



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษา Phospholipids ของแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่แยกได้  
จากป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี

The role of phospholipids in Actinomycetes bacteria from mangrove forest in  
Chonburi province

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญศุขย์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ

พ.ศ. 2558

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษา Phospholipids ของแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่แยกได้  
จากป่าชายเลนจังหวัดชลบุรี

The role of phospholipids in Actinomycetes bacteria from mangrove forest in  
Chonburi province

ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ

พ.ศ. 2558

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ชื่อโครงการ** การศึกษา Phospholipids ของแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลน  
จังหวัด ชลบุรี

**แหล่งเงิน** ทุนสนับสนุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะ

**ประจำปีงบประมาณ** 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

**ระยะเวลาทำการวิจัย** 1 ปี เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2558

**ชื่อ-สกุล** ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุศย์ สังกัดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี  
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (หัวหน้าโครงการ)

### บทคัดย่อ

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้มากในดิน ทั้งนี้ปัจจุบันยังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการผลิตยาปฏิชีวนะหลายชนิด ซึ่งในการศึกษานี้ได้คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากแหล่งดินศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน ต. คลองตำหรุ อ.เมือง จ.ชลบุรี ได้จำนวน 74 ไอโซเลต และจัดแบ่งตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี หลังจากนั้นทำการศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง อัตราการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท และการศึกษาฟอสโฟลิปิดที่ผนังเซลล์ โดยการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหาร ISP2 เป็นตัวเปรียบเทียบกับอาหาร 3MA ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่ต่างออกไปคือ D-mannitol และอาหาร RASS ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ต่างออกไปคือ arginine โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 230 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าชุดการทดลองที่ 1 เชื้อแอคติโนมัยซีทมีแนวโน้มการเจริญในอาหาร 3MA ได้สูงกว่าอาหาร ISP2 ถึงจำนวน 15 ไอโซเลตจาก 19 ไอโซเลต มีเพียง 3 ไอโซเลตเท่านั้นที่เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถเจริญได้ใน ISP2 สูงกว่า และมี 1 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้เท่ากันทั้งสองอาหาร และชุดการทดลองที่ 2 พบว่าแอคติโนมัยซีทมีแนวโน้มการเจริญในอาหาร ISP2 ได้สูงกว่าอาหาร RASS ถึงจำนวน 12 ไอโซเลต แต่อัตราการเจริญในอาหารสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันไม่มากนัก นอกจากนี้ผลการสกัดฟอสโฟลิปิดที่ผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography พบฟอสโฟลิปิดที่สำคัญ ได้แก่ L- $\alpha$ -Phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt (PG), 3-sn-Phosphatidylethanolamine (PE) และ Cardiolipin sodium salt (CL)

**คำสำคัญ:** แอคติโนมัยซีท, ฟอสโฟลิปิด, ป่าชายเลน, ISP2, 3MA, RAS

**Research Title:** The role of phospholipids in Actinomycetes bacteria from mangrove forest in Chonburi province

**Researcher:** Dr.Khanungkan Klanbut

**Faculty:** Science **Department:** Biology

### **ABSTRACT**

Gram-positive, soil dwelling actinobacteria has been receiving more attention since actinomycetes displays a complex secondary metabolites and clinically useful antibiotics. Seventy four strains were isolated from mangrove forest soil samples of Mangrove Forest Natural Education Centre, Khlongtamrhu, Muang district Chonburi province, Thailand and classified using the morphological and cultural characteristics. This study were examined a culturing optimization, the rate of growth and their phospholipids. The cultivation were grown in ISP2 media (control), 3MA media supplemented with D-Mannitol as a carbon source and RASS media supplemented with arginine as a nitrogen source. The cultural conditions were 230 rpm at 30 °C. 15 of 19 isolates in 3MA more likely grew better than ISP2. There are only three isolates in ISP2 grew higher and one isolates were able to grow in both media similarly. And 12 isolates in ISP2 more likely grew better than RASS. However, the growth of actinomycetes in all of media are hardly no different. Further study was carried out on the involvement of phospholipids in the development of actinomycetes by thin layer chromatography (TLC). A phosphorus-containing lipids identified with an ammonium molybdate spray profile of mid-log phase cultures to aid identification of PG, PE and CL.

**Keywords:** Actinomycetes, Phospholipids, Mangrove forest soil, ISP2, 3MA, RASS

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากทุนสนับสนุนวิจัยด้วยเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2558 ผู้วิจัย  
ขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ดร.กนิงกานต์ กลั่นบุศย์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 หลักการและเหตุผลของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>4</b>
2.1 ป่าชายเลน (mangroves forest)	4
2.1.1 เทคโนโลยีชีวภาพของจุลินทรีย์ป่าชายเลน	9
2.2 แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)	11
2.2.1 ลักษณะโครงสร้างแบบเส้นใย	14
2.2.2 การสร้างผนังกั้นของเส้นใย	15
2.3 ปัจจัยการควบคุมปริมาณแอคติโนมัยซีทในดิน	15
2.3.1 ปริมาณอินทรีย์วัตถุ	15
2.3.2 ความชื้น	17
2.3.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	17
2.3.4 อุณหภูมิ	17
2.4 Cell wall synthesis	17
2.5 Involvement of phospholipids in bacterial growth	18
2.6 Thin layer chromatography (TLC)	19
2.6.1 ค่า Rf	20

2.6.2 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยใช้แผ่น TLC	21
2.6.3 ประโยชน์ของ TLC	21
2.6.4 การระบุชนิดของ Phospholipids (PL) ที่ผ่านการเปรียบเทียบกับ Phospholipids standards โดยวิธีการ TLC	22
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	24
3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดแยกเชื้อ	24
3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานและชีวเคมีของเชื้อ	26
3.3 การหาอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและอัตราการเจริญ	27
3.4 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)	28 46
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล</b>	30
4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท	30
4.2 ลักษณะทางสัณฐานและชีวเคมีบางประการของเชื้อแอกติโนมัยซีท จำนวน 19 ไอโซเลท	32
4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท	32
4.2.2 ชีวเคมีบางประการของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท	43
4.3 ความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท ในอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2), (Control) และอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่แตกต่างกัน เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท	44
4.3.1 การวัดการเจริญด้วยการวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง การวิเคราะห์ การเจริญด้วยอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่ เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ )	44
4.4 การสกัดฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท	55
4.5 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน	58
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	60
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	73
ภาคผนวก ก	74
ภาคผนวก ข	78
ภาคผนวก ค	84
ภาคผนวก ง	85

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
<b>บทที่ 4</b>	
4.1 แสดงเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่แยกได้จากดินป่าชายเลน ต.คลองตำหรุ จ.ชลบุรี จำนวน 74 ไอโซเลต	31
4.2 ลักษณะทางกายภาพ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Starch-Casein Salt Agar (SCA) และ ISP2 และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	33
4.3 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลต	43
4.4 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: $\mu$ ) และค่าระยะเวลาเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลต จากชุดการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2), (standard)	46
4.5 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: $\mu$ ) และค่าระยะเวลาเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลต จากชุดการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Minimal medium plus mannitol (3MA)	47
4.6 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: $\mu$ ) และค่าระยะเวลาเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลต จากชุดการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2), (standard)	51
4.7 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: $\mu$ ) และค่าระยะเวลาเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลต จากชุดการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Reduced arginine-starch-salts (RASS)	52
4.8 ค่าน้ำหนักดินตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีท	58
4.9 ค่าปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีท	58
4.10 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ในดินตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีท	59
<b>ภาคผนวก</b>	
1(ข) ลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่แยกได้	78

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
2(ง) คำน้่านักแห้งของเซลล์จากการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท 120 ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2) ชุดการทดลองที่ 1	85
3(ง) คำน้่านักแห้งของเซลล์จากการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Minimal medium plus mannitol (3MA) ชุดการทดลองที่ 1	86
4(ง) คำน้่านักแห้งของเซลล์จากการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2) ชุดการทดลองที่ 2	87
5(ง) คำน้่านักแห้งของเซลล์จากการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Reduced arginine-starch-salts (RASS) ชุดการทดลองที่ 2	88

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
<b>บทที่ 2</b>	
2.1 ลักษณะโครงสร้างป่าชายเลน	6
2.2 แสดงการหาค่า Rf ของสารหลังจากการแยกสารแล้ว	21
2.3 การวิเคราะห์ TLC ของ phospholipids standard	23
<b>บทที่ 4</b>	
4.1 ภาพถ่ายบริเวณป่าชายเลน ต.คลองตำหรุ อ.เมือง จ.ชลบุรี และการเก็บตัวอย่างดิน	30
4.2 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: $\mu$ ) ของเชื้อแอกคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท ชุดการทดลองที่ 1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2) และอาหารเหลว Minimal medium plus mannitol (3MA)	48
4.3 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ของเชื้อแอกคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท ชุดการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2) และอาหารเหลว Minimal medium plus mannitol (3MA)	49
4.4 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: $\mu$ ) ของเชื้อแอกคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท ชุดการทดลองที่ 2 ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2) และอาหารเหลว Reduced arginine-starch-salts (RASS)	53
4.5 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ ) ของเชื้อแอกคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท ชุดการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International <i>Streptomyces</i> Project (ISP2) และอาหารเหลว Reduced arginine-starch-salts (RASS)	54
4.6 การวิเคราะห์ TLC ของ phospholipids stand และฟอสโฟลิปิดที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของเชื้อแอกคิโนมัยซีท โดยที่ A= CL, B= PE, C= unknown, D= unknown และ E= PG	56
4.7 การวิเคราะห์ TLC ของ phospholipids stand และฟอสโฟลิปิดที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของเชื้อแอกคิโนมัยซีท โดยที่ A= CL, B= PE, C= unknown, D= unknown และ E= PG	57

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 หลักการและเหตุผลของการวิจัย

เป็นที่ทราบกันดีว่าดินบริเวณป่าชายเลนนั้นมีความสมบูรณ์มากอุดมไปด้วยจุลินทรีย์หลากหลายชนิด จังหวัดชลบุรีมีหลายบริเวณที่มีพื้นที่ป่าชายเลนและตั้งอยู่ไม่ห่างจากกรุงเทพมหานครมากนัก จึงเป็นพื้นที่ที่น่าสนใจในการเก็บตัวอย่างดินเป็นอย่างมาก ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท (*Actinomycetes*) เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรมโดยเฉพาะยีส *Streptomyces* ซึ่งมีบทบาทในการผลิตยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) เป็นอย่างสูง แม้ว่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการดำรงชีวิตของ *Streptomyces* มาเป็นจำนวนมากแล้ว แต่การศึกษาเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) ที่ผนังเซลล์ซึ่งคาดว่ามียบทบาทในการส่งโปรตีนไปยังตำแหน่งที่มีการแตกแขนงและเส้นสายใหม่ของ *Streptomyces* คือไปยังตำแหน่งปลายของเส้นสาย (hyphal tips) และห้องกั้นระหว่างเซลล์ (cross walls) ระหว่างการสร้างผนังกั้นเซลล์เมื่อมีการสร้างสปอร์ซึ่งมีการทำงานร่วมกับเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ด้วยนั้นยังมีการศึกษาน้อยมาก โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาฟอสโฟลิปิดที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทนี้เนื่องจากเพื่อช่วยส่งเสริมการผลิตปริมาณเซลล์ (Cell Biomass) นั้นเอง

### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาถึงการเก็บตัวอย่างดินบริเวณป่าชายเลนในพื้นที่จังหวัดชลบุรีและทำการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท (*Actinomycetes*) โดยมุ่งเน้นไปยังยีส *Streptomyces* รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการดำรงชีวิตของ *Streptomyces* โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ในการจัดจำแนกความแตกต่างของการสร้างฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณป่าชายเลนในพื้นที่จังหวัดชลบุรี และนำตัวอย่างดินที่เก็บได้แต่ละตัวอย่าง (samples) มาทำการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท (Actinomycetes) และทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลท (Isolate numbers) ของแต่ละตัวอย่างแบคทีเรียที่แยกได้และคัดเลือกเฉพาะหมายเลขไอโซเลทที่ให้ค่าการเจริญเติบโตสูงสุด หลังจากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียให้มีการเจริญเติบโตสูงสุดในอาหารที่หาแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนทดแทนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2), Minimal medium plus mannitol (3MA) และ Reduced arginine-starch-salts (RASS) และทำการสกัดฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) โดยวิธีของ Bligh&Dyer (1959) และ Iverson *et al.*, 2001 หลังจากนั้นใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ในการจัดจำแนกความแตกต่างของการสร้างฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท

### 1.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ทำการเก็บตัวอย่างดินจากศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จำนวน 10 จุด
2. ทำการหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดินจากบริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ได้แก่ การหาน้ำหนักดิน การหาปริมาณความชื้น และการวัดค่าความเป็นกรดเบส
3. ทำการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทบนอาหาร Starch - Casein agar และทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Soya Bean Flour - Mannitol agar (SFM agar) จากนั้นทำการเก็บรักษาเชื้อไว้บนอาหารวุ้นเยือก Hickey Tresner agar และ spore suspension ทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลทของเชื้อ
4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญของเชื้อ ลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ เพื่อทำการจัดกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยซีทจากไอโซเลทของเชื้อทั้งหมด
5. การหาอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและอัตราการเจริญ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดเลือกมา 19 ไอโซเลทในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) และอาหารที่หาแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนทดแทนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง โดยการทำให้ Spore pre-germination และนำมา Inoculation ลงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2), Minimal medium plus mannitol (3MA) และ Reduced arginine-starch-salts (RASS) เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหาร

6. สกัดฟอสโฟลิปิดชนิดต่างๆ ในผนังเซลล์ โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC) ในการตรวจวิเคราะห์

7. จัดทำรูปเล่มรายงาน

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากแหล่งดินศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน  
ต. คลองตำหรุ อ.เมือง จ.ชลบุรี
2. เพื่อทราบถึงลักษณะทางสัณฐานและชีวเคมีบางประการของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ
3. เพื่อทราบถึงอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและอัตราการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากไอโซเลทต่างๆ
4. สามารถสกัดฟอสโฟลิปิดจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

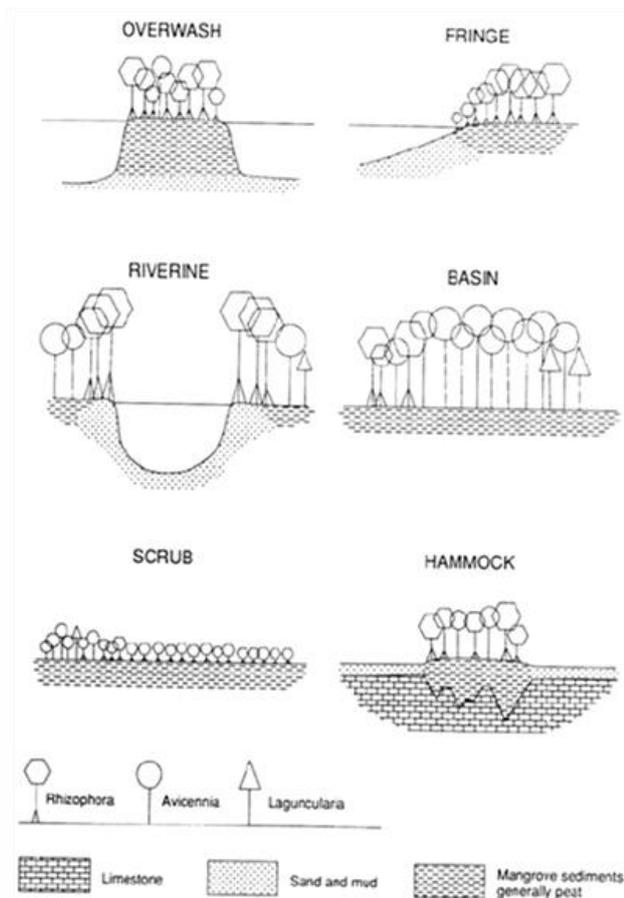
#### 2.1 ป่าชายเลน (mangroves forest)

ป่าชายเลนเป็นเอกลักษณ์ของระบบนิเวศระหว่างน้ำขึ้นน้ำลงในภูมิภาคเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนของโลกที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตและโลก (Kraynak & Tetrault, 2003) เกือบ 60-70% ของโลกที่ชายฝั่งเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนถูกปกคลุมไปด้วยป่าโกงกางซึ่งเป็นที่รู้จักกันเป็นระบบนิเวศที่มีประสิทธิภาพสูง มีค่าทางนิเวศวิทยาอันยิ่งใหญ่ (Thatoi & Biswal, 2008) เป็นระบบนิเวศที่ประกอบไปด้วยพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ หลากหลายชนิดที่ดำรงชีวิตร่วมกันในสภาพแวดล้อมที่เป็นดินเลน น้ำกร่อย และมีน้ำทะเลท่วมถึงอย่างสม่ำเสมอ (Yanez-Arancibia *et al.*, 1998) ดังนั้นจึงพบป่าชายเลนปรากฏอยู่ทั่วไปตามบริเวณที่เป็นชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ ทะเลสาบ และรอบเกาะแก่งต่างๆ ในพื้นที่ชายฝั่งทะเล บริเวณป่าชายเลนจะมีไม้โกงกางเป็นพันธุ์ไม้ที่มีจำนวนมากและมีบทบาทสำคัญที่สุดในป่าชายเลน ดังนั้นป่าชายเลนจึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ป่าโกงกาง ในระบบนิเวศป่าชายเลนประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิตมากมาย สิ่งไม่มีชีวิตยกตัวอย่างเช่น พืชสาหร่าย เห็ดรา แบคทีเรีย น้ำ ซากพืช ซากสัตว์ รวมไปถึงสภาพภูมิอากาศ เช่น อุณหภูมิ แสงแดด ฝน ความชื้น เป็นต้น และสิ่งมีชีวิตประกอบด้วย ผู้ผลิต ผู้บริโภค และผู้ย่อยสลาย โดยผู้ผลิตที่กล่าวถึงในที่นี้หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงเองได้ ซึ่งได้แก่ พืชพันธุ์ไม้ต่างๆ ในป่าชายเลน รวมไปถึง ไดอะตอม แพลงก์ตอนพืช และสาหร่าย ส่วนผู้บริโภคคือสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้จึงต้องพึ่งพาอาศัยพวกอื่น ได้แก่ สัตว์หน้าดินขนาดเล็ก เช่น แพลงก์ตอนสัตว์ ปู ไส้เดือนทะเล และสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ เช่น ปลา กุ้ง ปู รวมไปถึง นก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งบางชนิดเป็นพวกกินอินทรีย์สาร บางชนิดเป็นพวกกินพืช บางชนิดเป็นพวกกินสัตว์และบางชนิดเป็นพวกที่กินทั้งพืชและสัตว์ (Ewel *et al.*, 1998) สิ่งมีชีวิตที่สำคัญที่เป็นส่วนประกอบของระบบนิเวศป่าชายเลนอีกอย่างคือ ผู้ย่อยสลาย ซึ่งหมายถึงจุลินทรีย์ทั้งหลายที่ช่วยทำหน้าที่ในการทำลายหรือย่อยสลายซากพืชและซากสัตว์ให้เน่าเปื่อย ผุพัง จนในที่สุดก็จะกลายเป็นธาตุอาหารและปุ๋ย และสะสมเป็นจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ กลายเป็นแหล่งอาหารในดินเพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้ผลิตต่อไป ซึ่งได้แก่ รา แบคทีเรีย ในป่าชายเลนผู้ย่อยสลายยังรวมถึง ปูและหอยบางชนิดด้วย (Odum & McIlvor, 1990)

สิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตในป่าชายเลนเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์ระหว่างกันอย่างซับซ้อนในระบบนิเวศป่าชายเลน ทั้งในแง่การหมุนเวียนของธาตุอาหารและการถ่ายทอดพลังงาน แต่สามารถอธิบายโดยง่ายได้ว่า เมื่อผู้ผลิตคือพันธุ์พืชเจริญเติบโตจากสังเคราะห์แสงส่วนต่างๆ ของต้นไม้ ใบไม้ กิ่งไม้และเศษไม้ จะร่วงหล่นลงไปใต้น้ำและดินเกิดการทับถมกันและถูกย่อยสลายโดยผู้ย่อยสลาย กลายเป็นอินทรีย์วัตถุอยู่ในดินบริเวณนั้น และในที่สุดก็จะกลายเป็นแร่ธาตุและอาหารของผู้บริโภคพวกที่กินอินทรีย์สาร ซึ่งพวกที่กินอินทรีย์สารเหล่านี้จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วแล้วกลายเป็นแหล่งโปรตีนที่เป็นแหล่งอาหารอันอุดมสมบูรณ์ให้แก่สัตว์น้ำเล็กๆ และสัตว์เล็กๆ เหล่านี้จะเจริญเติบโตขึ้นกลายเป็นอาหารของพวกกุ้ง ปู และปลา ขนาดใหญ่ขึ้นไปเรื่อยๆ ตามลำดับ หรือบางส่วนก็จะตายและผุพังสลายตัวเป็นธาตุอาหารสะสมอยู่ในป่านั่นเอง ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้จะถูกปรับให้เป็นอย่างดีอย่างสมดุลภายในระบบ ถ้าไม่ถูกรบกวนจากปัจจัยภายนอก

เนื่องจากในป่าชายเลนมีการขึ้นลงของน้ำทะเลสม่ำเสมอ ดังนั้นดินในป่าชายเลนจึงมีน้ำท่วมขังอยู่เป็นประจำ (Alongi *et al.*, 1993) ทำให้ออกซิเจนในอากาศไม่สามารถแพร่กระจายลงสู่ดินได้ (Kathiresan, 2003) รูปแบบลักษณะโครงสร้างของป่าชายเลนแบ่งได้อย่างกว้าง 6 รูปแบบได้แก่

