 Dark Green	(3-9G) 6.6G2.8/4.6	#203A27		#1B4D3E	
v.d.G 147 Very Dark Green	(3-9G) 8G1.8/3	#16251C		#1C352D	
v.p.G 148 Very Pale Green	(8GY-3G,3-9G) 7.3G8.8/1.9	#D8DEBA		#C7E6D7	
p.G 149 Pale Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 7.6G6.4/1.7	#8D917A		#8DA399	
gy.G 150 Grayish Green	(8GY-3G,3-9G,9G-10BG) 8.8G4.5/1.8	#575E4E		#5E716A	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

d.gy.G 151 Dark Grayish Green not dark greenish yellowish green or dark grayish yellowish green	(8GY-3G,3- 9G,9G-10BG) 1BG2.9/1.8	#313830		#3A4B47	
blackish G 152 Blackish Green	(8GY-3G,3- 9G,9G-10BG) 10G1/1.4	#141613		#1A2421	
gWhite 153 Greenish White	(4GY-8GY,8GY- 3G,3G-9G,9G- 10BG) 10G9.2/0.8	#F5E6CB		#DFEDE8	
l.gGy 154 Light Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY- 3G,3G-9G,9G- 10BG) 3G7.5/0.9	#BAAF96		#B2BEB5	
gGy 155 Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY- 3G,3G-9G,9G- 10BG) 7.5G5.5/1	#7A7666		#7D8984	
d.gGy 156 Dark Greenish Gray	(4GY-8GY,8GY- 3G,3G-9G,9G- 10BG) 1.5BG3.5/0.9	#45433B		#4E5755	
gBlack 157 Greenish Black	(4GY-8GY,8GY- 3G,3G-9G,9G- 10BG) 8.7G1/0.7	#181513		#1E2321	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bluish Green					
v.bG 158 Vivid Bluish Green	(9G-10BG) 5BG5/13 OUT	#00836E		#008882	
brill.bG 159 Brilliant Bluish Green	(9G-10BG) 2.9BG6/9.6 OUT	#009B76		#00A693	
s.bG 160 Strong Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG4.5/8.5 OUT	#006D5B		#007A74	
deep bG 161 Deep Bluish Green	(9G-10BG) 2.8BG2.4/8.3 OUT	#00382B		#00443F	
v.l.bG 162 Very Light Bluish Green	(9G-10BG) 4.4BG8.3/4.6	#A0D6B4		#96DED1	
l.bG 163 Light Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG6.5/4.9	#669E85		#66ADA4	
m.bG 164 Moderate Bluish Green	(9G-10BG) 4.6BG4.5/5	#2F6556		#317873	
d.bG 165 Dark Bluish Green	(9G-10BG) 4.9BG2.7/5 OUT	#013A33		#004B49	
v.d.bG 166 Very Dark Bluish Green	(9G-10BG) 3.6BG1.2/4 OUT	#001D18		#002A29	
Greenish Blue					
v.gB 167 Vivid Greenish Blue	(10BG-9B) 5B5/13 OUT see #170 #176	#007BA7 see #135 #170		#0085A1	
brill.gB 168 Brilliant Greenish Blue	(10BG-9B) 4.6B5.9/7.7	#2A8D9C		#239EBA	
s.gB 169 Strong Greenish Blue	(10BG-9B) 4.9B4.5/8.4 OUT	#00677E		#007791	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

deep gB 170 Deep Greenish Blue	(10BG-9B) 5B5/13 OUT see #167 #176 same as #167; guess 5B2/9	#007BA7 see #135 #167		#2E8495	
v.l.gB 171 Very Light Greenish Blue	(10BG-9B) 4B8/4	#A3C6C0		#9CD1DC	
l.gB 172 Light Greenish Blue	(10BG-9B) 4.5B6.5/5.4	#649A9E		#66AABC	
m.gB 173 Moderate Greenish Blue	(10BG-9B) 4.7B4.5/5.2	#30626B		#367588	
d.gB 174 Dark Greenish Blue	(10BG-9B) 3.7B2.7/5 OUT	#003841		#004958	
v.d.gB 175 Very Dark Greenish Blue	(10BG-9B) 5B1.5/3.6 OUT	#022027		#002E3B	
Blue					
v.B 176 Vivid Blue, ultramarine	(9B-5PB,5-7PB) 5B5/14 OUT see #167 #170	#007CAD		#00A1C2	
brill.B 177 Brilliant Blue, celestial blue	(9B-5PB,5-7PB) 1.6PB5.9/9.4	#4285B4		#4997D0	
s.B 178 Strong Blue, bright blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.9PB4.1/10.4 OUT	#00538A		#0067A5	
deep B 179 Deep Blue, royal blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.8PB2.5/7.9 OUT	#002F55		#00416A	
v.l.B 180 Very Light Blue, baby blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.7PB7.9/6	#A6BDD7		#A1CAF1	
l.B 181 Light Blue, sky blue	(9B-5PB,5-7PB) 1.6PB6.4/6.9	#6C92AF		#70A3CC	