1. Overwash forests คือป่าชายเลนที่ขึ้นบนที่ราบน้ำทะเลท่วมถึง ได้รับอิทธิพลจากกระแสน้ำขึ้นลงอย่างสม่ำเสมอและเมื่อน้ำท่วมจะมีลักษณะคล้ายเกาะ
2. Riverine forests คือป่าชายเลนที่ขึ้นบนร่องน้ำ หรือทางน้ำจืดที่ไหลลงสู่ทะเล
3. Fringe forests คือป่าชายเลนที่มีความลาดชันน้อยอยู่บนชายฝั่ง พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งของแผ่นดินใหญ่และเกาะใหญ่ๆ มักพบป่าชายเลนประเภทนี้อยู่บริเวณที่เป็นอ่าวเปิด และได้รับอิทธิพลจากคลื่นลมที่ไม่แรงมาก
4. Basin forests คือป่าชายเลนที่เป็นพื้นที่ที่มีน้ำท่วมขังอยู่ และเป็นพื้นที่ต่ำ มักพบขึ้นอยู่บนฝั่งที่ติดปาก สัมผัสกับน้ำจืดจากบนบกและน้ำกร่อยนานกว่าป่าชายเลนที่อยู่ตามชายฝั่ง
5. Scrub/Dwarf forests คือป่าชายเลนที่ขึ้นบนบริเวณที่มีปัจจัยจำกัดการเจริญเติบโต ซึ่งทั่วไปจะเป็นไม้พุ่มเตี้ยๆ ประมาณ 2 เมตร มักพบในบริเวณที่แห้งแล้งกว่าบริเวณอื่น
6. Hammock forests คือป่าชายเลนที่มีลักษณะคล้าย Basin forests แต่ระดับความสูงของพื้นที่ป่าประเภทนี้จะมากกว่าป่าชายเลนประเภทอื่นๆ (Kathiresan, 2003)



รูปที่ 2.1 ลักษณะ โครงสร้างป่าชายเลน

ที่มา: <http://marinegiscenter.dmcr.go.th/km/wp-content/uploads/2013/08/man-g-6.png>

ป่าชายเลน โดยทั่วไปแล้วจะพบตามชายฝั่งหรือปากแม่น้ำ ดินในบริเวณป่าชายเลนจึงเกิดจากการสะสมกันของตะกอนที่พัดเข้าสู่ชายฝั่งหรือปากแม่น้ำ และ/หรือเกิดจากการกัดเซาะชายฝั่งแม่น้ำหรือการพังทลายของดินจากที่สูงและไหลมาตามแม่น้ำ ลำธาร และถูกพัดพามาตกตะกอนรวมกันกับตะกอนที่พัดจากบริเวณปากแม่น้ำหรือชายฝั่ง โดยลักษณะของตะกอนที่มาทับถมกันจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดของตะกอน อาจจะเป็นตะกอนละเอียดซึ่งเกิดจากดินโคลนบริเวณปากแม่น้ำ หรืออาจจะเป็นตะกอนทราย ซึ่งเมื่อเกิดเป็นดินบริเวณป่าชายเลน แล้วก็จะส่งผลทำให้พืชพันธุ์บริเวณป่าชายเลนมีจำนวนชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันด้วย (Carlton, 1974; Augustinus, 1995)

ป่าชายเลนมีประโยชน์ทั้งทางด้านนิเวศวิทยา การดำรงชีวิตของมนุษย์ และยังเป็นองค์ประกอบที่สำคัญยิ่งของชายฝั่งทะเล สามารถวิเคราะห์ประโยชน์ในด้านต่างๆ ของป่าชายเลนได้ดังนี้

1. ป่าชายเลนเป็นทั้งแหล่งอาหาร แหล่งอนุบาลและที่อยู่อาศัยของสัตว์ต่างๆ รวมถึงมนุษย์ (Yanez-Arancibia *et al.*, 1988) ในป่าชายเลนพบสัตว์ทะเลหน้าดินที่อาศัยอยู่ถึง 7 ไฟลัม ได้แก่ ดอกไม้ทะเล ใส้เดือนตัวกลมทะเล หนอนตัวแบน ใส้เดือนทะเล หนอนถั่ว เอกไคยูรา (Echiura) แมงดาทะเล โคพีพอด (Copepod) แอมฟิพอด (Amphipod) ทาไนดาเซีย (Tanaidacean) กุ้งชนิดต่างๆ รวมถึงปูและหอย ป่าชายเลนนอกจากจะเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ ที่อยู่อาศัย หลบภัย และหาอาหารของสัตว์น้ำแล้ว ยังรวมไปถึงนกประจำถิ่นและนกอพยพ โดยนกประจำถิ่นทั้งอาศัยหากินและสร้างรังในป่าชายเลน เช่น นกยางเปีย นกคาน้ำเล็ก เขียวแดง และนกอพยพที่ใช้เส้นทางบินเดิมประจำทุกปี คือ กลุ่มนกชายเลนและนกทะเลที่อพยพมาพักนอนและหาอาหารเพื่อสะสมพลังงานในป่าชายเลน เนื่องจากป่าชายเลนมีความเหมาะสมทั้งเรื่องอาหาร และที่หลบภัย เช่น ลมฝน นกในกลุ่มนี้เช่น นกใหญ่ นกชายเลนปากช้อนและนกนางนวลธรรมดา รวมถึงสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ค้างคาว ลิงลม ลิงแสม หนูบ้าน นาก เสือปลา แมวป่า หมูป่า และเก้ง นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน เช่น งู ตะกวด และจระเข้ เป็นต้น นอกจากนี้สัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจหลายชนิดได้ใช้ป่าชายเลนเป็นที่อยู่อาศัย และอนุบาลตัวอ่อนในบางช่วงของวงจรชีวิต เช่น ปลากระพงขาว ปลากระบอก ปลาเก๋า กุ้ง หอยดำ หอยนางรม หอยแมลงภู่ หอยแครง และหอยกะพง ปูแสม ปูม้า แต่สัตว์น้ำบางชนิดอาจใช้ป่าชายเลนเป็นทั้งแหล่งเกิดและอาศัยจนเติบโตสืบพันธุ์ เช่น ปูทะเล (Ewel *et al.*, 1998)

2. พืชในป่าชายเลนสามารถนำมาใช้เป็นผักพื้นบ้านจำนวน หลายชนิด เช่น ใบชะคราม ยอดผักเบี้ยทะเล ต้นจากก็เป็นพืชป่าชายเลนอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำส่วนต่างๆ มาใช้ ประโยชน์ได้ คือ ใบนำมาทำเป็นดับมุงหลังคา ใบอ่อนสามารถนำมาผัดหรือต้มน้ำดื่มได้ ผลใช้กินเป็นของหวาน เป็นต้น พืชในป่าชายเลนหลายชนิดนำมาใช้เป็นสมุนไพรได้ เช่น เหงือกปลาหมอ มะนาวผี ใช้รักษาโรคผิวหนัง ผลของตะบูนขาวใช้รักษาโรคบิดและ โรคท้องร่วงได้ รากตาคุ่มทะเลใช้แก้ไอเสบ แก้ไข้ แก้คัน เป็นต้น (Bandaranayake, 1998)

3. ป่าชายเลนช่วยรักษาความสมดุลของระบบนิเวศชายฝั่งและใกล้เคียง โดยเฉพาะหญ้าทะเลและปะการัง ป่าชายเลนมีบทบาทในการรักษาสมดุลของธาตุอาหารและความอุดมสมบูรณ์ของน้ำทะเลชายฝั่งซึ่งจะส่งผลถึงความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรประมง

4. เศษซากพืชหรือเศษไม้ใบไม้และส่วนต่างๆ ของไม้ป่าชายเลนที่ร่วงหล่นลงมา จะถูกย่อยสลายกลายเป็นทรัพยากร กระบวนการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุเหล่านี้จะทำให้เกิดสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำ เช่น กรดอะมิโน ซึ่งสาหร่ายและจุลินทรีย์ต่างๆ จะสามารถใช้เป็นอาหารได้ และจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในป่าชายเลนต่อไป

5. รากของต้นไม้ในป่าชายเลน นอกจากจะช่วยป้องกันการกัดเซาะชายฝั่งแล้ว ยังช่วยบรรเทาความเร็วจากกระแสน้ำลง ทำให้ตะกอนที่แขวนลอยมากับน้ำทับถมเกิดเป็นแผ่นดินงอกใหม่ เมื่อระยะเวลาผ่านไป ก็จะขยายออกไปในทะเลเกิดเป็นหาดเลน อันเหมาะสมแก่การเกิดของพันธุ์ไม้ป่าชายเลนต่อไป อีกทั้งยังช่วยฟอกน้ำและอากาศให้บริสุทธิ์ (สนิท อักษรแก้ว, 2542)

6. ป่าชายเลนทำหน้าที่ช่วยบรรเทาความรุนแรงของคลื่นและลมให้ลดน้อยลง เมื่อเทียบกับบริเวณที่ไม่มีป่าชายเลน

7. รากของต้นไม้ในป่าชายเลนที่งอกออกมาเหนือพื้นดิน จะทำหน้าที่คล้ายตะแกรงธรรมชาติคอยดักกรองสิ่งปลูกต่าง ๆ และสารมลพิษต่างๆ จากบนบกไม่ให้ลงสู่ทะเล โลหะหนักหลายชนิด เมื่อถูกพัดพามาตามกระแสน้ำ ก็จะตกตะกอนลงที่บริเวณดินเลนในป่าชายเลน นอกจากนั้นขยะ และคราบน้ำมันต่างๆ ก็จะถูกดักกรองไว้ในป่าชายเลนเช่นกัน (Calton, 1974; Augustinus, 1995)

8. ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่มีลักษณะพิเศษหลายอย่าง ทำให้ป่าชายเลนเป็นแหล่งพักผ่อนหย่อนใจ และแหล่งศึกษาหาความรู้ที่สำคัญยิ่ง เพราะเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยพรรณไม้นานาชนิดที่มี ใบ ดอก และผลสวยงามแปลกตา อีกทั้งยังเป็นแหล่งที่มีทั้งสัตว์น้ำและสัตว์บก โดยเฉพาะนกชนิดต่างๆ อาศัยอยู่มากมาย

9. ป่าชายเลนเป็นแหล่งกักเก็บคาร์บอน โดยช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ เนื่องจากไม้ในป่าชายเลนมีอัตราการสังเคราะห์แสงสูงจึงช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเพิ่มปริมาณออกซิเจน

10. แหล่งพลังงานที่สำคัญจากป่าชายเลน ได้แก่ ถ่านไม้ ไม้ป่าชายเลนที่นิยมนำมาเผาถ่านคือ ไม้โกงกาง เพราะติดไฟทนทาน ไม่มีควัน ไม่ปะทุแตกไฟ ได้ก่อนถ่านสวยงาม ขายได้ราคาดี

11. ไม้ป่าชายเลน ยังมีประโยชน์ใช้สอยและก่อสร้าง เช่น ไม้เสาเข็ม ไม้ค้ำยัน ไม้ก่อสร้างแปะลา อุปกรณ์การประมง เฟอร์นิเจอร์ ไม้หลายชนิดนำมาสกัดจะได้แทนนินเพื่อใช้ทำน้ำหมึก ทำสี ทำกาวย้อมอวน ฟอกหนัง เป็นต้น (Bandaranayake, 1998)

ความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศป่าชายเลนนั้นสามารถกำหนดชนิดและระดับระบบนิเวศ และความแปรผันตรงกับพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ ระบบนิเวศป่าชายเลนมีสภาพแวดล้อมที่ไม่ซ้ำกัน ความหลากหลายของระบบนิเวศนี้จึงทำให้มีความหลากหลายของ

เชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนของวงจรรสอาหารเช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและกำมะถัน ดังนั้นจึงมีการควบคุมสภาพแวดล้อมทางเคมีของระบบนิเวศป่าชายเลน (Alongi *et al.*, 1993) จุลินทรีย์ที่พบ เช่น แบคทีเรีย, เชื้อรา, ไซยาโนแบคทีเรีย, สาหร่ายและเชื้อราที่เหมือน โปรโตซัว กลุ่มแบคทีเรียทั่วไปในระบบนิเวศนี้ของการป่าชายเลน เป็นกลุ่มที่มีการรีดิวซ์ซัลเฟต (*Desulfovibrio* sp., *Desulfotomaculum* sp., *Desulfosarcina* sp., *Desulfococcus* sp. ฯลฯ) กลุ่มที่มีการตรึงไนโตรเจน (*Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Clostridium* sp., *Klebsiella* sp. ฯลฯ) กลุ่มที่สามารถละลายฟอสเฟต (*Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Xanthobacter* sp., *Vibrio proteolyticus*, *Enterobacter* sp., *Kluyvera* sp., *Chryseomonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. ฯลฯ) กลุ่มที่สังเคราะห์ anoxygenic (*Chloronema* sp., *Chromatium* sp., *Beggiatoa* sp., *Thiopedia* sp., *Leucothiobacteria* sp. ฯลฯ) และกลุ่มที่สังเคราะห์มีเทน (methanogenic) (*Methanococcus* sp., *Methylobacter* sp. ฯลฯ) นอกจากนี้แบคทีเรีย ก็ยังพบสาหร่าย เช่น กลุ่ม *Chlorophyta*, *Chrysophyta*, *Phaeophyta*, *Rhodophyta* และ *Cyanophyta* (Sen & Naskar, 2003) และกลุ่มต่างๆ ของเชื้อราเช่น ligninolytic, cellulolytic, pectinolytic, amylolytic และ proteolytic fungi เช่นเดียวกับแอกคิโนไมซีทที่มีอยู่ในระบบนิเวศป่าชายเลน (Kathiresa & Bingham, 2001)

### 2.1.1 เทคโนโลยีชีวภาพของจุลินทรีย์ป่าชายเลน

ป่าชายเลนที่เกิดขึ้นในระบบนิเวศทั้งทางบกและทางทะเลจึงเป็นตัวแทนของความหลากหลายทางชีวภาพที่อุดมไปด้วยพืชสัตว์และจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสภาพแวดล้อมป่าชายเลนที่ไม่เพียงแต่มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการสร้างและรักษาบรรยากาศ แต่ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์เทคโนโลยีชีวภาพที่มีคุณค่าและมีความสำคัญ (Alongi *et al.*, 1993) ความหลากหลายของจุลินทรีย์ถือเป็นกุญแจสำคัญในการอยู่รอดและคุณภาพชีวิตทางเศรษฐกิจของมนุษย์และเป็นแหล่งทรัพยากรขนาดใหญ่ที่เราสามารถใช้เพื่อประโยชน์ได้ จุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณป่าชายเลนได้พิสูจน์แล้วว่าเป็นแหล่งสำคัญของการผลิตอาหาร ยา เอนไซม์และสารต้านจุลชีพ (Lin *et al.*, 2001; Maria *et al.*, 2005) ทั้งแบคทีเรียทนเค็ม แบคทีเรียชอบเกลือและจุลินทรีย์อื่น ๆ

จากระบบนิเวศป่าชายเลนมีบทบาทสำคัญในภาคอุตสาหกรรมในแง่ของเอนไซม์ (Sabu, 2003) ที่มีความหลากหลาย สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดและที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิว (biosurfactants) (Yakimov *et al.*, 1999) พลาสติกชีวภาพ (Steinbüchel & Fuchtenbusch, 1998) สารชีวภาพธรรมชาติและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่สำคัญในเชิงพาณิชย์และทาง

การแพทย์ โดยเฉพาะแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลนนับเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารทุติยภูมิที่สามารถป้องกันการติดเชื้อและเป็นสารป้องกันมะเร็ง และยังพบสารสำหรับการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทและโรคเบาหวาน (Hong *et al.*, 2009) นอกจากนี้ที่กล่าวมาข้างต้น จุลินทรีย์บริเวณป่าชายเลนนั้นมีการนำมาใช้งานอย่างกว้างขวางในภาคอุตสาหกรรมการเกษตรเช่นเดียวกับการผลิตสารทุติยภูมิต่างๆ ในภาคอุตสาหกรรมเช่นกัน

แอกติโนมัยซีทได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพและเป็นแหล่งที่มีสารทุติยภูมิมาก ระบบนิเวศป่าชายเลนเป็นแหล่งที่ยังไม่มีการสำรวจของแอกติโนมัยซีทที่มีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่ใช้งานทางชีวภาพมากนัก (Hong *et al.*, 2009) รายงานจากหลายสถานที่ทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันทั่วโลกได้อธิบายการเกิดขึ้นของแอกติโนมัยซีทที่อยู่อาศัยที่ของป่าชายเลนที่แตกต่างกัน Eccleston *et al.* (2008) รายงานการเกิดขึ้นของแอกติโนมัยซีทอยู่ในจีโนม *Micromonospora* จากชายฝั่งซันไฮน์ในออสเตรเลีย rifamycin ที่สร้างโดย *Micromonospora* จากป่าชายเลนของทะเลจีนใต้รายงานโดย Huang *et al.* (2008) และ Xie *et al.* (2006)

แอกติโนมัยซีทหลายกลุ่ม เช่น *Actinomadura*, *Microbispora*, *Nonomuraea*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Arthrobacter*, *Isoptericola*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* และ *Streptomyces* ได้รับรายงานจากดินป่าชายเลนและพืชป่าในประเทศจีน รายงานโดย Hong *et al.* (2009)

ในทำนองเดียวกันเช่นเดียวกับจำพวก *Brevibacterium*, *Dermabacter*, *Kocuria*, *Kytococcus*, *Microbacterium*, *Nesterenkonia* และ *Rothia* จากดินป่าชายเลนในบราซิล รายงานโดย Dias *et al.* (2009) ในอินเดีย Sivakumar (2001) รายงานว่า 23 ชนิดของแอกติโนมัยซีทจากป่าชายเลน Pichavaram ส่วนใหญ่ระบุสายพันธุ์ที่อยู่ในสกุล *Streptomyces*

Laksmanaperumalsamy *et al.* (1978) แยก *Streptomyces* ได้ 518 สายพันธุ์จากสภาพแวดล้อมป่าชายเลนปอร์โตโนโว เช่น *S. albidoflavus*, *S. atroolivaceus*, *S. auranticus*, *S. canus*, *S. chromofuscus*, *S. exfoliates*, *S. griseoluteus*, *S. helstedii*, *S. lavenduale*, *S. longisporoflavus*, *S. luridus*, *S. lydicus*, *S. nogalator*, *S. pactum*, *S. prasinosporus*, *S. purpureus*, *S. tubercidus*, *S. versoviensis*, *S. viridochromogenes*

Phosphate solubilizing actinomycetes เช่น *Streptomyces galbus* ใน Vellar ปากน้ำของสภาพแวดล้อมน้ำเค็ม Parangipettai ทางทิศใต้ฝั่งตะวันออกของอินเดียได้รับรายงานโดย Sahu *et al.* (2007) Phosphate solubilizing *Streptomyces* spp. จากระบบนิเวศป่าชายเลน Bhitarkanika อินเดียได้รับรายงาน โดย Gupta *et al.* (2010)

การแพร่กระจายของแอกติโนมัยซีทในป่าชายเลน Sundarbans รัฐเบงกอลตะวันตกอินเดียได้รับรายงานโดย Mitra *et al.* (2008) ซึ่งการกระจายค่อนข้างมาก สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทในระบบนิเวศป่าชายเลนทั่วโลกแสดงให้เห็นว่า ป่าโกงกางเป็นตัวแทนของชุมชนสมบัติของแอกติโนมัยซีท

นอกจากนี้แบคทีเรีย สาหร่ายและแอกติโนมัยซีทมีการรายงานว่ามีส่วนร่วมในการย่อยสลายและการรีไซเคิลของสารอินทรีย์ การผลิตเอนไซม์ต่างๆเช่น cellulolytic, proteolytic, amylolytic, lipolytic, chitinolytic, phosphate solubilizing activities ได้รับรายงานจาก marine actinomycetes (Sivakumar *et al.*, 2007) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์จึงเพิ่มผลผลิตของสภาพแวดล้อมทางทะเล พร้อมกับเอนไซม์ phosphatase แอกติโนมัยซีทมีบทบาทสำคัญในการละลายฟอสเฟตในระบบนิเวศน้ำเค็มและเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ จึงเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตที่เพิ่มขึ้น (Sahu *et al.*, 2007) แอกติโนมัยซีทยังมีบทบาทสำคัญโดยการจัดหาอาหารสำหรับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดยการผลิตสารทุติยภูมิที่ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของสัตว์จำพวกปลาและกุ้งในระบบนิเวศ (Sivakumar *et al.*, 2007)

## 2.2 แอกติโนมัยซีท (Actinomycetes)

แอกติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกวานีนและเบสไซโตซีน (G+C) สูงกว่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่อยู่ในดิน สามารถพบได้ทั่วไปในดินซึ่งมีอยู่ถึงร้อยละ 10-50 ของจุลินทรีย์ทั้งหมด (Goodfellow & Simpson, 1987) โดยชื่อ “actinomycete” มาจากภาษากรีกระหว่าง akktis แปลว่ารังสีบีม (ray beam) และ mykes แปลว่ารา (fungus) แอกติโนมัยซีทจัดอยู่ในอันดับ Actinomycetales

อาณาจักร	<i>Bacteria</i>	
ไฟลัม	<i>Actinobacteria</i>	
อันดับ	<i>Actinomycetales</i>	
วงศ์	<i>Actinobacteridae</i>	(วิวัฒน์ และ เอกภพ, 2549)

จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย (Buchanan & Gibbons, 1974) ส่วนใหญ่สามารถสร้างเส้นใย (hyphae) ซึ่งเป็นสายยาวคล้ายเชือก สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) หรืออาจพบเฉพาะเส้นใยใต้ผิวอาหาร แอคติโนมัยซีทมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างรากกับแบคทีเรีย คือมีการสร้างเส้นใยคล้ายราแต่มีขนาดและรูปร่างคล้ายแบคทีเรีย ผนังเซลล์ประกอบด้วย mucopeptide (N-acetyl glucosamine เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid); L-2,6-diaminopimelic acid; glutamic acid; glycine และ alanine (Davis, 1959; Waksman & Henrici, 1974) ในแอคติโนมัยซีทแต่ละกลุ่มยังมีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันออกไปอีก เช่น รูปแบบของน้ำตาล ซึ่งใช้เป็นหลักในการจำแนกจีสของเชื้อแอคติโนมัยซีท (Yamaguchi, 1965; Buchanan & Gibbons, 1974; Davis, 1959) โดยแอคติโนมัยซีทแตกต่างจากเชื้อรา คือไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและไม่มีไมโทคอนเดรีย (Cross & Goodfellow, 1973:76) และแอคติโนมัยซีทแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป คือมีปริมาณของเบสกวีนีนกับ ไซโตซีน (G+C) ประมาณ 55-78 mol% โคลีนของแอคติโนมัยซีทจะมีความหลากหลายของรูปร่างลักษณะเป็นอย่างมาก โดยมีลักษณะที่แตกต่างจากโคลีนของแบคทีเรียอื่นๆ คือมีลักษณะทึบแสง เส้นใยเหนือผิวอาหารแห้งมีลักษณะเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่าและสามารถสังเกตได้ชัดเจน หรือผิวโคลีนอาจเรียกคล้ายหนังสัตว์หรือเป็นรอยย่นเป็นเส้นใยสั้นๆ มองด้วยตาเปล่าจะมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สามารถสร้างรงควัตถุสีต่างๆ ทำให้แอคติโนมัยซีทมีสีที่หลากหลาย เช่น สีเทา ขาว เหลือง เขียว แดง ชมพู ส้ม น้ำตาล ดำ และสีม่วง เป็นต้น (Williams *et al.*, 1989) และที่สำคัญคือเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทหลายชนิดมีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส โปรโตซัว รวมทั้งสารที่สามารถต้านเซลล์มะเร็งหรือเซลล์เนื้องอก (Williams *et al.*, 1989) และยังสามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดออกมานอกเซลล์ เพื่อช่วยในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุและสารอาหารในสิ่งแวดล้อม เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่อยู่ตลอดเวลา (Berdy, 2005) โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทก็ได้รับอาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ นอกจากนี้แอคติโนมัยซีทบางชนิดยังเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคในมนุษย์ สัตว์และพืช (Williams *et al.*, 1989) โดยทั่วไปแอคติโนมัยซีทจะอาศัยในดินแต่ก็ยังพบว่ามีการแพร่กระจายในน้ำ อากาศ อาหาร และพืช แหล่งที่พบมากได้แก่บริเวณที่มีการสะสมของสารอินทรีย์ เช่น ดินที่เพาะปลูก ปุ๋ยหมัก วัตถุเน่าเปื่อย โคนตม ตะกอนใต้แม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน ดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) และป่าชายเลน เป็นต้น (Alexander, 1991; Hayakawa *et al.*, 1988)

ปริมาณแอคติโนมัยซีทในดินขึ้นอยู่กับชนิดและคุณสมบัติทางกายภาพ ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน (Alexander, 1991; Kim, 1992; Sylvia *et al.*, 1998) เชื้อสามารถ

เจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5-8.0 จึงพบว่าในดินที่แห้งและมีสภาพเป็นด่าง จะพบเชื้อแอคติโนมัยซีทในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง ซึ่งพบสูงถึง 95% ของจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยซีทจะลดลงในดินที่เปียกชื้นและมีสภาพเป็นกรด (Alexander, 1991) โดยทั่วไปในดินจะมีเชื้อแอคติโนมัยซีทอยู่ในช่วง  $10^5$ - $10^8$  เซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน (aerobe) ในการเจริญ ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการ (obligate anaerobe) หรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (facultative anaerobe) สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มของ *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุดเนื่องจาก *Streptomyces* เจริญเติบโตได้เร็วและจัดเป็นสมาชิกสกุลสำคัญที่มีปริมาณมากในธรรมชาติถึง 90% ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมด (Williams *et al.*, 1989)

แบคทีเรียแอคติโนมัยซีทหรือ Actinomycetes ดำรงชีวิตอยู่ในดิน ในปุ๋ยหมัก น้ำโคลนตม และบริเวณรากพืช แบคทีเรียนี้เป็นผู้ริเริ่มผลิตอินทรีย์วัตถุจากซากพืชซากสัตว์ให้เป็นสารใหม่กลับคืนสู่สิ่งแวดล้อม และเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในหลายด้านโดยธรรมชาติ ปริมาณของแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทที่พบในดินขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพของดิน เช่น ในดินทั่วไป 1 กรัม ที่มีสภาพความเป็นกรดและมีปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน จะพบแอคติโนมัยซีท ประมาณ  $10^5$  -  $10^8$  เซลล์ แต่ถ้าเป็นดินที่มีสภาพแห้งและมีสภาพเป็นด่างจะพบแอคติโนมัยซีทในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง โดยอาจพบได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในดินนั้น และแอคติโนมัยซีทที่พบในดินส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตมัยซีท (*Streptomyces*) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุดในทางวิทยาศาสตร์ แอคติโนมัยซีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างหลายแบบ กลม ท่อน หรือเป็นเส้นสายคล้ายเชือก โดยอาจเป็นเส้นสายที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใย เพื่อสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ หรืออาจจะเป็นเส้นสายที่มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ ซึ่งโครงสร้างของสปอร์มีทั้งแบบที่มีถุงหุ้มและไม่มีถุงหุ้ม แบคทีเรียแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน แต่ก็ยังมีบางชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนหรือต้องการก็เพียงเล็กน้อย นักวิทยาศาสตร์พบว่าการเจริญของแอคติโนมัยซีทถูกยับยั้งได้ด้วยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของราแอคติโนมัยซีท มีบทบาทที่สำคัญอันหนึ่ง คือ ช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ช่วยย่อยส่วนประกอบของพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และไคติน แอคติโนมัยซีทบางชนิด เช่น *Streptomyces rubiginosus*, *Streptomyces bambergensis* และ *Streptomyces violaceoniger* สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถช่วยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นน้ำตาลฟรุกโทสได้ ปัจจุบัน มีการใช้

ประโยชน์แอสโคไมซีทช่วยผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เช่น การใช้แอสโคไมซีทชนิด *Thermomonospora* ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ไซแลนที่ทำงานที่อุณหภูมิสูงซึ่งเอนไซม์นี้มีประโยชน์ในการผลิตน้ำตาลไซโลสจากซังข้าวโพด นอกจากนี้ มีการใช้แอสโคไมซีทบางชนิดในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ย่อยสลายสารพิษอะลิฟาติก-อะโรมาติก โคโพลีเอสเตอร์ (Aliphatic-Aromatic Copolyesters และ 1,4 -ไดออกเซน (1,4-Dioxane) ทางการแพทย์และเภสัชกรรมก็ใช้ประโยชน์จาก แอสโคไมซีท เช่น ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสและใช้ผลิตสารต้านมะเร็งและสารกดระบบภูมิคุ้มกัน ทางการเกษตรมีการใช้แอสโคไมซีทในการผลิตสารฆ่าแมลง สารฆ่าวัชพืช และสารกดภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีการใช้แอสโคไมซีทสายพันธุ์ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 ในการควบคุมศัตรูพืช และควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชที่เกิดกับรากและเมล็ดปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยแอสโคไมซีทชนิดหนึ่ง คือ *Streptovorticillium albireticculi* และค้นพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถต่อต้านเชื้อราที่ก่อโรคที่อยู่ในดินบางอย่างได้ ซึ่งการค้นพบนี้จึงอาจนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชได้ในอนาคต แบคทีเรียแอสโคไมซีท เป็นตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีคุณประโยชน์ต่อวงการแพทย์และยาเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม รวมถึงต่อวัฏจักรของระบบนิเวศ

### 2.2.1 ลักษณะโครงสร้างแบบเส้นใย

เส้นใยเดี่ยว ๆ มีความหนาประมาณ 0.4-1.3  $\mu\text{m}$  ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีผนังกันและยึดยาวออกที่ส่วนปลายเส้นใย และสามารถสร้างเป็นกิ่งแขนงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะเวลาที่มีการเจริญองค์ประกอบภายในเซลล์ของเส้นใย ก็เช่นเดียวกับองค์ประกอบในเซลล์ของโพรคาริโอตทั่ว ๆ ไป คือมี ไซโทพลาสซึม ที่มี fibrillar DNA มี ribosome และ โครงสร้างขนาดเล็กที่อยู่ภายในเซลล์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างที่สะสมอาหาร เช่น โพลีฟอสเฟต ไลปิด หรือสารโกลีแซคคาไรด์มีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasmamembrane) และอาจมี mesosomes ซึ่งจะต่อเชื่อมกับโครงสร้างของผนังเซลล์ โดยผนังของเส้นใยจะประกอบด้วยผนังชั้นเดียวหนาประมาณ 10-20 nm ผนังกันเส้นใยของ vegetative hyphae ที่ไม่แตกหักก็มีลักษณะโครงสร้างเช่นเดียวกัน และจะเรียกว่าเป็นโครงสร้างผนังกันเซลล์ชนิดที่ 1 (Type 1)" เส้นใยเหนือผิวอาหารจะประกอบด้วย fibrous sheath ซึ่งเป็นชั้นบางๆที่ห่อหุ้มผนังเส้นใยอีกชั้นหนึ่งและ fibrous sheath นี้พบใน aerial hyphae ที่มีการ

สร้างสปอร์ด้วย เนื่องจากผิวของสปอร์จะมีความแตกต่างกันไป ขึ้นกับลักษณะของสปอร์แต่ละชนิดว่าจะเป็นชนิดมีหนาม หรือเป็นชนิดมีปุ่ม เป็นต้น

### 2.2.2 การสร้างผนังกันของเส้นใย

การแบ่งเซลล์ของเส้นใย และการสร้างสปอร์ เริ่มที่มีการสร้างผนังกัน (cross wall) โดยทั่วไปแล้วเส้นใยที่มีผนังกันเพียงชั้นเดียวสามารถคงไว้ซึ่งความแข็งแรง และมีความคงตัวอย่างไรก็ตามในบางกรณีที่ผนังกันเป็นผนังชั้นเดียว และมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิดสปอร์ เช่นใน *Nocardiosis dassonvillei* เมื่อ vegetative hyphae มีการแตกหักเป็นท่อน ๆ ผนังกันอีกชนิดหนึ่ง ที่เรียก split septum ก็อาจเกิดขึ้นได้ซึ่งผนังกันชนิดนี้เป็นผนังกันที่มี 2 ชั้น สามารถสร้างเป็น polar wall ของห้องใหม่ใกล้เคียงกันขึ้นได้ จัดเป็นผนังกันชนิดที่ 2 (Type 2) ซึ่งการแตกหักของเส้นใย และการสร้างชิ้นส่วนที่คล้ายสปอร์ (spore-like element) ในแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม nocardioform หลายชนิดก็มีพื้นฐานของผนังกันในลักษณะแบบเดียวกันนี้ "ในกรณีของ *Streptomyces* มีการสร้างผนังกันทั้งหมด 4 แบบ และเกิดเป็นสปอร์ขึ้นและอาจมีความสัมพันธ์กับผนังกันพื้นฐานทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมาข้างต้น ใน *Saccharopolyspora rectivirgula* อาจเป็นตัวอย่างที่ซับซ้อนที่สุดของการเกิดผนังกัน ขณะเมื่อมีการสร้างสปอร์เกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ขององค์ประกอบภายในผนังเซลล์จะมีบทบาทที่สำคัญในการสร้างสปอร์ด้วยและในสกุลที่มีการสร้างสปอร์ เช่น *Actinoplanes*, *Pilimelia*, *Dactylosporangium*, *Streptosporangium*, *Spirillospora* และ *Planomonospora* รวมทั้งในสกุลที่มีการสร้างสปอร์เดี่ยว ๆ ตัวอย่างเช่นใน *Micromonospora* การเกิด sporulation เริ่มต้นจากการที่เมื่อเชื้อมีการสร้างผนังกันขึ้นแล้วก็จะมีการแยกตัวออกของผนังกันในเวลาต่อมา

## 2.3 ปัจจัยการควบคุมปริมาณแอคติโนมัยซีทในดิน

ปัจจัยที่ควบคุมปริมาณของแอคติโนมัยซีท ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุและความเป็นกรดต่างของดิน (สายพิน, 2547)

### 2.3.1 ปริมาณอินทรีย์วัตถุ

อัตราการเจริญของแอคติโนมัยซีทจะช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา (Waksman, 1959) ปริมาณของแอคติโนมัยซีทมีผลมาจากปริมาณอินทรีย์วัตถุที่พบในดิน อาจพบแอคติโนมัยซีทได้มากถึง  $10^8$  เซลล์ต่อดิน 1 กรัม เมื่อมีการเติมสารอินทรีย์ลงในดินจะพบว่าแบคทีเรียและฟังไจปริมาณมากในระยะแรก หลังจากนั้นเมื่อมีปริมาณของไนโตรเจนที่พอเหมาะแล้ว ปริมาณของแอคติโนมัยซีทจะเพิ่มขึ้นในระยะหลัง ซึ่งเป็นระยะที่สารอินทรีย์ถูกย่อยสลายเกือบหมดเหลือแต่ส่วนที่ย่อยสลาย

ยาก เช่น ไคติน (chitin) ลิกนิน (lignin) เคอราติน (keratin) เพคติน (pectin) สารประกอบอะโรมาติกที่มีโครงสร้างซับซ้อนและกรดฮิวมิก (humic acid) (McCarthy & Williams, 1992: 182-192) แบคทีเรียและฟังไจจะใช้สารอินทรีย์ส่วนที่เหลือนี้ไม่ค่อยได้ จึงมีปริมาณลดลง แต่ในทางกลับกัน แอคติโนมัยซีท สามารถใช้สารอินทรีย์เหล่านี้ได้จึงมีปริมาณเพิ่มขึ้น (งามนิจ, 2537)

โดยทั่วไปแล้วแอคติโนมัยซีทต้องการเพียงแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และเกลือแร่สำหรับการเจริญเท่านั้น โดยแอคติโนมัยซีทบางชนิดอาจต้องการวิตามินหรือสารที่เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญ (growth factors) แต่บางชนิดก็ไม่จำเป็น เช่น ในกลุ่ม *Streptomyces* ดังนั้นส่วนใหญ่ของ *Streptomyces* จึงสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อง่าย ๆ อย่างไรก็ตาม แอคติโนมัยซีทแต่ละชนิดจะแตกต่างกันมากในเรื่องความต้องการแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งสามารถใช้เป็นคุณสมบัติที่แตกต่างในการจัดจำแนกชนิดได้ โดยแหล่งของคาร์บอนที่นิยมใช้ ได้แก่ เซลโลโลไบโอส กลูโคส กลีเซอรอล ดี-แมนโนส และทรีฮาโลส แหล่งของไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมแอล-อาร์จินีน และไนเตรท มีน้อยชนิดมากที่ต้องการกรดอินทรีย์ เช่น อินูลิน ไซลิตอล แอล-เมไธโอนีน หรือไนไตรท์ และส่วนใหญ่สามารถสลายแป้ง เอสคิวลิน เคซีน เจลาติน และไฮโปแซนธินได้ (รัตนภรณ์, 2548)

คาร์บอน (carbon) เป็นองค์ประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์ที่มีชีวิตและเป็นโครงสร้างหลักหรือที่เรียกว่า back bone ที่มีความสำคัญในการทำงานทางชีววิทยาโมเลกุล ทำให้เห็นถึงความหลากหลายของจุลินทรีย์และความสามารถของสิ่งมีชีวิตในการสังเคราะห์โมเลกุลทั้งหมด ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ได้จากแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ ความแตกต่างนี้ทำให้สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้ เช่น ไชยาโนแบคทีเรียสามารถสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ทุกชนิด (โปรตีน, กรดนิวคลีอิก) จากคาร์บอนไดออกไซด์ถ้ามีเกลือแร่ สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อาจมีความสามารถในการสังเคราะห์จำกัดมาก และต้องใช้อาหารในการเจริญเติบโตที่ซับซ้อน แหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีตั้งแต่คาร์บอนไดออกไซด์หรือมีเทนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ สารประกอบอินทรีย์ซับซ้อนที่อยู่ใน Biosphere (เช่น คาร์โบไฮเดรต เปปไทด์ กรดอินทรีย์) จุลินทรีย์ทั้งหลายสามารถอยู่ภายใต้สภาพที่เหมาะสมและเติบโตไปพร้อมกับสารอินทรีย์ต่างๆ ทำให้สังเคราะห์สารอินทรีย์เหล่านี้เป็นสารตั้งต้น ระบบปฏิบัติการนี้เป็นพื้นฐานสำหรับการบำบัดทางชีวภาพ กำจัดสารเคมีมลพิษจากสภาพแวดล้อมโดย จุลินทรีย์สามารถใช้ประโยชน์จากสารมลพิษเหล่านี้เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งแหล่งพลังงาน Waksman กล่าวถึงเปเปอร์ของตัวเองว่าเป็นรายงานแรกของความพยายามที่จะตรวจสอบความสามารถของสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของแอคติโนมัยซีทจากการใช้สารประกอบคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต (Waksman, 1961)

ไนโตรเจน (nitrogen) เป็นส่วนประกอบสำคัญของกรดอะมิโน (โปรตีน), นิวคลีโอไทด์ (กรดนิวคลีอิก), ฟอสโฟลิปิด และส่วนประกอบหนึ่งของผนังเซลล์ แบคทีเรียและอาเคียแบคทีเรียบางชนิดมีส่วนของเซลล์ที่มีความสามารถในการดึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ ตัวจริงไนโตรเจน

เหล่านี้รีดิคซ์ในโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียม ซึ่งเป็นสารประกอบตัวหนึ่งที่รวมกันไปเป็นสารประกอบคาร์บอนโดยโครงสร้างของเซลล์

Cations เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาหรือกิจกรรมของเอนไซม์ ความเสถียรภายในเซลล์ ส่วนใหญ่จะเป็น cation ซึ่งจะประกอบไปด้วยโพแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม เหล็ก และโคบอลต์

Growth factors เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำเมื่อเทียบกับสารอื่น ที่ต้องมีใน growth medium ของจุลินทรีย์บางชนิด เพราะจุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์ Growth factors ได้ สารตั้งต้นที่ทำให้เกิด Growth factors ได้จากกรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน และวิตามินบี จุลินทรีย์ไม่ต้องการ วิตามินที่ละลายในไขมัน อย่างเช่น วิตามินเอและดี เพราะไม่ได้เป็นส่วนประกอบของจุลินทรีย์

### 2.3.2 ความชื้น

ความชื้นในดินมีความสำคัญต่อปริมาณแอกติโนมัยซีท บริเวณที่มีดินน้ำท่วมขังหรือดินที่มีความชื้นสูง จะพบแอกติโนมัยซีทน้อยมากหรือแทบไม่พบเลย ทั้งนี้เนื่องจากแอกติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ชนิด aerobic คือต้องการออกซิเจนในการเจริญทำให้ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่ขาดออกซิเจน ในทางตรงกันข้ามในดินบริเวณที่มีสภาพแห้ง ที่ซึ่งแบคทีเรียไม่สามารถทนได้แบคทีเรียจะมีปริมาณน้อยมาก แต่แอกติโนมัยซีทจะมีปริมาณมาก เนื่องจากแอกติโนมัยซีทมีโคโคนิดที่สามารถทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดี และสามารถคงชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน

### 2.3.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ในดินที่มีพีเอชต่ำจะพบปริมาณแอกติโนมัยซีทน้อยมาก และจะไม่พบแอกติโนมัยซีทในดินที่มีพีเอชเป็นกรด โดยทั่วไปจะพบมากในดินที่มีพีเอช 6.5-8 *Streptomyces* ไม่เจริญที่พีเอช 5 ดังนั้นการเติมปุ๋ยเคมีที่ทำให้พีเอชของดินเป็นกรดมากขึ้น จะทำให้ปริมาณของแอกติโนมัยซีทลดลง

### 2.3.4 อุณหภูมิ

แอกติโนมัยซีทจะชอบเจริญในช่วงอุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงมาก การเจริญเติบโตจะชะงัก ส่วนฤดูกาลเป็นสิ่งที่กำหนดปริมาณแอกติโนมัยซีทเช่นกัน โดยในเขตหนาวและเขตอบอุ่นจะพบปริมาณแอกติโนมัยซีทในดินในฤดูใบไม้ร่วงและฤดูใบไม้ผลิมากกว่าในฤดูหนาวและฤดูร้อน

## 2.4 Cell wall synthesis

Cell wall ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วย peptidoglycan ขณะที่ cell wall ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย peptidoglycan และชั้นของ outer membrane ซึ่ง outer membrane เป็น lipid bilayer ที่มี porin เป็น protein channel แทรกอยู่ porin นี้เองเป็นช่องให้สารที่มี

คุณสมบัติเป็น hydrophilic ผ่านเข้าไป ชั้น peptidoglycan ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมีความหนา มากกว่า peptidoglycan ของเชื้อแกรมลบ