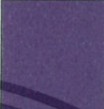






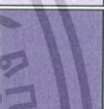



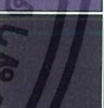


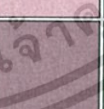
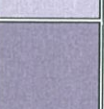
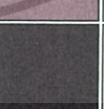


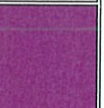
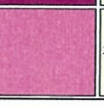
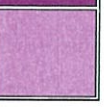
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

m.B 182 Moderate Blue, cerulean blue	(9B-5PB,5-7PB) 3PB4.3/6.8	#395778		#436B95	
d.B 183 Dark Blue, navy blue	(9B-5PB,5-7PB) 2.2PB1.7/5.5 OUT	#002137		#00304E	
v.p.B 184 Very Pale Blue, cloud blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 1.5PB8.3/3.3	#C1CACA		#BCD4E6	
p.B 185 Pale Blue, alice blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.6PB6.5/2.6	#919192		#91A3B0	
gy.B 186 Grayish Blue, slate blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.2PB4.2/3	#4A545C		#536878	
d.gy.B 187 Dark Grayish Blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.2B2.7/2	#2C3337		#36454F	
blackish B 188 Blackish Blue	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.8B1.3/1.5	#161A1E		#202830	
bWhite 189 Bluish White	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.2B9.1/1.2	#F9DFCF		#E9E9ED	
l.bGy 190 Light Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 8.2B7.5/1	#BEADA1		#B4BCC0	
bGy 191 Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 8.9B5.5/0.9	#7D746D		#81878B	


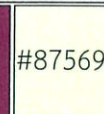











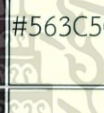

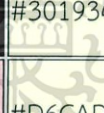



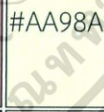
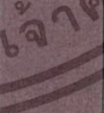
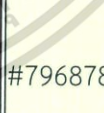
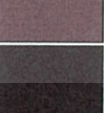
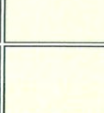

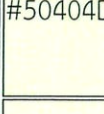
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

d.bGy 192 Dark Bluish Gray	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 0.3PB3.6/1.1	#464544		#51585E	
bBlack 193 Bluish Black	(10BG-9B,9B-5PB,5-9PB) 9.6B1.1/0.8	#151719		#202428	
Purplish Blue					
v.pB 194 Vivid Purplish Blue not very purplish blue	(7-9PB) 7.8PB2/12.5	#20155E		#30267A	
brill.pB 195 Brilliant Purplish Blue	(7-9PB) 7.3PB5.1/9	#62639B		#6C79B8	
s.pB 196 Strong Purplish Blue	(7-9PB) 8PB4/10.9	#474389		#545AA7	
deep pB 197 Deep Purplish Blue	(7-9PB) 7.8PB1.5/8	#1A153F		#272458	
v.l.pB 198 Very Light Purplish Blue	(7-9PB) 7.4PB7.6/5.2	#BAACC7		#B3BCE2	
l.pB 199 Light Purplish Blue	(7-9PB) 7.3PB6/6.5	#837DA2		#8791BF	
m.pB 200 Moderate Purplish Blue	(7-9PB) 7.9PB3.5/6.5	#423C63		#4E5180	
d.pB 201 Dark Purplish Blue	(7-9PB) 8PB1.3/4.3	#1A162A		#252440	
v.p.pB 202 Very Pale Purplish Blue	(5-9PB) 7PB8/3.7	#CBBAC5		#C0C8E1	
p.pB 203 Pale Purplish Blue	(5-9PB) 7PB6/3.9	#8A7F8E		#8C92AC	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



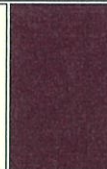
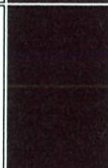
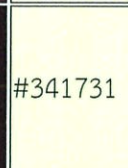
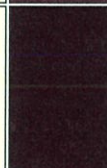