Peptidoglycan ประกอบด้วย polypeptide และ polysaccharide ซึ่ง polysaccharide ได้แก่ amino sugar 2 ชนิดคือ N-acetylmuramic acid (NAM) และ N-acetylglucosamine (NAG) ส่วน polypeptide นั้นประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ตัวเชื่อมต่อกับ N-acetylmuramic acid และ Glycine อีก 5 ตัวเชื่อมต่อกับสายของกรดอะมิโนนั้น การเชื่อมต่อหน่วยย่อยของ peptidoglycan อาศัย Penicillin binding protein (PBPs) ซึ่งเป็น membrane protein ที่แทรกอยู่ที่ cytoplasmic membrane โดยที่ PBPs มี transpeptidase activity

ขั้นตอนการสังเคราะห์ peptidoglycan กล่าวโดยสรุปคือ

- 1) เริ่มแรก NAM-UDP ที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโน 3 ตัวจะได้รับกรดอะมิโนเพิ่มอีก 2 ตัวคือ D-Ala-D-Ala เข้ามาเชื่อมต่อด้วย
- 2) NAM จะเข้ามาเชื่อมต่อกับ lipid carrier ซึ่งจะทำหน้าที่พาเอา building block ที่เป็นองค์ประกอบในการสร้าง peptidoglycan ออกไปนอกเซลล์ Lipid carrier นี้อาจเรียกว่า C55 lipid หรือ bactoprenol เมื่อ NAM เข้าเชื่อมกับ C55 lipid แล้วจะมีการปลดปล่อย UMP ออกมา
- 3) NAM เชื่อมต่อกับ NAG ตามด้วยการเชื่อมต่อกับ Glycine อีก 5 โมเลกุลเข้าเชื่อมต่อบริเวณสายของกรดอะมิโน (ในตำแหน่งที่ 3) ตามลำดับ
- 4) Building block ทั้งหมดที่สร้างได้ (NAG-NAM-Gly<sub>5</sub>) ที่เชื่อมอยู่กับ lipid carrier จะถูกพาออกมานอกเซลล์
- 5) เมื่อออกมานอกเซลล์แล้ว building block จะเชื่อมต่อกับ Acceptor ที่มีอยู่แล้วโดยอาศัย transpeptidase enzyme จาก PBPs โดยที่จะเชื่อม D-Ala เข้ากับ Gly<sub>5</sub> และมีการปลดปล่อย D-Ala ออกไป 1 ตัว เกิด cross link ขึ้นได้เป็น peptidoglycan ส่วน lipid carrier เมื่อส่ง building block ออกไปนอกเซลล์แล้ว จะต้องมีการปลดปล่อย Phosphate (P) ออกไป 1 ตัวและกลับไปทำหน้าที่ carrier เป็นวงจรได้อีกครั้งหนึ่ง

## 2.5 Involvement of phospholipids in bacterial growth

ลิพิด (Lipids) เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่หลากหลายในโครงสร้างและกระบวนการภายในเซลล์ของแบคทีเรีย โดยหน้าที่สำคัญของลิพิดก็คือการสร้างชั้น lipid bilayer ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นด่านในการคัดเลือกรสารผ่านเข้าออกเซลล์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก Neutral diacylglycerol glycols

เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและพืช ขณะที่พวกแบคทีเรียแกรมลบที่ผนังเซลล์ด้านนอกสุด (outer membrane) จะเป็นพวก saccharolipid (Lipid A) ในแบคทีเรียจำพวก *E. coli* มี phospholipids (PLs) ที่สำคัญ 3 ชนิดด้วยกันและยังมี fatty acid อีกหลายชนิด รวมทั้งพวก precursor ต่างๆ ซึ่งในแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีชนิดของฟอสโฟลิปิดแตกต่างกันออกไป ในสิ่งแวดล้อมที่มีอาหารจำกัดแบคทีเรียจะมีการแข่งขันกันเจริญโดยการสร้างสารปฏิชีวนะออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยแบคทีเรียในจินัส *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารปฏิชีวนะหลากหลายชนิด โดยองค์ประกอบของสารปฏิชีวนะเหล่านี้จะเกิดจากการหลั่งสารไปยังบริเวณที่มี peptidoglycan หรือบริเวณที่มีการสลายของเชื้อหุ้มเซลล์ Triacylglycerols (TAGs) เป็น common lipid-based energy ที่สะสมอยู่ในสัตว์ พืช และพวก eukaryote microorganism ในแบคทีเรียจะเป็นพวก polyhydroxyalkanoic acids ซึ่งพบในแอคติโนมัยซีทกลุ่ม *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* และ *Streptomyces*

## 2.6 Thin layer chromatography (TLC)

Thin layer chromatography ถูกเรียกครั้งแรกในปี 1938 โดยคนงานชาวรัสเซีย 2 คน คือ Izmailov และ Shraiber พวกเขา Thin layer chromatography หรือ horizontal thin layers ซึ่งเป็นวิธีการที่คิดค้นและทำขึ้น 10 ปี (Izmailov & Shraiber, 1938) จนกระทั่งเมื่อสองนักเคมีชาวอเมริกันอธิบายถึงการแยกของ terpenes ในน้ำมันหอมระเหย โดยการทำให้ Thin layer chromatography (Meinhard & Hall, 1949)

Thin-layer chromatography (TLC) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการกระจายของสาร ระหว่างภาคนิ่ง (stationary phase) ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่เคลือบอยู่บนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกแข็งและตัวทำละลาย (mobile phase) ซึ่งเป็นภาคเคลื่อนที่ที่เคลื่อนผ่านตัวดูดซับ TLC จึงจัดเป็น solid-liquid adsorption chromatography เช่นเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี แต่เดิม TLC ใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพ สำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยเพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ในสารผสม และสามารถใช้พิสูจน์สาร โดยการเปรียบเทียบค่า Rf ของสารกับสารแท้ (authentic sample) TLC ยังใช้สำหรับหาตัวทำละลาย (solvent) ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารผสมที่มีปริมาณมากโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) (Stahl, 1965)

TLC เป็นแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกแข็ง เคลือบด้วยตัวดูดซับเป็นชั้นบางๆ ตัวดูดซับที่ใช้กับ TLC จะมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี และชนิดของตัวดูดซับที่ใช้ก็เป็นเดียวกับที่ใช้กับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้แก่ ซิลิกาเจล คีเซลกัวร์ (kieselguhr) อะลูมินา และผง

เซลลูโลส เป็นต้น ตัวดูดซับเหล่านี้มักมีสารเรืองแสงผสมอยู่ เพื่อสามารถตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยมองภายใต้แสง UV ได้ (Stahl, 1965) วิธีการของ TLC แบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมแผ่น TLC
2. การจุดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC
3. การพัฒนาให้เกิดการแยกสารบนแผ่น TLC (Development of TLC plate)
4. การตรวจหาจุดบนแผ่น TLC (Visualization)
5. การคำนวณหาค่า R<sub>f</sub>

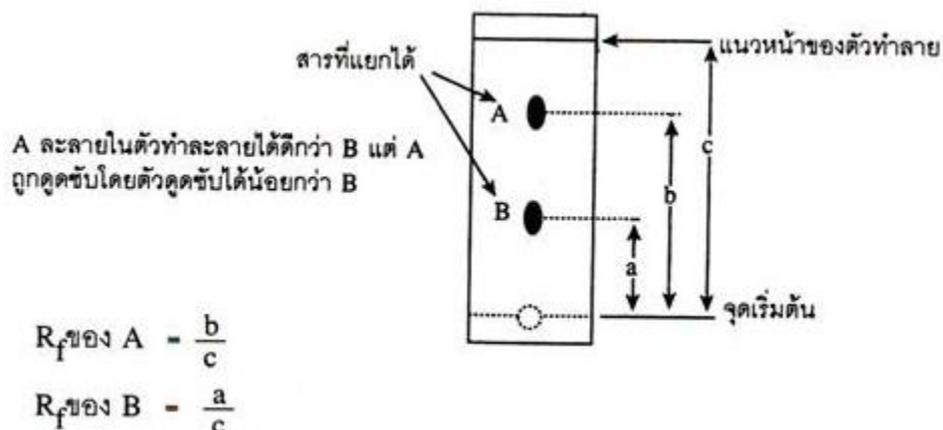
### 2.6.1 ค่า R<sub>f</sub>

ค่า R<sub>f</sub> หรือค่า “rate of flow” คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ในกรณีที่ใช้ตัวดูดซับเดียวกัน ใช้ระบบตัวทำละลายเดียวกัน และระบบที่ศึกษาอยู่ในสถานะ (อุณหภูมิ, ความดัน, ความหนาของตัวดูดซับ ฯลฯ) เดียวกัน สารหนึ่งๆ จะมีค่า R<sub>f</sub> คงที่เสมอ การวัดเปรียบเทียบค่า R<sub>f</sub> จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการพิสูจน์ชนิดของสาร

ถ้าระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดศูนย์กลางวงกลมของสีที่ปรากฏ เป็นระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้และระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึง solvent front เป็นระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ จะได้ว่า

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ค่า R<sub>f</sub> ที่ได้จะอยู่ระหว่าง 0 ถึง 0.999 และไม่มีหน่วย (Joseph, 1992)



รูปที่ 2.2 แสดงการหาค่า  $R_f$  ของสารหลังจากการแยกสารแล้ว

ที่มา: [www.suwannaramwittayakom.com](http://www.suwannaramwittayakom.com) (วันที่ 12 พฤษภาคม 2558)

### 2.6.2 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยใช้แผ่น TLC

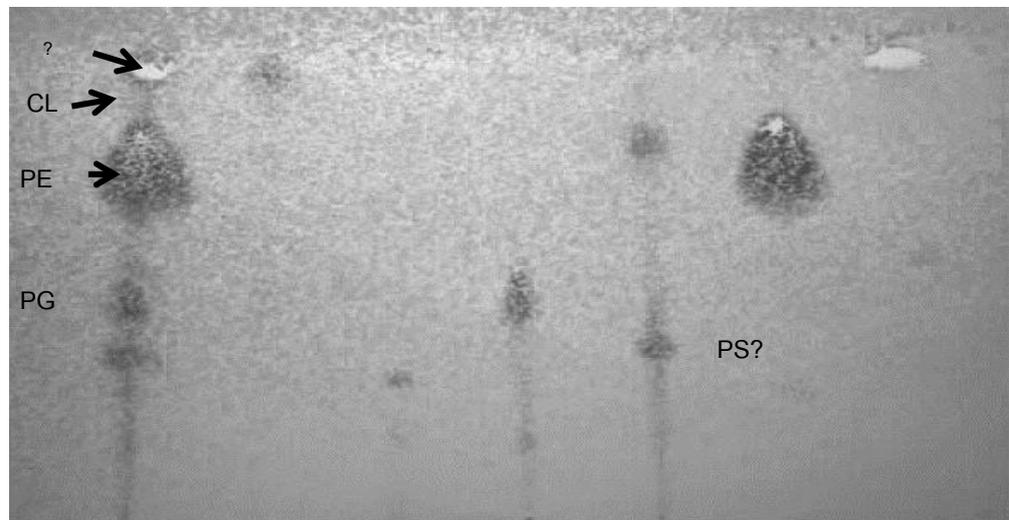
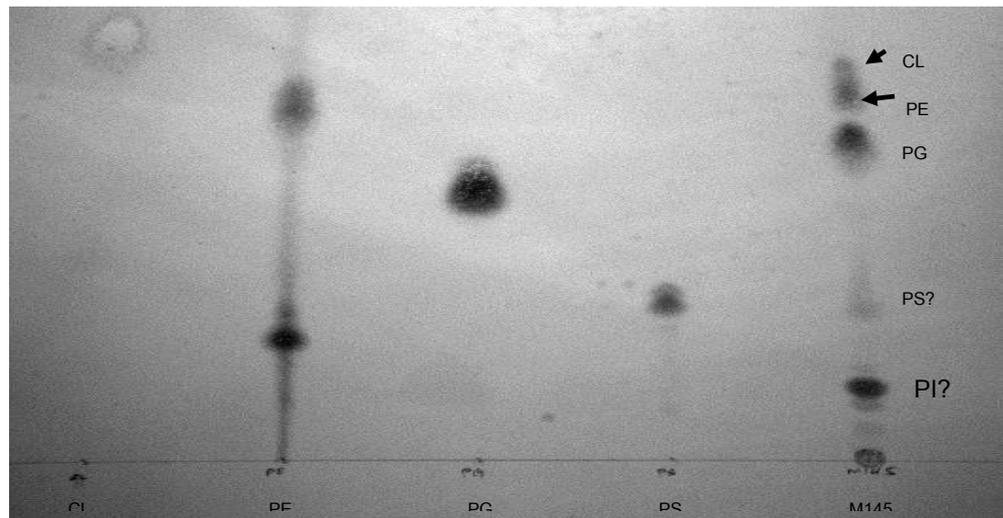
ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นภาคเคลื่อนที่หรือ mobile phase นั้นอาจเป็นตัวทำละลายเดี่ยวหรือเป็นตัวทำละลายผสม การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมควรทำอย่างมีระบบดังนี้ จุดสารตัวอย่างที่เป็นสารผสมลงบนแผ่น TLC หลายๆ แผ่น เลือกตัวทำละลายหลายๆ ระบบ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน อีเทอร์ และเมทานอล ตามลำดับ (ตัวทำละลายเรียงลำดับจากสภาพขั้วต่ำไปยังสภาพขั้วสูง) แล้ววางแผ่น TLC ที่จุดสารตัวอย่างแล้วลงในตัวทำละลายแต่ละชนิดๆ ละ 1 แผ่น หาค่า  $R_f$  ของแต่ละแผ่นในตัวทำละลายที่ต่างกัน เลือกตัวทำละลายที่สามารถให้ผลการแยกที่ชัดเจน

### 2.6.3 ประโยชน์ของ TLC

- ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) โดยการเปรียบเทียบค่า  $R_f$  ของสารตัวอย่างกับสารแท้ (authentic sample) เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารตัวเดียวกัน ในงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์สาร เป็นวิธีตรวจสอบผลขั้นต้นที่รวดเร็วกว่าวิธีอื่น
- ใช้ตรวจสอบความก้าวหน้าของปฏิกิริยาโดยหาค่า  $R_f$  ของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ เมื่อเวลาผ่านไปสารตั้งต้นย่อมมีปริมาณน้อยลง ส่วนผลิตภัณฑ์ย่อมมีมากขึ้น เราสามารถใช้ TLC ตรวจสอบระยะเวลาที่ปฏิกิริยาเกิดจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์
- ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่าง สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ยอมให้จุดเพียงจุดเดียวบนแผ่น TLC ในทุกระบบตัวทำละลาย
- ใช้หาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

#### 2.6.4 การระบุชนิดของ Phospholipids (PL) ที่ผ่านการเปรียบเทียบกับ Phospholipids standards โดยวิธีการ TLC (Khanungkan, 2013)

ฟอสโฟลิปิดสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี TLC และระบุชนิดของไขมันที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบโดยการฉีดพ่นด้วยแอมโมเนียมโมลิบเดต (ammoniummolybdate) ดังที่แสดงในรูปที่ 2.16 ทั้ง 2 แผ่น TLC รูปที่ 2.16 A แสดงแผ่น TLC standard ซึ่งมีฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน 4 ตัว คือ phosphatidylserine (PS), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) รูปที่ 2.16 B แสดงฟอสโฟลิปิดมาตรฐาน 6 ตัว คือ phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), phosphatidic acid (PA), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin (CL) โดยแผ่น TLC ที่แสดงฟอสโฟลิปิดมาตรฐานนี้ สามารถใช้ในการเปรียบเทียบตำแหน่งของฟอสโฟลิปิดที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทในงานวิจัยครั้งนี้ได้



**รูปที่ 2.3** การวิเคราะห์ TLC ของ phospholipids standard ฟอสโฟลิปิดสามารถระบุชนิดของไขมันที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบโดยการฉีดพ่นด้วยแอมโมเนียมโมลิบเดต (ammoniummolybdate) (A) อ่างอิงการวิเคราะห์ TLC ของ PL standard และรายละเอียดของช่วง mid- log phase ของ *S. coelicolor* M145 การพัฒนาในระบบตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม / เมทานอล / กรดอะซิติก / น้ำ (80: 12: 15: 4) CL มีระยะทางการเคลื่อนที่ที่สูงที่สุด ตามมาด้วย PE ที่มีระดับของบางส่วนที่ทับซ้อนกับ PG, PS (จุดจาง) และท้ายสุดเป็นจุด PL unknown โดยแผ่น TLC ถูกทำซ้ำจากต้นแบบ (Tiong *et al.*) (B) PL standards ที่ละลายในเอทานอล (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ถูกนำไปใช้กับแผ่น TLC ที่จะช่วยให้การระบุจุดที่ไม่ทราบชนิด ได้แก่ phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE) และ cardiolipin(CL)(ที่มา:Khanungkan,2013)

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3. ระเบียบวิธีวิจัย

##### 3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดแยกเชื้อ

###### 3.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณป่าชายเลนที่มีความอุดมสมบูรณ์ในเขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน ตำบลคลองตำหรุ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้พลั่วขุดหลุมลึกระดับ 0-15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นความลึกระดับไทรพรวน ทำการวัดค่าความเป็นกรดเบสของดิน โดยบันทึกตำแหน่งจุดที่เก็บและค่าความเป็นกรดเบสที่วัดได้แต่ละจุด เก็บตัวอย่างละ 500 กรัม เก็บดินใส่ถุงเก็บตัวอย่าง และนำตัวอย่างดินที่เก็บได้แต่ละตัวอย่าง (samples) มาทำการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท (Actinomycetes) ในห้องปฏิบัติการ

###### 3.1.2 การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

นำตัวอย่างดินข้อ 3.1.1 มาแยกเชื้อโดยวิธีด้วยการชั่งดินมา 1 กรัม จากตัวอย่างดินที่ตากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นหรือสารละลายฟีนอลปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) กำหนดเป็นระดับการเจือจางที่  $10^{-1}$  นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) นาน 6 นาที จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีระดับความเจือจางจนถึง  $10^{-5}$  นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  กระจายตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร Starch - Casein agar (ภาคผนวก ก) ซึ่งเติม cycloheximide 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน (เช็คดูการเจริญของเชื้อที่แยกได้ทุกสัปดาห์)

###### 3.1.3 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่าง

###### 3.1.3.1 การหาน้ำหนักดิน

เทสารแขวนลอยของดินของความเจือจางที่  $10^{-1}$  ที่เหลืออยู่ลงในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนน้ำระเหยหมดและน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักของบีกเกอร์อีกครั้ง คำนวณหาน้ำหนักของดินที่ใช้ในการแยกเชื้อจากผลต่างของน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนและหลังอบ (ภาคผนวก ข)

### 3.1.3.2 การหาปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างดินมา 1-2 กรัมใส่ในถ้วยเซรามิกหรือบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนัก นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างจากน้ำหนักดินที่หายไป (ภาคผนวก ข)

### 3.1.3.3 การวัดค่าความเป็นกรดเบส

ชั่งตัวอย่างดิน 2 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย โดยคนตัวอย่างไปด้วยในขณะเดียวกันด้วยข้อตักสารหรือแท่งแก้ว จนสังเกตเห็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนผิวจึงทำการวัดค่าความเป็นกรด-เบส ทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในรูปค่าเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 3 ครั้ง

### 3.1.4 การแยกเชื้อและการเก็บรักษา

นำตัวอย่างเชื้อในอาหารที่ได้จากข้อ 3.1.2 ทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ด้วยเทคนิคการ cross streak บนอาหาร Starch - Casein agar ที่เติม cycloheximide 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกมา streak บนอาหารสูตร Soya Bean Flour - Mannitol agar (SFM agar) (ภาคผนวก ก) ที่เติม cycloheximide 100 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อแยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ลงบนหลอดอาหารแข็ง Hickey Tresner agar (ภาคผนวก ก) ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มที่เก็บไว้สำหรับทำการทดลองในขั้นต่อไป และทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลต

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

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เจริญเติบโตเต็มที่ทุกไอโซเลตบนอาหาร Starch - Casein agar ที่เติม cycloheximide จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อขูดเอาสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารจนทั่ว แล้วจึงทำการเทลง centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้เส้นใยสปอร์เกิดการแตกหักออกจากกัน จากนั้นนำไปกรองผ่านสำลีฆ่าเชื้อเพื่อกรองเอาส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจติดมากับสปอร์ออก นำส่วนที่กรองถ่ายใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที เทส่วนละลายใส่ทิ้งไป และทำการผสมตะกอนของเชื้อที่ได้เป็นเวลาเล็กน้อย เพื่อทำการกระจายตัวสปอร์ที่ยังคงเหลืออยู่ในหยดน้ำภายในหลอด แล้วจึงทำการ resuspension ด้วยกลีเซอรอล 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสปอร์ที่ได้ไปทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำเป็น stock culture

### 3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานและชีวเคมีของเชื้อ (วิวัฒน์ และเอกภพ, 2549)

#### 3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญของเชื้อ (Morphological and Cultural characteristics)

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิด ISP medium no.2 (Yeast extract - malt extract agar) (ภาคผนวก ก) ด้วยวิธี crosshatch streak ที่บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการเจริญ สีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (the NBs/IBCC color system) (ภาคผนวก ค) และตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและสปอร์ ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลด์ (ภาคผนวก ง) แล้วทำการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์

#### 3.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ (Physiology and Biochemistry characteristics)

##### 3.2.2.1 การตกตะกอน (Coagulation) และการย่อยสลายโปรตีน (Peptonization) ใน นม (Skim milk)

เจียเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตจำนวนหนึ่งห่วงเจียเชื้อ (loop) ลงบนอาหาร Skim milk 10% (ภาคผนวก ก) และ Skim milk agar (ภาคผนวก ก) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ถ้ามีการตกตะกอนของโปรตีนจะเกิดตะกอนในนมได้ก้นหลอดอาหาร Skim milk 10% และถ้ามีการย่อยสลายโปรตีนในนมเกิดขึ้น นมซึ่งมีสีขาวขุ่นจะเปลี่ยนเป็นสารละลายใสบนอาหาร Skim milk agar

##### 3.2.2.2 การย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction)

เจียเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตลงในอาหารเหลว Bouillon gelatin broth (ภาคผนวก ก) ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำหลอดทดลองที่เพาะเลี้ยงไว้มาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ถ้ามีการย่อยสลายเจลาตินจะไม่เกิดการแข็งตัวของเจลาติน

##### 3.2.2.3 การย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction)

เจียเชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตลงในอาหารเหลว Peptone  $\text{KNO}_3$  broth (ภาคผนวก ก) ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก (ภาคผนวก จ) ลงไป 2 หยดและสารละลาย N,N-dimethyl-L-naphthylamine (ภาคผนวก จ) ลงไป 3 หยด ถ้าเชื้อมีการเปลี่ยนไนเตรดเป็นไนไตรต์ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูจนถึงสีแดงที่บริเวณผิวหน้าของอาหาร

### 3.2.2.4 การย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis)

เขียนเชื้อแอสคิตโนมัยซีททุกไอโซเลตจำนวนหนึ่งห่วงเขียนเชื้อ (loop) ลงบนอาหาร ISP medium no.4 (Inorganic salts-starch agar) (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยการเติมสารละลายแกรมไอโอดีนลงบนอาหารที่เพาะเชื้อไว้ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งเกิดขึ้นจะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคลโลนิของเชื้อ แต่ถ้าไม่มีการย่อยสลายแป้งจะเกิดสีน้ำเงินแทน

จากการศึกษาในข้อ 3.2 สามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

### 3.3 การหาอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและอัตราการเจริญ

โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิตโนมัยซีทที่คัดเลือกมา 19 ไอโซเลทในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง แอสคิตโนมัยซีท และอาหารที่หาแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนทดแทนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

#### 3.3.1 Spore pre-germination และการ Inoculation (Khanungkan, 2013)

ทำการดูด spore suspension 500  $\mu\text{L}$  ลงในอาหารเหลว 25 มิลลิลิตร International *Streptomyces* Project (ISP2) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 230 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส (supernatant) ทิ้งและเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ 450 นาโนเมตร

คำนวณค่าความเข้มข้นของสปอร์เพื่อทราบปริมาณของสปอร์เริ่มต้นที่เท่ากันคือ  $3 \times 10^6$  pre-germinated spores (gs) ในการ inoculate ลงในอาหารเหลวต่อไป โดยคำนวณจากสูตร

$$\begin{aligned} C &= (\text{OD}_{450} / 0.04) \times (4 \times 10^6) \text{ gs mL}^{-1} \\ &= \text{OD}_{450} \times 10^8 \text{ gs mL}^{-1} \\ V &= (3 \times 10^6 / C) \times 1000 \mu\text{L} \end{aligned}$$

#### 3.3.2 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2), Minimal medium plus mannitol (3MA) และ Reduced arginine-starch-salts (RASS)

คัดเลือกแอสคิตโนมัยซีทที่แยกได้จากดินป่าชายเลน 19 ไอโซเลท แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอสคิตโนมัยซีทในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิตโนมัยซีทในอาหาร

เหลว ISP2 (Control) และอาหารเหลว Minimal medium plus mannitol (3MA) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร)

- ชุดการทดลองที่ 2 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันโดยทำการเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทในอาหารเหลว ISP2 (Control) และอาหารเหลว Reduced arginine-starch-salts (RASS) (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร)

โดยแอกติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชุดการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของแอกติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลทในอาหารแต่ละชนิด โดยให้ปริมาณเชื้อตั้งต้นของแต่ละฟลาสก์มีปริมาณเท่ากันคือ  $3 \times 10^6$  pre-germinated spores (gs) และเพาะเลี้ยงที่สภาวะเดียวกันคือ บ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 230 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บผลการทดลองทุก 3 ชั่วโมง รวมเป็นเวลา 36 ชั่วโมง หาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยกรองเซลล์แอกติโนมัยซีท 5 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรอง whatman no.1 ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (overnight) และชั่งน้ำหนักแห้งแล้ว นำกระดาษกรองที่มีเซลล์แอกติโนมัยซีทไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักรวม และหาน้ำหนักเซลล์แห้งต่อไป นำค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในช่วง log phase มาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ) และระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) จากสูตร

$$\text{Specific growth rate } (\mu) = \frac{\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right)}{T_2 - T_1}$$

$$\text{Doubling time } (t_d) = \ln 2 / \mu$$

$$= 0.693 / \mu$$

โดยที่  $X_1$  = ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นของช่วง Log phase

$X_2$  = ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงสุดท้ายของช่วง Log phase

$T_1$  = ชั่วโมงที่ทำการเพาะเลี้ยงเริ่มต้นของช่วง Log phase

$T_2$  = ชั่วโมงที่ทำการเพาะเลี้ยงสุดท้ายของช่วง Log phase

### 3.4 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยซีทด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) (Klanbut, 2013)

#### 3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ และการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท

ทำการเชี่ยเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เลี้ยงบนอาหาร ISP medium no.2 (Yeast extract - malt extract agar) ที่บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ด้วยห่วงเชี่ยเชื้อ (loop) ลงในอาหารเหลว Yeast extract - malt extract broth (YEME broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ความเป็นกรดเบส (pH) 7.2 บ่มเลี้ยงไว้ในสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วทำการเลี้ยงต่อในอาหาร Yeast extract - malt extract broth (YEME broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเป็นกรดเบส 7.2 โดยทำการเติม inoculum ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่เลี้ยงไว้จนครบ 8 ชั่วโมง บ่มที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 3.4.2 การศึกษาฟอสโฟลิปิดจากสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)

ปั่นเหียงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของเชื้อที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนของเชื้อที่ได้ เทส่วนละลายใส่ทิ้งไป ตักตะกอนของเชื้อปริมาตร 100 มิลลิกรัม ใส่ microcentrifuge tube เติมคลอโรฟอร์ม 100 ไมโครลิตร ทำการผสมเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมเมทานอล 200 ไมโครลิตร ทำการผสมเป็นเวลา 2 นาที และเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 80 ไมโครลิตร ทำการผสมเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพิ่มลงไปในตัวอย่าง แล้วทำการผสมเป็นเวลา 5 นาที เมื่อสารตัวอย่างเข้ากันแล้วจึงทำการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปและทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการปั่นเหียงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำการแยกเฟส โดยเปิดเอาชั้น inorganic phase ที่อยู่ชั้นล่างถ่ายใส่ microcentrifuge tube หลอดใหม่และทำการระเหยให้แห้งใน vacuum-centrifugal evaporator นำส่วนที่เหลือมาทำการ resuspension ในคลอโรฟอร์มปริมาตร 3-30 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ autopipette คูดนำสารตัวอย่างที่ได้มาจุด (spot) ลงบนแผ่น TLC (Kiesel Gel 60 F<sub>254</sub> plates) ขนาด 20x20 เซนติเมตร โดยควรจะจุดห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 1.5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของจุดไม่ควรเกิน 2 มิลลิเมตร รอให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง จากนั้นนำแผ่น TLC ไปวางในภาชนะที่มีฝาปิด (tank) ซึ่งประกอบด้วยตัวพา คือ คลอโรฟอร์ม/เมทานอล/กรดอะซิติก/น้ำกลั่น (80:12:15:4 [vol/vol/vol/vol] (Hoischen *et al.*, 1997) และมีแผ่นโครมาโทกราฟี (whatman) ตัดบุภายใน tank ที่ชุ่มด้วยสารละลายเป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้ตัวพาและตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นมาจนประมาณ 3/4 ของความสูงของแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ออกและทำเครื่องหมายตามแนวของตัวทำละลาย (solvent front) เมื่อแผ่น TLC แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปฉีดพ่นแผ่น TLC ด้วยสารละลาย molybdenum blue spray reagent (ภาคผนวก ช) จากนั้นทิ้งไว้ เป็นเวลา 2-3 นาที จะปรากฏจุดขึ้น จากนั้นให้ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดต่างๆ บนแผ่น TLC แล้วจึงวัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า R<sub>f</sub>

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

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณแหล่งดินศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน ต.คลองตำหรุ อ.เมือง จ.ชลบุรี 10 ตำแหน่ง ดังรูปที่ 4.1 และทำการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) ดังวิธีการทดลองที่ 3.2 หลังจากนั้นทำการกำหนดหมายเลขไอโซเลต (Isolate numbers) ของแต่ละตัวอย่างที่แยกได้ และเก็บเป็น stock culture ในอาหารแข็งวุ้นเอียงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ SFM และ YEME (Yeast extract-Malt extract agar) ได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ภาพถ่ายบริเวณป่าชายเลน ต.คลองตำหรุ อ.เมือง จ.ชลบุรี และการเก็บตัวอย่างดิน

ตารางที่ 4.1 แสดงชื่อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินป่าชายเลน ต.คลองตำหรุ จ.ชลบุรี จำนวน 74 ไอโซเลต

ตำแหน่งตัวอย่างดินที่	หมายเลขไอโซเลต
1	CBI 01011, CBI 01021, CBI 01031, CBI 01041, CBI 01052
2	CBI 02011, CBI 02021, CBI 02031, CBI 02041, CBI 02051, CBI 02061, CBI 02071, CBI 02081, CBI 02091, CBI 02101, CBI 02112, CBI 02122
3	CBI 03011, CBI 03021, CBI 03031, CBI 03041, CBI 03051, CBI 03061, CBI 03071, CBI 03081, CBI 03092, CBI 03102, CBI 03112, CBI 03122
4	CBI 04011, CBI 04021, CBI 04031, CBI 04041, CBI 04051, CBI 04062, CBI 04072
5	CBI 05011, CBI 05021, CBI 05031, CBI 05041, CBI 05051, CBI 05062, CBI 05072
6	CBI 06011, CBI 06021, CBI 06031, CBI 06041, CBI 06052, CBI 06062, CBI 06072
7	CBI 07011, CBI 07021, CBI 07031, CBI 07041, CBI 07052, CBI 07062, CBI 07072
8	CBI 08011, CBI 08021, CBI 08031, CBI 08042, CBI 08052, CBI 08062, CBI 08072, CBI 08082, CBI 08092
9	CBI 09011, CBI 09021, CBI 09031, CBI 09041
10	CBI 10011, CBI 10021, CBI 10032, CBI 10042

หมายเหตุ ตัวครอบสี่เทา = 19 ตัวที่นำไปทดสอบในขั้นต่อไป

การระบุชื่อไอโซเลต CBL aabbc

โดยที่ aa = ตำแหน่งตัวอย่างดินที่ 01 ถึง 10

bb = จำนวนไอโซเลตที่แยกได้ในแต่ละตัวอย่างดิน

c = เลข 1 ถึง 2 โดยที่ 1 คือการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท (เจือจางด้วยน้ำกลั่น) และ 2 คือการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท (เจือจางด้วยสารละลายฟีนอล)

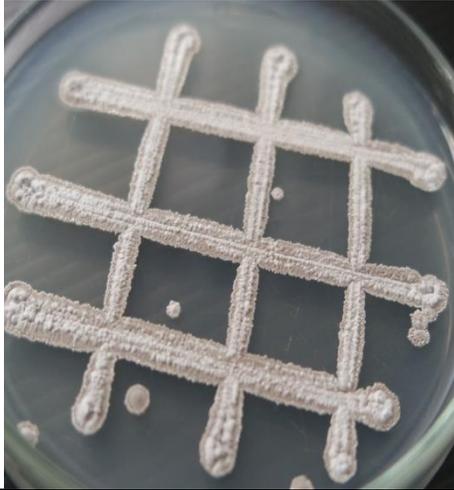
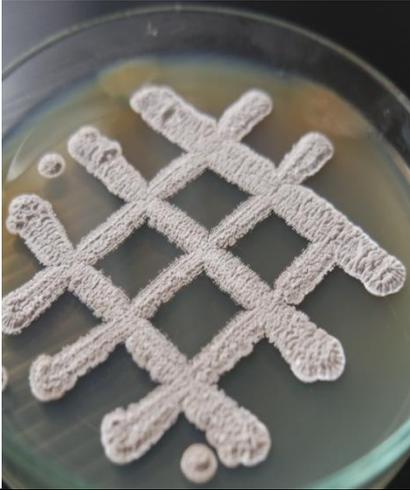
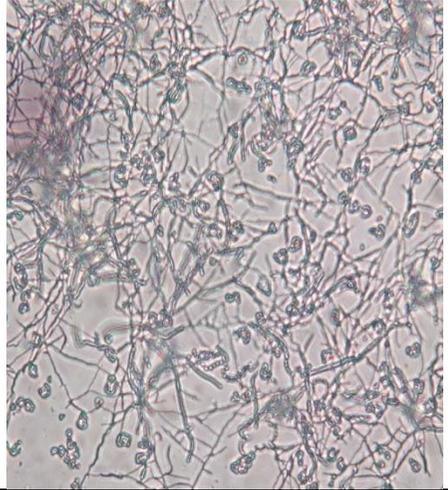
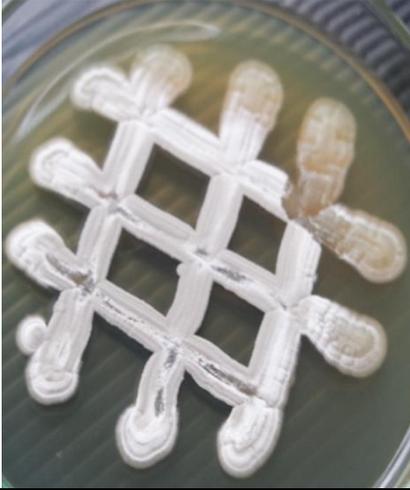
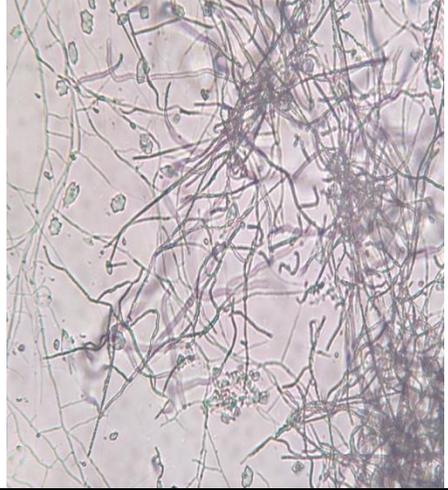
## 4.2 ลักษณะทางสัณฐานและชีวเคมีบางประการของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท

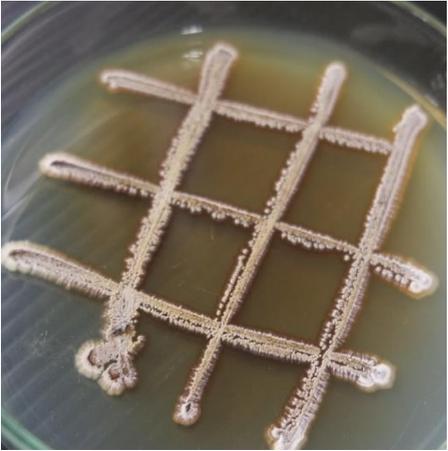
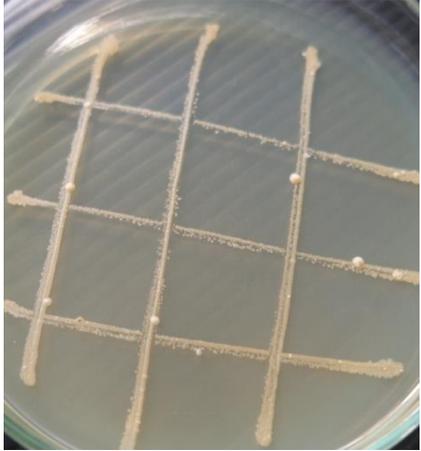
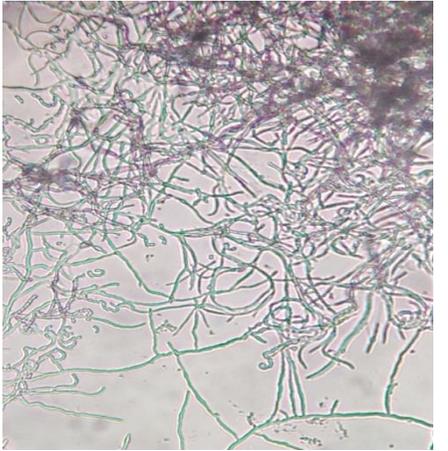
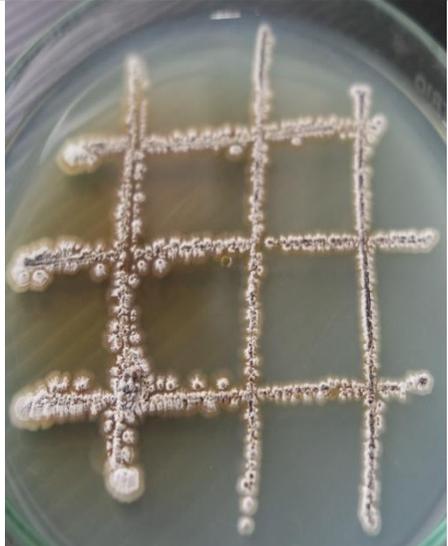
สังเกตลักษณะเด่นของเชื้อแอคติโนมัยซีทเบื้องต้นจากลักษณะของโคโลนี เส้นใยเหนือผิวอาหารและใต้อาหาร สีของเส้นใยสปอร์และรงควัตถุที่สร้างลงบนอาหาร ทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้จำนวน 19 ไอโซเลทจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดจำนวน 74 ไอโซเลท

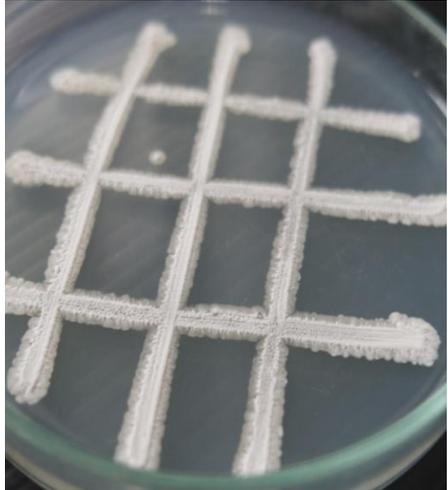
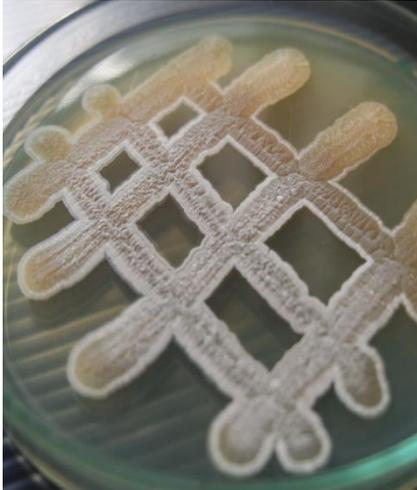
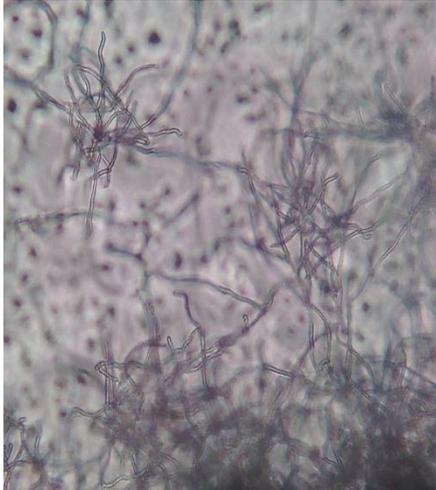
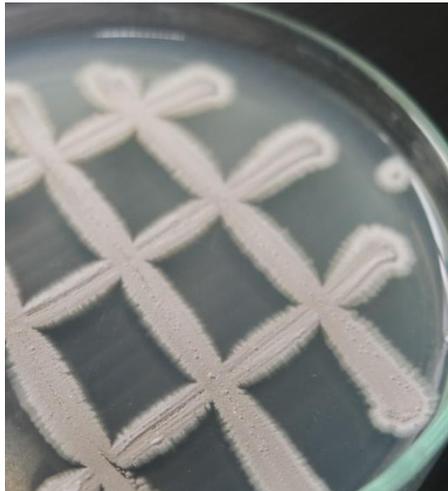
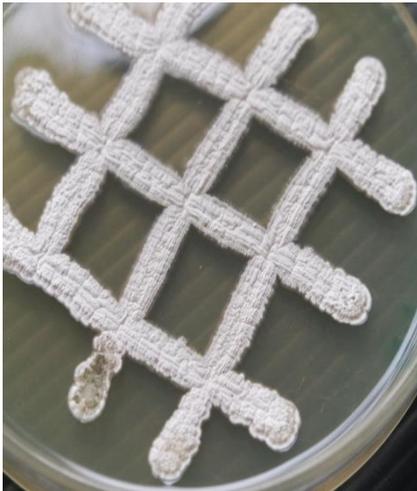
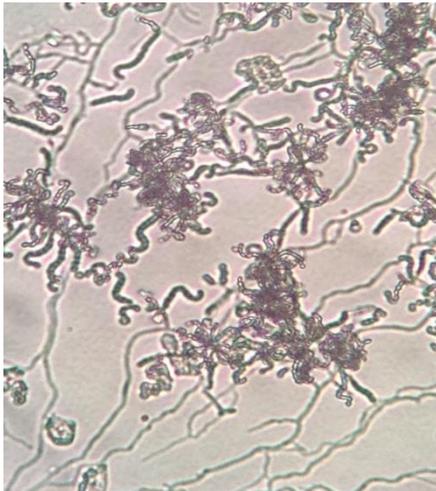
### 4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท