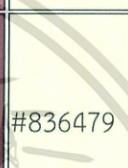













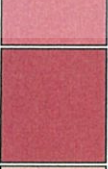
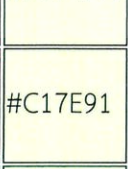







เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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














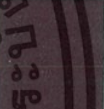

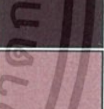




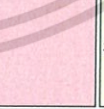


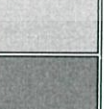
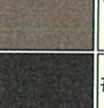
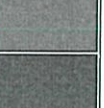
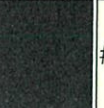

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pWhite 231 Purplish White	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP) 2.5RP9/0.8	#FADBC8		#E8E3E5	
l.pGy 232 Light Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP) 0.3RP7.5/1.1	#C8A99E		#BFB9BD	
pGy 233 Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 1RP5.5/0.9	#88706B		#8B8589	
d.pGy 234 Dark Purplish Gray	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 1RP3.6/1	#564042		#5D555B	
pBlack 235 Purplish Black	(9PB-3P,3-9P,9P-3RP,3-9RP,9RP-1R) 9.54P0.9/0.6 OUT	#1B1116		#242124	
Reddish Purple					
v.rP 236 Vivid Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP3/14 OUT	#7E0059		#870074	
s.rP 237 Strong Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP4.4/10.2	#9A366B		#9E4F88	
deep rP 238 Deep Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP2.8/9.5	#641349		#702963	
v.deep rP 239 Very Deep Reddish Purple	(9P-3RP) 0.9RP1.9/8.9	#470736		#54194E	
l.rP 240 Light Reddish Purple	(9P-3RP) 0.7RP6/6.9	#BB6C8A		#B784A7	
m.rP 241 Moderate Reddish Purple	(9P-3RP) 0.8RP4.5/7	#8C4566		#915C83	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

d.rP 242 Dark Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP2.8/4.8	#4F273A			
v.d.rP 243 Very Dark Reddish Purple	(9P-3RP) 1.5RP1/4.8	#270A1F			
p.rP 244 Pale Reddish Purple	(9P-3RP) 1.3RP6/4.2	#AC7580			
gy.rP 245 Grayish Reddish Purple	(9P-3RP) 1RP4.5/4.2	#7D4D5D			
Purplish Pink					
brill.pPk 246 Brilliant Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 6RP8.5/11 OUT	#FF97BB			
s.pPk 247 Strong Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 5.6RP6.8/9	#F6768E			
deep pPk 248 Deep Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 4.4RP6/12.2	#EB5284			
l.pPk 249 Light Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 4.6RP8/5.5	#FFA8AF			
m.pPk 250 Moderate Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 4.6RP6.8/6.7	#E28090			
d.pPk 251 Dark Purplish Pink	(3-9RP) 6.4RP5.9/7	#C76574			
p.pPk 252 Pale Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 3.7RP8.4/3.3	#FDBDBA			
gy.pPk 253 Grayish Purplish Pink	(9P-3RP,3-9RP) 3.7RP7/3.5	#CC9293			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ สถานที่เก็บตัวอย่างดิน

ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบล บางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร



เอกสารนี้เป็นเอกสารทลวงไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาติเทเนาเปไซประเษณดานการค้ำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์วิจัยป่าชายเลน ตำบลเสม็ด จังหวัดชลบุรี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป่าชายเลน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย



ชื่อ-นามสกุล นางสาว ชรัญญรัตน์ สุขพัฒน์นอุดมโชค (กอล์ฟ)

E-mail charanyarut@gmail.com

ประวัติการศึกษา

2555 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์)

โรงเรียนเบญจมราชรังสฤษฎ์ 2 ฉะเชิงเทรา

2560

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง

กำลังศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร



ชื่อ-นามสกุล นางสาว ณัฐธิชา นามบุญ (เนสท์)

E-mail Nest_natticha@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

2555 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์)

โรงเรียนสวนกุหลาบวิทยาลัย รังสิต ปทุมธานี

2560

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง

กำลังศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร



ชื่อ-นามสกุล นาย สรวิชญ์ บุรพวัฒน์ (วิชญ์)

E-mail witsama.belquezelor@gmail.com

ประวัติการศึกษา

2555 มัธยมศึกษา (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์)

โรงเรียนเบญจมราชรังสฤษฎ์ 2 ฉะเชิงเทรา

2560

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง

กำลังศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางการแพทย์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้