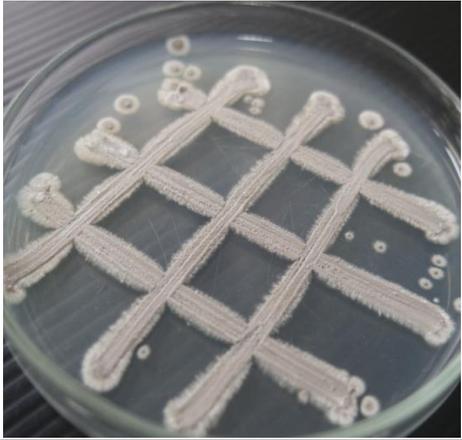
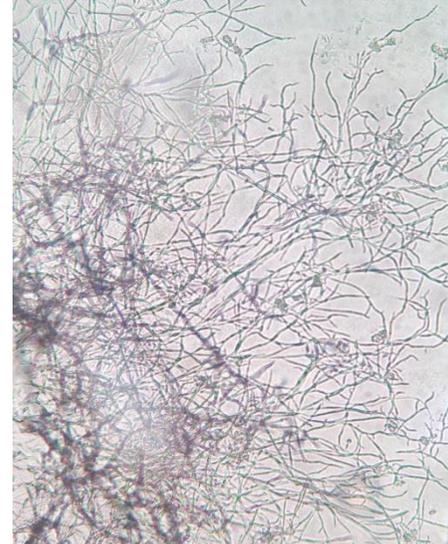
ศึกษาลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวิธีการทำ Slide culture ดังวิธีการทดลองขั้นที่3.2.1และตารางที่4.2

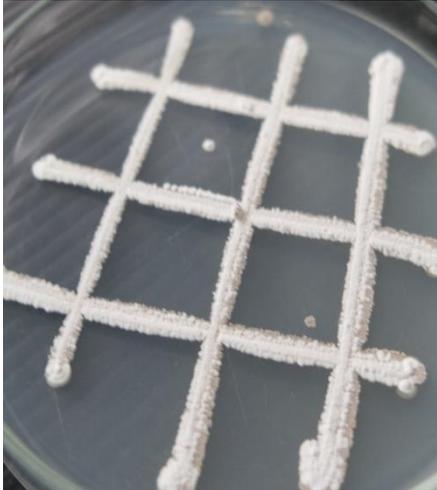
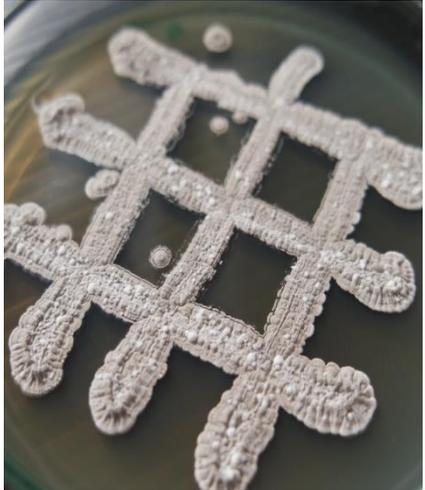
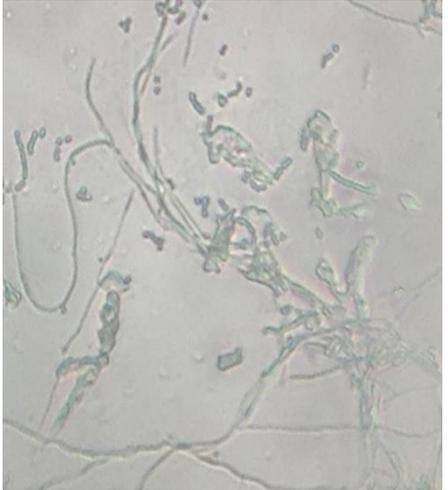
ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางกายภาพ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Starch-Casein Salt Agar (SCA) และ ISP2 และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

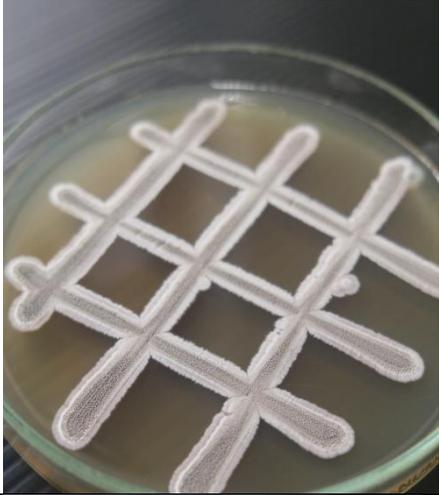
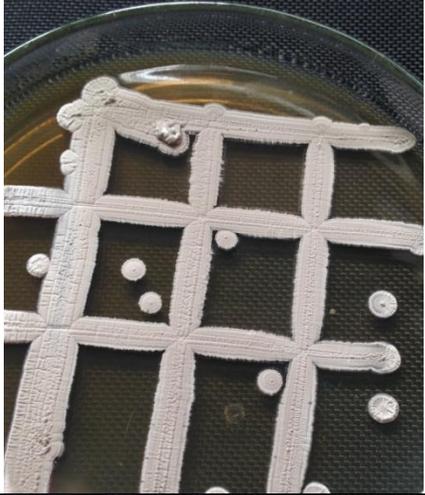
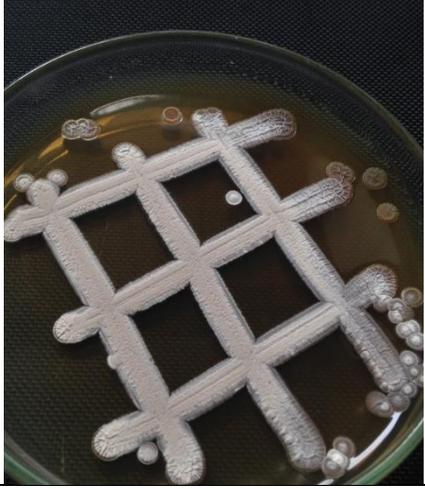
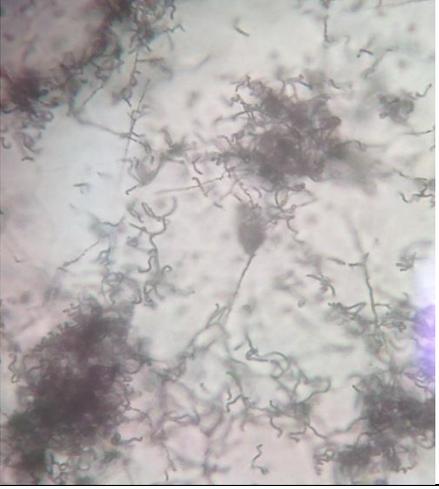
Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 01011	เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลต CBL 01011 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทาขาว สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีเทาขาว ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะขดเป็นเกลียว			
CBL 02091	เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลต CBL 02091 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทา สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีเทาขาว ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นยาวหัก			

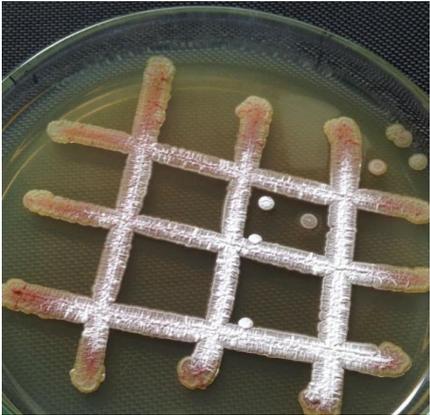
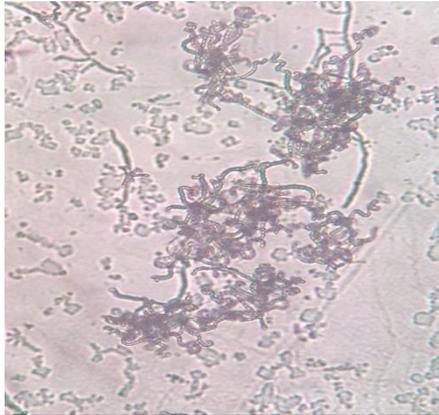
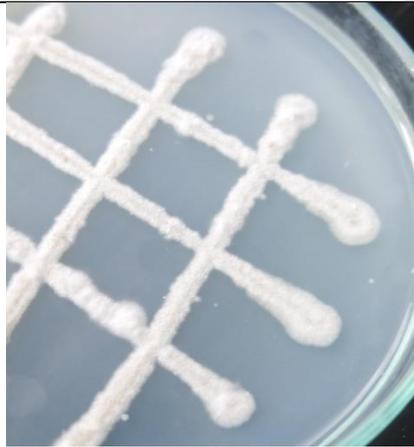
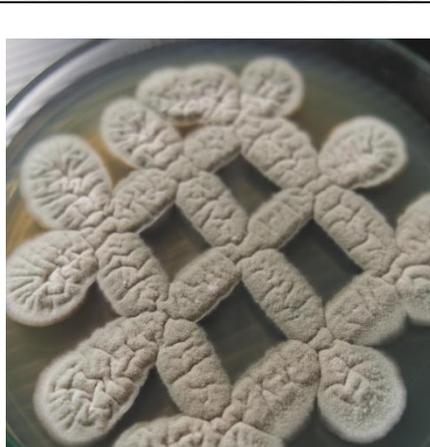
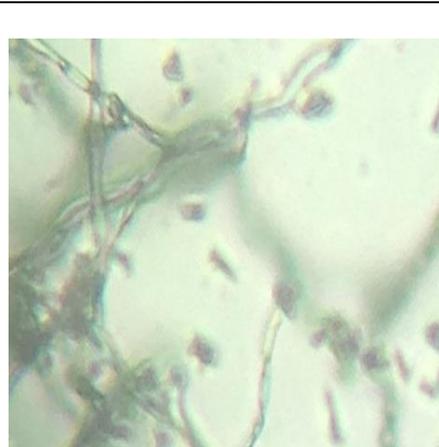
Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 03031	เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต CBL 03031 เจริญได้ดีบนอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีขาวน้ำตาล สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีน้ำตาลเข้ม สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นยาวหัก			
CBL 03071	เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต CBL 03071 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีขาวดำ สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีน้ำตาลเข้ม สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นยาวหักเป็นเกลียว			

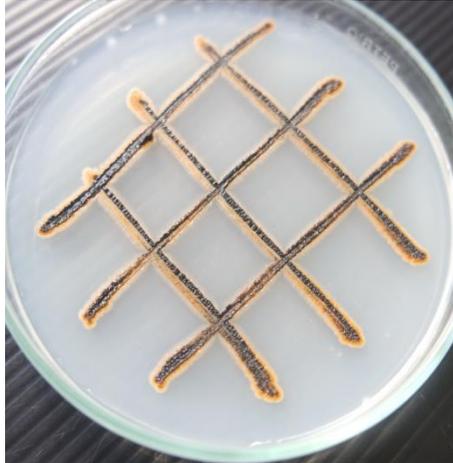
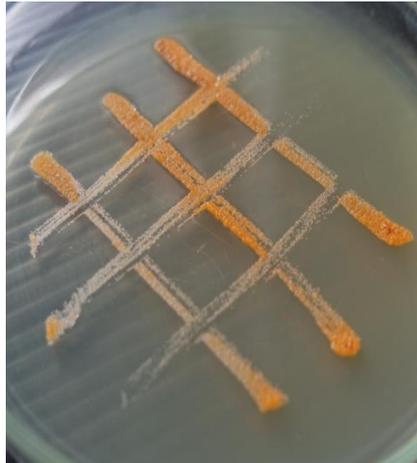
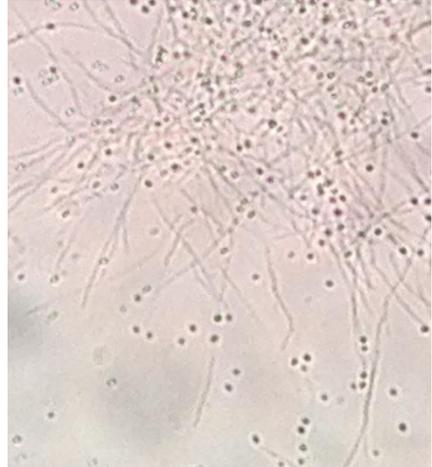
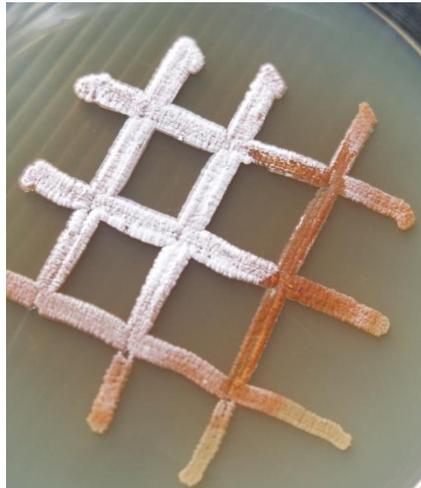
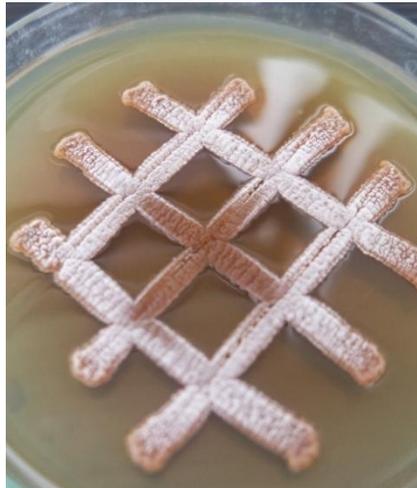
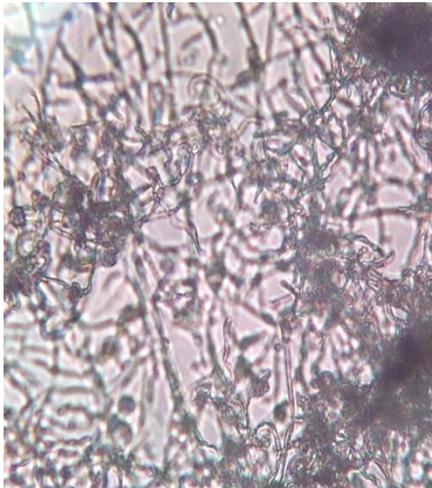
Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 03081	เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลต CBL 03081 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทาอ่อน สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีครีม ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง			
CBL 04021	เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลต CBL 04021 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายผงฝุ่น สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทาหม่น สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีครีม ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว			

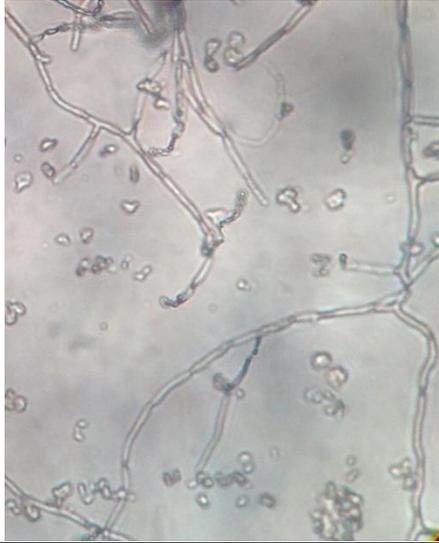
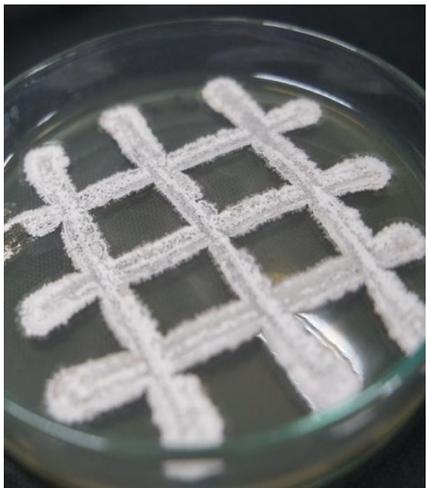
Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 04031	เชื้อแอสคิโนไมซีทไอโซเลต CBL 04031 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทา สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีครีมอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง			
CBL 04041	เชื้อแอสคิโนไมซีทไอโซเลต CBL 04041 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทาขอบขาวสร้างสารคล้ายหยดน้ำอยู่บนโคโลนี สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีเหลืองส้ม สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง			

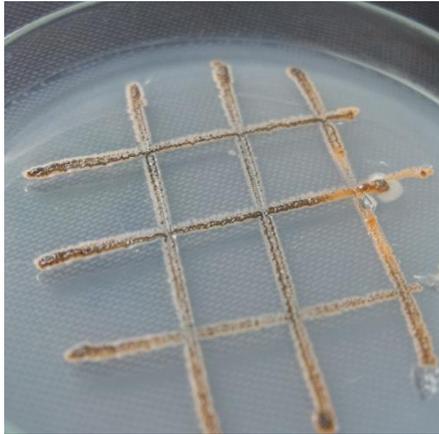
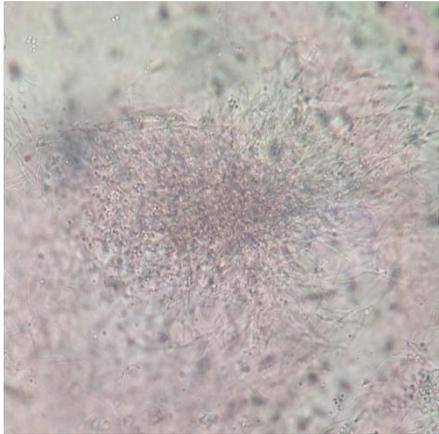
Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 04051	เชื้อแอสคิโทไมซีตาไฮโซเลต CBL 04051 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีขาว สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีเทาขาว ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง			
CBL 05051	เชื้อแอสคิโทไมซีตาไฮโซเลต CBL 05051 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะเป็นผงฟู สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทาหม่น สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีเทาครีม ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง			

Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 07052	เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลต CBL 07052 เจริญได้ดึบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะเป็นผงฝุ่น สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทาเข้มขอบเทาขาว(ไขดาว) สร้างเส้นใยอาหาร (Substate mycelium) สีเหลืองหมู สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว			
CBL 07062	เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลต CBL 07062 เจริญได้ดึบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทา(ไขดาว) สร้างสารคล้ายหยดน้ำอยู่บนโคโลนี สร้างเส้นใยอาหาร (Substate mycelium) สีเหลืองหมู สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว			

Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 07021	เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต CBL 07021 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะเป็นผงฝุ่น (ไข่น้ำ) สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเทาเข้มขอบเทาขาว สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีแดงอิฐ สร้างรงควัตถุสีเหลืองลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว			
CBL 08092	เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต CBL 8092 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเขียวหัวเปิด สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีส้มอ่อน ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง			

Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 08021	เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลต CBL 08021 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะเป็นมันวาวคล้ายหนังสัตว์ ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีดำสั้ม ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเส้นตรงยาว			
CBL 06031	เชื้อแอสคิโนมัซซีทไอโซเลต CBL 06031 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีขาว สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีสั้ม สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว			

Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 03122	เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต CBL 03122 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีเขียวขาว สร้างสารคล้ายหยดน้ำอยู่บนโคโลนี สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีเหลืองส้ม ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นสั้นๆ			
CBL 09011	เชื้อแอสคิโนมัยซีทไอโซเลต CBL 09011 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ สร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีขาวเทา สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีครีม ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรงยาว			

Isolate No.	ลักษณะทางกายภาพ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร		ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
		Starch-Casein Salt Agar (SCA)	ISP2	
CBL 06021	เชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลต CBL 06021 เจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 และอาหาร SCA โคโลนีมีลักษณะเป็นมันวาว ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีส้มดำ ไม่สร้างรงควัตถุลงบนอาหาร สปอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง			

#### 4.2.2 ชีวเคมีบางประการของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท

โดยศึกษาการตกตะกอน (Coagulation) และการย่อยสลายโปรตีน (Peptonization) ใน นํ้านม (skim milk) ศึกษาการย่อยสลายเจลาติน (Gelatin liquefaction) ศึกษาการย่อยสลายไนเตรท (Nitrate reduction) และศึกษาการย่อยสลายแป้ง (Starch hydrolysis) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ดังวิธีการทดลองที่ 3.2.2 ได้ผลดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท

หมายเลข ไอโซเลท	การย่อยสลาย โปรตีนในนํ้านม	การย่อยสลาย เจลาติน	การรีดิวซ์ ไนเตรท	การย่อยสลาย แป้ง
CBI 01011	-	-	-	+
CBI 02091	+	-	-	-
CBI 03031	+	-	+	+
CBI 03071	-	-	+	+
CBI 03081	+	+	+	+
CBI 04021	+	+	-	+
CBI 04031	+	-	-	+
CBI 04041	-	-	-	+
CBI 04051	+	+	-	+
CBI 05051	+	-	-	+
CBI 07052	-	+	+	+
CBI 07062	-	+	+	+
CBI 07021	-	+	-	+
CBI 08092	+	+	-	+
CBI 08021	+	-	-	+
CBI 06031	+	-	-	+
CBI 03122	+	+	+	+
CBI 09011	-	-	-	+
CBI 06021	+	-	-	+

หมายเหตุ + หมายถึง เกิดปฏิกิริยา  
- หมายถึง ไม่เกิดปฏิกิริยา

### 4.3 ความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลทในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2), (Control) และอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่แตกต่างกัน เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท

ผลการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2), Minimal medium plus mannitol (3MA) และอาหารเหลว Reduced arginine-strach-salts (RASS) ที่มีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนแตกต่างกันทั้งสามอาหารเหลว เมื่อทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลท โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดการทดลองที่ 1 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหารเหลว ISP2 และอาหารเหลว 3MA และชุดการทดลองที่ 2 ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหารเหลว ISP2 และอาหารเหลว RASS เพื่อเปรียบเทียบความสามารถการเจริญในอาหารแต่ละชนิด โดยวัดการเจริญด้วยการวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์การเจริญด้วยอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ) ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) และวิเคราะห์การเจริญด้วยการหาค่าลอการิทึม ดังวิธีการทดลองที่ 3.3

#### 4.3.1 การวัดการเจริญด้วยการวัดค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง การวิเคราะห์การเจริญด้วยอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate: $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time: $t_d$ )

ผลการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่คัดเลือกมาจำนวน 19 ไอโซเลทและนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อหาความสามารถในการเจริญในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2), Minimal medium plus mannitol (3MA) และอาหารเหลว Reduced arginine-strach-salts (RASS) ที่มีแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนแตกต่างกัน และวัดค่าการเจริญโดยใช้น้ำหนักแห้งของเซลล์จากตารางที่ 2(ง) ถึง 5(ง) (ภาคผนวก ง) โดยการวิเคราะห์การเจริญด้วยการหาค่าลอการิทึมซึ่งเป็นชุดการทดลองที่เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทในอาหารเหลว ISP2 และ 3MA (ชุดการทดลองที่ 1)

โดยชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญระหว่างอาหารเหลว ISP2 และ 3MA (ชุดการทดลองที่ 1) จะมีค่าที่แปรผันตรงกับการวิเคราะห์การเจริญด้วยการหาค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของแอกติโนมัยซีททั้ง 19 ไอโซเลทมีการเจริญได้ดีในอาหาร 3MAมากกว่าอาหารISP2จากค่าอัตราการเจริญ

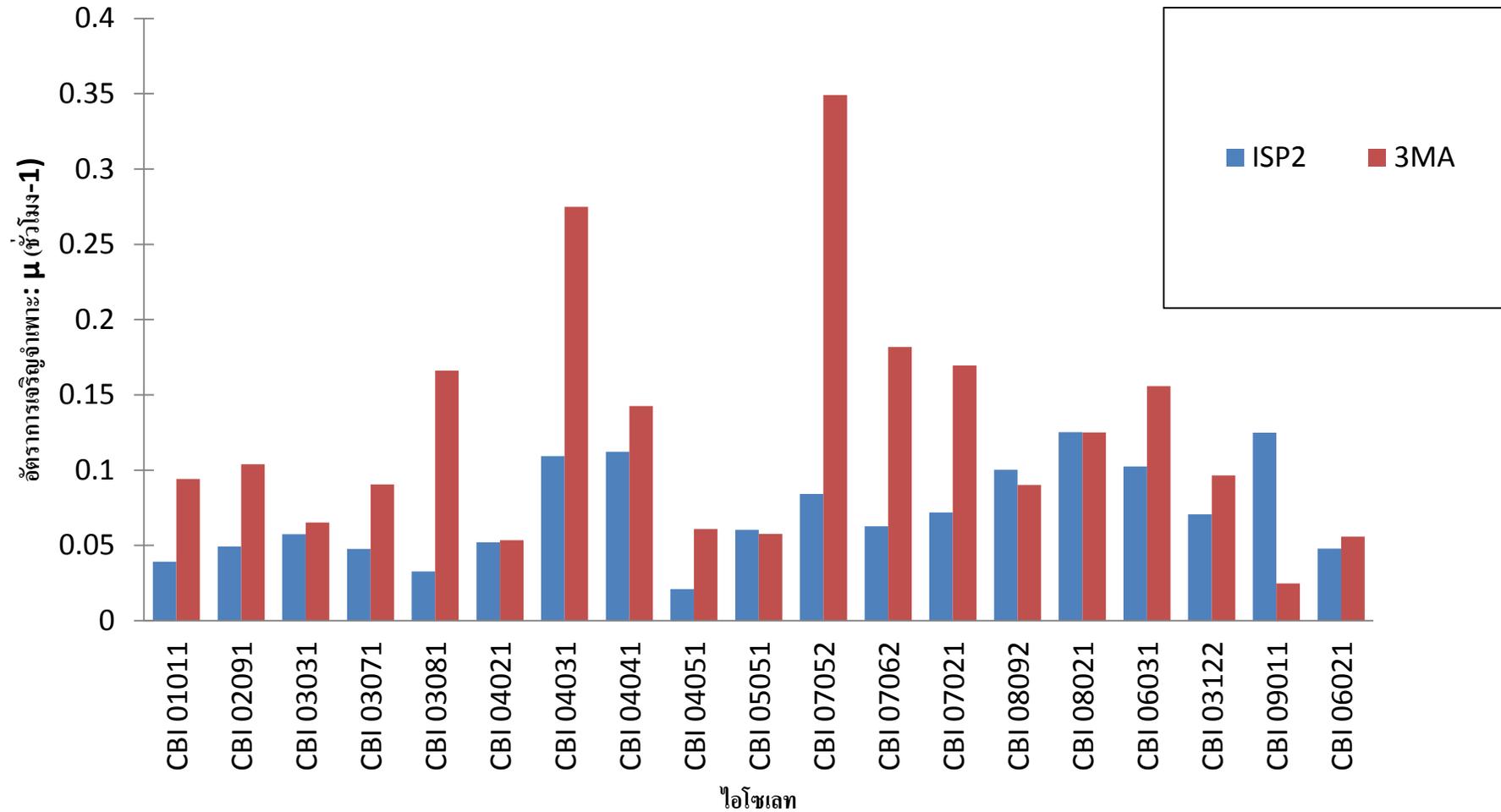
จำเพาะในตารางที่ 4.4 และ 4.5 มีเพียง 4 ไอโซเลทที่เชื้อสามารถเจริญในอาหาร ISP2 ได้ดีกว่าอาหาร 3MA ซึ่งได้แก่ เชื้อไอโซเลท CBI 05051 ที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) เท่ากับ 0.0603 ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) เท่ากับ 11.4953 ไอโซเลท CBI 08092 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) เท่ากับ 0.1003 ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) เท่ากับ 6.9133 ไอโซเลท CBI 08021 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) เท่ากับ 0.1252 ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) เท่ากับ 5.5347 และไอโซเลท CBI 09011 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) เท่ากับ 0.1249 ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) เท่ากับ 5.5497 ส่วนเชื้ออีก 15 ไอโซเลทนั้นมีความสามารถในการเจริญในอาหาร 3MA ได้ดีกว่า ISP2 เชื้อที่สามารถเจริญในอาหาร 3MA ในปริมาณมากโดยเฉพาะ ไอโซเลท CBI 07052 ซึ่งมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) สูงสุด คือ 0.3492 ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) เท่ากับ 1.9852 เชื้อไอโซเลท CBI 04031 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) เป็นอันดับ 2 คือ 0.2748 ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) เท่ากับ 2.5226 เชื้อไอโซเลท CBI 07062 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) เป็นอันดับ 3 คือ 0.1817 ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) เท่ากับ 3.8137 และเชื้อไอโซเลท CBI 03081 และ CBI 07021 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) ใกล้เคียงกัน คือ 0.1660, 4.1758 และ 0.696, 4.0879 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีท 19 ไอโซเลท จากชุดการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2), (standard)

ไอโซเลท	Range of date	Specific growth rate: $\mu$	Doubling time: $t_d$ (hr)
CBI 01011	15-24	0.0391	17.7114
CBI 02091	18-24	0.0492	14.0758
CBI 03031	15-24	0.0574	12.0847
CBI 03071	21-30	0.0477	14.5225
CBI 03081	15-30	0.0326	21.2384
CBI 04021	21-33	0.0520	13.3265
CBI 04031	15-30	0.1093	6.3425
CBI 04041	18-24	0.1122	6.1801
CBI 04051	21-30	0.0209	33.0786
CBI 05051	18-24	0.0603	11.4953
CBI 07052	18-24	0.0843	8.2265
CBI 07062	12-30	0.0627	11.0454
CBI 07021	24-36	0.0718	9.6520
CBI 08092	18-24	0.1003	6.9133
CBI 08021	18-24	0.1252	5.5347
CBI 06031	15-30	0.1024	6.7672
CBI 03122	15-24	0.0707	9.8089
CBI 09011	21-24	0.1249	5.5497
CBI 06021	21-27	0.0479	14.4565

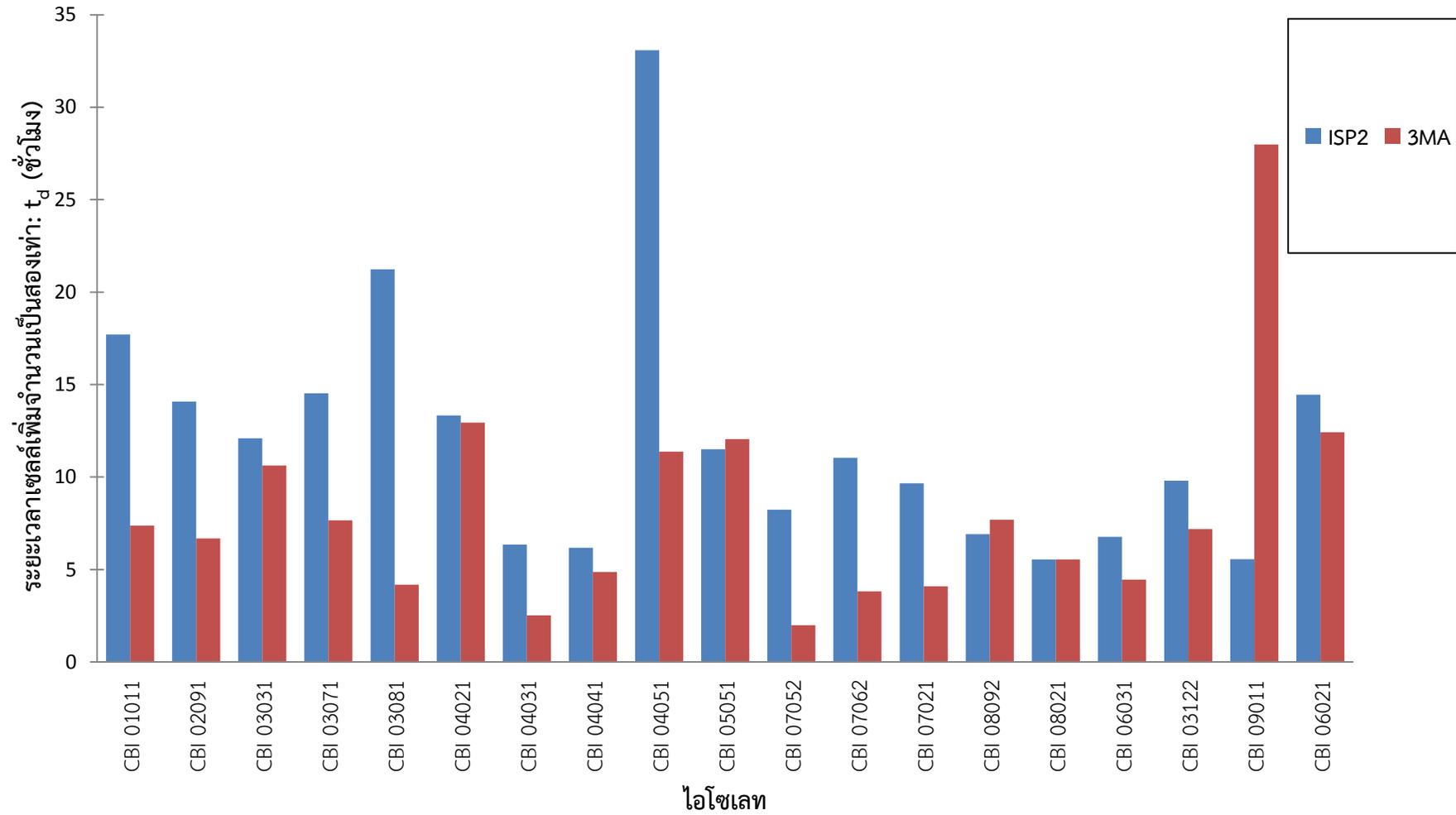
ตารางที่ 4.5 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอกติโนมัยซีท 19 ไอโซเลท จากชุดการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Minimal medium plus mannitol (3MA)

ไอโซเลท	Range of date	Specific growth rate: $\mu$	Doubling time: $t_d$ (hr)
CBI 01011	21-30	0.0941	7.3626
CBI 02091	18-30	0.1038	6.6759
CBI 03031	12-30	0.0653	10.6186
CBI 03071	21-30	0.0906	7.6540
CBI 03081	21-30	0.1660	4.1758
CBI 04021	9-18	0.0535	12.9469
CBI 04031	21-30	0.2748	2.5226
CBI 04041	18-30	0.1426	4.8593
CBI 04051	21-30	0.0609	11.3721
CBI 05051	18-27	0.0575	12.0444
CBI 07052	21-27	0.3492	1.9852
CBI 07062	21-30	0.1817	3.8137
CBI 07021	21-30	0.1696	4.0879
CBI 08092	21-30	0.0901	7.6928
CBI 08021	21-30	0.1250	5.5455
CBI 06031	30-36	0.1558	4.4486
CBI 03122	21-30	0.0964	7.1863
CBI 09011	18-30	0.0248	27.9822
CBI 06021	21-30	0.0558	12.4246



รูปที่ 4.2 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ) ของเชื้อแอสคิโนไมซีตา 19 ไอโซเลท ชุดการทดลองที่ 1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว

International *Streptomyces* Project (ISP2) และอาหารเหลว Minimal medium plus mannitol (3MA)



รูปที่ 4.3 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท ชุดการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) และอาหารเหลว Minimal medium plus mannitol (3MA)

จากการวิเคราะห์การเจริญด้วยการหาค่าลอการิทึม เป็นชุดการทดลองที่เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว ISP2 และ RASS (ชุดการทดลองที่ 2) แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) ดังตารางที่ 4.6 และ 4.7 ซึ่งเป็นค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และค่าระยะเวลาเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์จากชุดการทดลองที่ 2

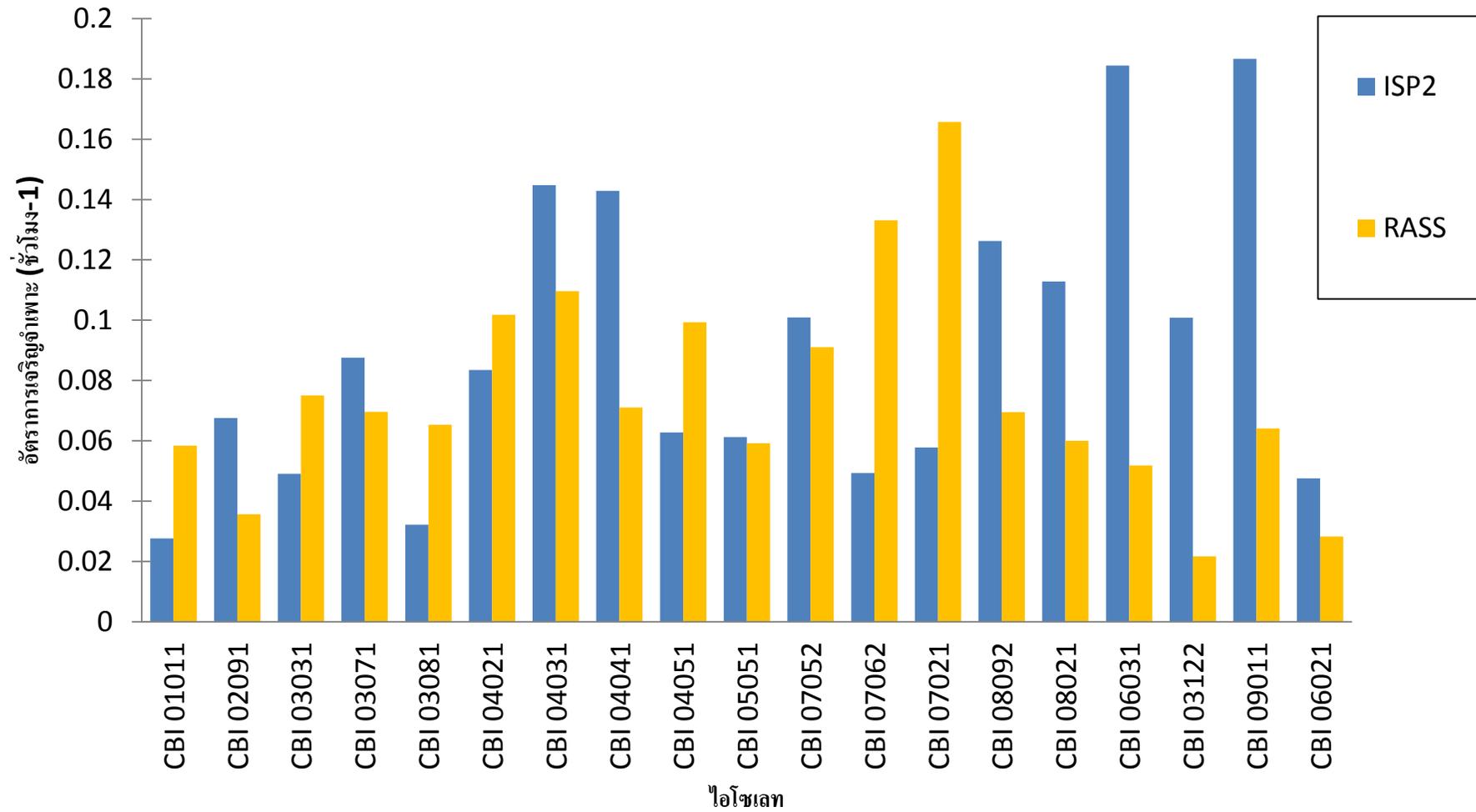
การทดลองชุดที่ 2 โดยการเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว ISP2 และอาหารเหลว RASS (ชุดการทดลองที่ 2) จะมีค่าที่แปรผันตรงกับผลการวิเคราะห์การเจริญด้วยการหาค่าลอการิทึม พบว่าแนวโน้มการเจริญของเชื้อ 19 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว ISP2 มากกว่า RASS จากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) ในตารางที่ 4.6 และ 4.7 เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลว ISP2 ถึง 12 ไอโซเลท โดยเชื้อที่เจริญได้มากที่สุด คือเชื้อไอโซเลท CBI 09011 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) สูงสุดถึง 0.1866 ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) เท่ากับ 3.7136 และไอโซเลท CBI 06031 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ใกล้เคียงกันหรือเป็นอันดับ 2 คือ 0.1844 ค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) เท่ากับ 3.7588 ไอโซเลท CBI 04031 และ CBI 04041 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) ใกล้เคียงกันเป็นอันดับที่ 3 คือ 0.1448, 4.7867 และ 0.1429, 4.8503 ตามลำดับ และยังมีไอโซเลท CBI 02091, CBI 03071, CBI 05051, CBI 07052, CBI 08092, CBI 08021, CBI 03122 และ CBI 06021 ที่สามารถเจริญในอาหาร ISP2 ได้ดีกว่า ซึ่งในไอโซเลทที่พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลว RASS มากกว่า ISP2 นั้นมีการเจริญได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือไม่แตกต่างจาก ISP2 มากนัก ดูได้จากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ในตารางที่ 4.5 แต่ก็มีเชื้อที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว RASS มากกว่า ISP2 อย่างเห็นได้ชัดคือเชื้อไอโซเลท CBI 07021 และ CBI 07062 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และค่าระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ( $t_d$ ) คือ 0.1658, 4.1814 และ 0.1331, 5.2083 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสโคดีโนมัยซีท 19 ไอโซเลท จากชุดการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2), (standard)

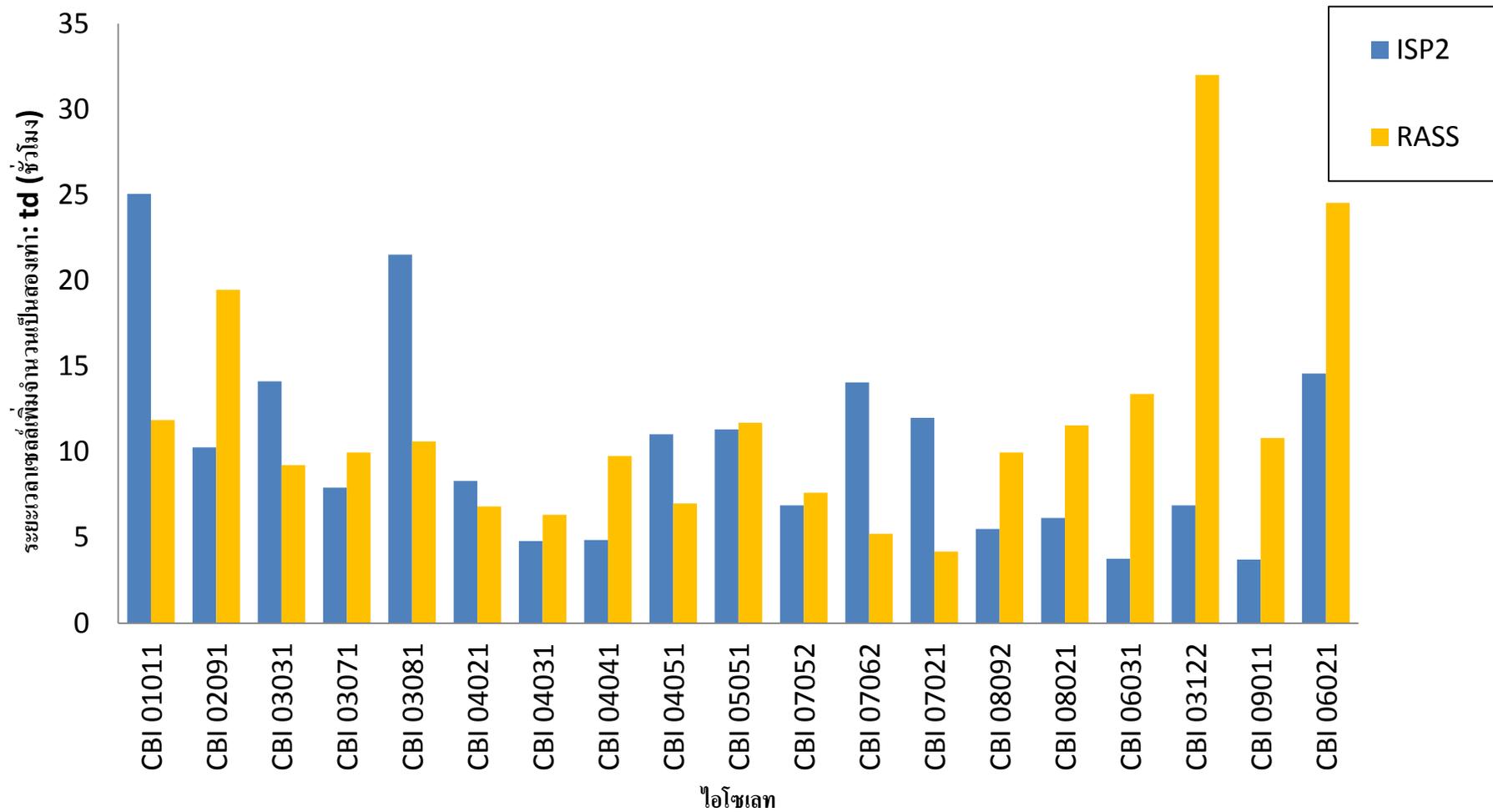
ไอโซเลท	Range of date	Specific growth rate: $\mu$	Doubling time: $t_d$ (hr)
CBI 01011	15-24	0.0277	25.0640
CBI 02091	18-24	0.0676	10.2571
CBI 03031	9-24	0.0491	14.1205
CBI 03071	15-24	0.0876	7.9121
CBI 03081	15-36	0.0322	21.5218
CBI 04021	18-33	0.0835	8.2994
CBI 04031	12-24	0.1448	4.7867
CBI 04041	18-24	0.1429	4.8503
CBI 04051	12-24	0.0628	11.0349
CBI 05051	15-24	0.0612	11.3182
CBI 07052	15-24	0.1009	6.8684
CBI 07062	15-36	0.0493	14.0580
CBI 07021	18-36	0.0578	11.9904
CBI 08092	18-24	0.1263	5.4889
CBI 08021	15-24	0.1129	6.1406
CBI 06031	15-24	0.1844	3.7588
CBI 03122	15-24	0.1008	6.8738
CBI 09011	18-24	0.1866	3.7136
CBI 06021	9-24	0.0476	14.5667

ตารางที่ 4.7 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ) และค่าระยะเวลาเซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ที่คำนวณจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท จากชุดการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Reduced arginine-starch-salts (RASS)

ไอโซเลท	Range of date	Specific growth rate: $\mu$	Doubling time: $t_d$ (hr)
CBI 01011	18-24	0.0584	11.8603
CBI 02091	15-27	0.0356	19.4593
CBI 03031	12-24	0.0751	9.2339
CBI 03071	15-24	0.0696	9.9581
CBI 03081	9-24	0.0654	10.6004
CBI 04021	18-24	0.1018	6.8077
CBI 04031	18-24	0.1097	6.3199
CBI 04041	18-24	0.0710	9.7607
CBI 04051	15-24	0.0993	6.9794
CBI 05051	15-24	0.0592	11.6976
CBI 07052	18-24	0.0911	7.6094
CBI 07062	18-24	0.1331	5.2083
CBI 07021	18-24	0.1658	4.1814
CBI 08092	15-24	0.0695	9.9701
CBI 08021	18-24	0.0600	11.5524
CBI 06031	18-24	0.0518	13.3791
CBI 03122	12-24	0.0217	31.9966
CBI 09011	18-24	0.0641	10.8066
CBI 06021	12-24	0.0282	24.5380



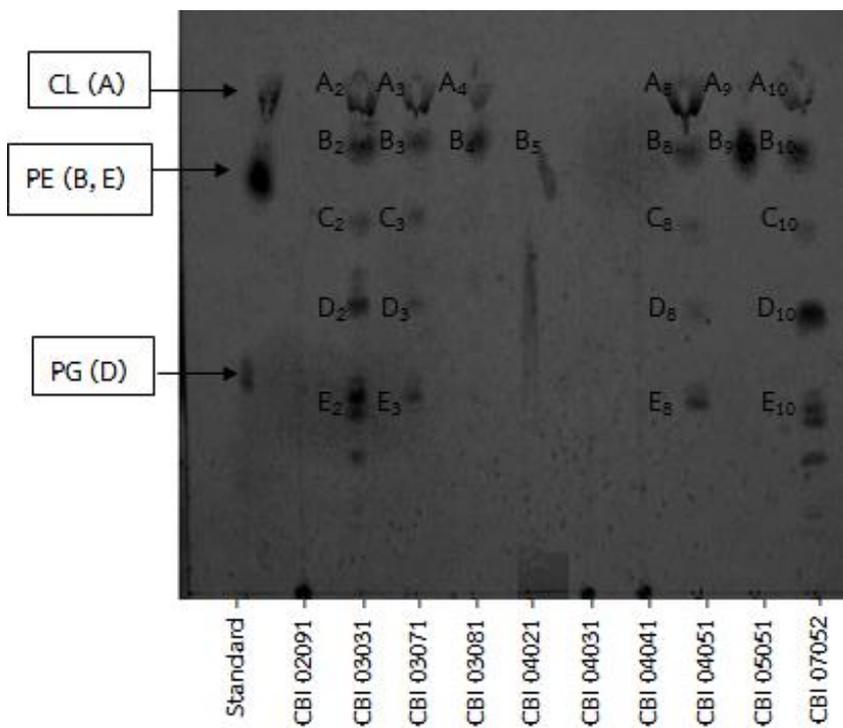
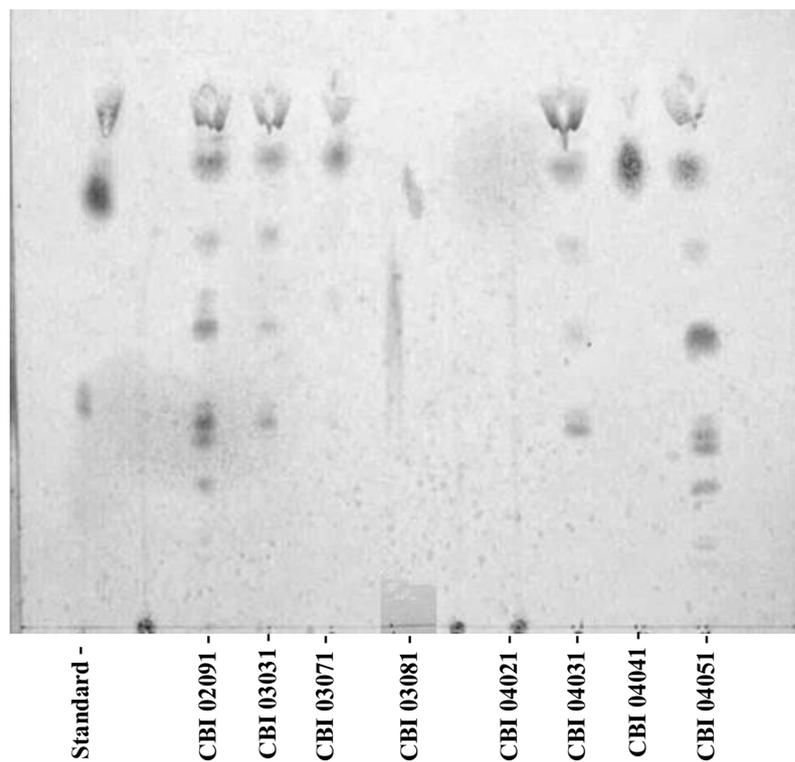
รูปที่ 4.4 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate:  $\mu$ ) ของเชื้อแอสคิตินมัยซีท 19 ไอโซเลท ชุดการทดลองที่ 2 ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) และอาหารเหลว Reduced arginine-starch-salts (RASS)



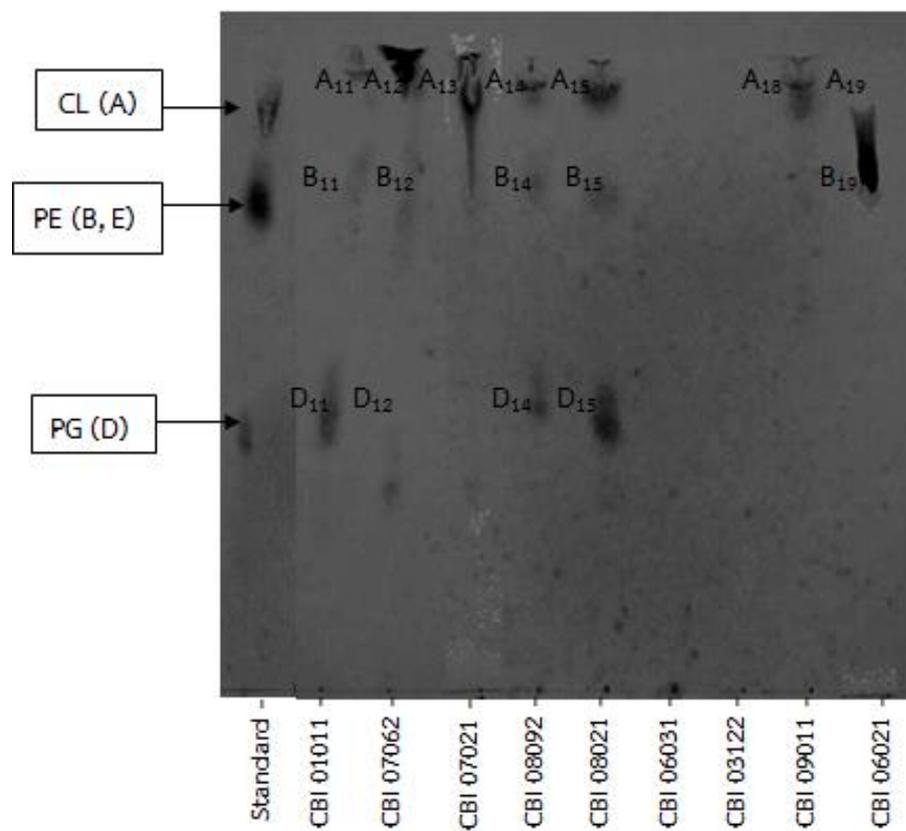
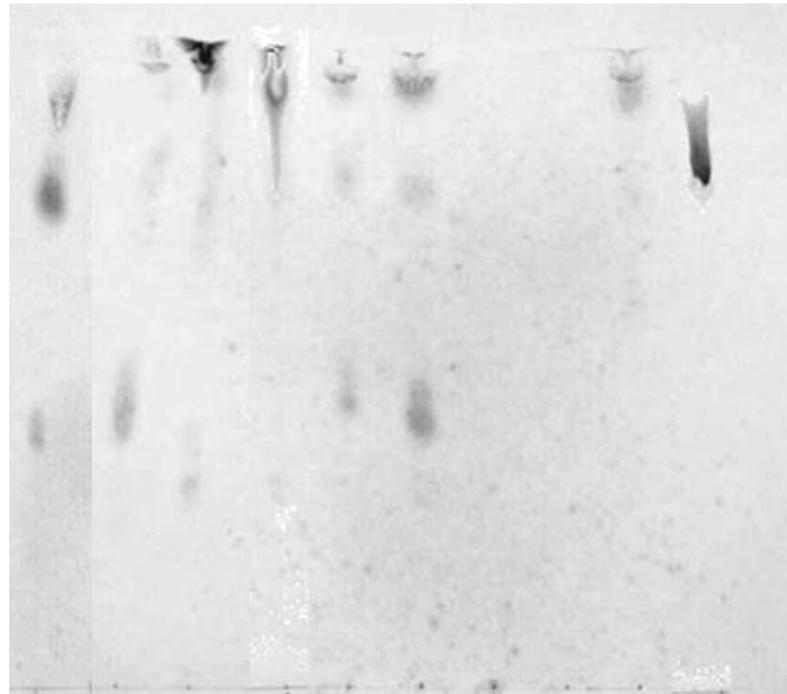
รูปที่ 4.5 แสดงระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling time:  $t_d$ ) ของเชื้อแอคทีโนมัยซีท 19 ไอโซเลต ชุดการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) และอาหารเหลว Reduced arginine-starch-salts (RASS)

#### 4.4 การสกัดฟอสโฟลิปิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท

ฟอสโฟลิปิดมักพบเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (รัชฎา, 2544) โครงสร้างของลิปิดชนิดนี้ประกอบด้วยสองส่วน ส่วนแรกเป็นส่วนที่มีขั้ว (polar) ได้แก่ บริเวณที่มีหมู่ฟอสเฟตและหมู่แอลกอฮอล์ ซึ่งหมู่ฟอสเฟตของฟอสโฟลิปิดมีความเป็นขั้วมาก (polar) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (non-polar) คือส่วนที่เป็นสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมัน ดังนั้น โมเลกุลของฟอสโฟลิปิดจึงมีลักษณะเป็นแอมฟิพาธิค (amphipathic) ที่สามารถรวมตัวได้กับน้ำและสารที่ไม่มีขั้ว (มนตรี และคณะ, 2542) จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถที่จะแยกได้โดยใช้ Thin-layer chromatography (TLC) และคำนวณหาอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ หรือค่า Rf (rate of flow) ของฟอสโฟลิปิดที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท ดังรูปที่ 4.6 และรูปที่ 4.7 phospholipids standard ที่ใช้มี 3 ชนิด ได้แก่ L- $\alpha$ -Phosphatidyl-DL-glycerol sodium salt (PG), 3-sn-Phosphatidylethanolamine (PE) และ Cardiolipin sodium salt (CL) เมื่อทิ้งให้สารละลายตัวพาวิ่งขึ้นไปประมาณ 4 ใน 5 แล้วนำมาคำนวณหาค่า Rf และเปรียบเทียบกับ รูปที่ 2.3 ที่เป็นการวิเคราะห์ TLC ของ phospholipids standard ช่วง mid- log phase ของ *S. coelicolor* M145 พบว่า CL มีค่า Rf มากที่สุด คือ 0.8940 ตามด้วย PE ที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.7616 และ phospholipids standard ที่มีค่า Rf น้อยที่สุดคือ PG ซึ่งเท่ากับ 0.3974 เมื่อเปรียบเทียบค่า Rf ของ phospholipids standard กับฟอสโฟลิปิดที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลท พบการสร้างลิปิดชนิด 4 ชนิด ได้แก่ชนิด A=CL, B=PE, C=unknown, D=PG และ E=PE ผลจากการวิเคราะห์ TLC พบฟอสโฟลิปิด 14 ไอโซเลท ซึ่งพบไอโซเลทที่สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดทั้ง 5 ชนิดจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท CBI 03031, CBI 03071, CBI 04051 และ CBI 07052 จากจำนวนไอโซเลทที่พบฟอสโฟลิปิดนั้นพบว่าเกือบทุกไอโซเลทสามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด A ได้ ยกเว้นไอโซเลท CBI 04021 ที่พบเพียงฟอสโฟลิปิดชนิด B และจากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่พบฟอสโฟลิปิดนี้พบฟอสโฟลิปิดชนิด B 12 ไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลท CBI07021 และ CBI 09011 ที่ไม่พบ พบลิปิดชนิด D 8 ไอโซเลทและพบฟอสโฟลิปิดชนิด E 5 ไอโซเลทจากไอโซเลทที่พบฟอสโฟลิปิดทั้งหมด นอกจากนั้นเชื้อบางไอโซเลทก็ยังสามารถสร้างลิปิดชนิด unknown อีกด้วย



รูปที่ 4.6 การวิเคราะห์ TLC ของ phospholipids stand และฟอสโฟลิปิดที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของ เชื้อแอกติโนมัยซีท โดยที่ A= CL, B= PE, C= unknown, D= PG และ E= PE



รูปที่ 4.7 การวิเคราะห์ TLC ของ phospholipids stand และฟอสโฟลิปิดที่สกัดได้จากผนังเซลล์ของ เชื้อแอกติโนมัยซีท โดยที่ A= CL, B= PE, C= unknown, D= PG และ E= PE

#### 4.5 การหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดิน

ทำการหาสมบัติทางกายภาพบางประการของตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน ต.คลองตำหรุ อ.เมือง จ.ชลบุรี 10 ตำแหน่ง โดยทำการหาค่าน้ำหนักดิน ตัวอย่าง ค่าปริมาณความชื้น และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ดังวิธีการทดลองที่ 3.1.3 ได้ผลดังตารางที่ 4.8 ถึงตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.8 ค่าน้ำหนักดินตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

ตำแหน่งดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)	ตำแหน่งดิน	น้ำหนักดิน (กรัม)
1	0.4071	6	0.4593
2	0.3943	7	0.4441
3	0.5002	8	0.4475
4	0.4252	9	0.4443
5	0.5481	10	0.4381

ตารางที่ 4.9 ค่าปริมาณความชื้นในดินตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีท

ตำแหน่งดิน	ปริมาณความชื้น (%)	ตำแหน่งดิน	ปริมาณความชื้น (%)
1	47.1464	6	48.3811
2	44.5415	7	50.9057
3	40.8782	8	52.6087
4	46.0632	9	51.5605
5	41.5891	10	47.9503

ตารางที่ 4.10 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ในดินตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

ตำแหน่งดิน	ครั้งที่ 1 (pH)	ครั้งที่ 2 (pH)	ครั้งที่ 3 (pH)	ค่าเฉลี่ยความเป็นกรดต่าง (pH)
1	8.08	8.05	8.06	8.06
2	7.58	7.37	7.32	7.42
3	7.15	7.00	6.96	7.03
4	6.91	6.92	6.94	6.92
5	7.43	7.45	7.48	7.45
6	7.31	7.29	7.30	7.30
7	8.15	8.13	8.11	8.13
8	7.72	7.69	7.66	7.69
9	7.96	8.06	8.05	8.02
10	7.51	7.49	7.49	7.49

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาและทำการคัดแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทจากดินบริเวณแหล่งดินศูนย์ศึกษาธรรมชาติป่าชายเลน ต.คลองตำหรุ จ.ชลบุรี สามารถคัดแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทได้ทั้งหมดจำนวน 74 ไอโซเลทและทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเด่นจำนวน 19 ไอโซเลทมาทำการทดสอบหาความสามารถของการเจริญในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยใช้อาหาร ISP2 ซึ่งเป็นอาหารชนิด enrichment media ที่เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงแอสกีโนมัยซีทของ International *Streptomyces* Project เป็นตัวเปรียบเทียบกับอาหารซึ่งเป็นอาหารชนิด defined media ได้แก่ อาหาร 3MA ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่างออกไปคือ D-mannitol และอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างออกไปคืออาหาร RASS ซึ่งมีการลดปริมาณ arginine ลงจากสูตรปกติ

ผลปรากฏว่าในชุดการทดลองที่ 1 เชื้อแอสกีโนมัยซีทมีแนวโน้มการเจริญในอาหาร 3MA ได้สูงกว่าอาหาร ISP2 ถึง 15 ไอโซเลทจาก 19 ไอโซเลท มีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่เชื้อแอสกีโนมัยซีทสามารถเจริญได้ใน ISP2 สูงกว่าและมี 1 ไอโซเลทที่เจริญได้เท่ากันทั้งสองอาหาร (รูปที่ 4.2) ส่วนในชุดการทดลองที่ 2 พบว่าแอสกีโนมัยซีทมีแนวโน้มในการเจริญในอาหาร ISP2 ได้สูงกว่าอาหาร RASS จำนวน 12 ไอโซเลท แต่อัตราการเจริญในอาหารสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันไม่มากนัก มีเพียง 7 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ใน ISP2 สูงกว่าอย่างชัดเจนและมีเพียง 4 ไอโซเลทที่สามารถเจริญในอาหาร RASS สูงกว่าอาหาร ISP2 (รูปที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่าอาหาร RASS ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ต่างออกไปและมีการลดปริมาณของ arginine ลงนั้น แอสกีโนมัยซีทมีแนวโน้มในการเจริญได้ดีกว่า ISP2 แต่ก็ไม่ได้แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นจากผลการทดลองทั้ง 2 ชุดแสดงให้เห็นว่าอาหาร 3MA ที่มีการเติม D-mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นอาหารที่แอสกีโนมัยซีทเจริญได้ดีจึงเป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแอสกีโนมัยซีทอีกชนิดหนึ่ง ส่วนอาหาร RASS ก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการใช้เพาะเลี้ยงแอสกีโนมัยซีทเช่นเดียวกันถึงแม้แอสกีโนมัยซีทจะเจริญได้ดีกว่า ISP2 แต่ก็ไม่มากนัก

นอกจากนั้นผลการวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดพบว่าจากแอสกีโนมัยซีทจำนวน 19 ไอโซเลทพบฟอสโฟลิปิด 14 ไอโซเลท ซึ่งพบไอโซเลทที่สามารถสร้างฟอสโฟลิปิดได้ 4 ชนิดจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CBI 03031, CBI 03071, CBI 04051 และ CBI 07057 จากจำนวนไอโซเลทที่พบฟอสโฟลิปิดนั้นพบว่าเกือบทุกไอโซเลทสามารถสร้างฟอสโฟลิปิดชนิด A ได้ ยกเว้นไอโซเล

CBI 04021 ที่พบเพียงฟอสโฟลิปิดชนิด B<sub>4</sub> และพบฟอสโฟลิปิดชนิด B 12 ไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลท CBI 09011 และไอโซเลท CBI 09011 ที่ไม่พบ พบลิปิดชนิด D 8 ไอโซเลทและพบฟอสโฟลิปิดชนิด E 5 ไอโซเลทซึ่งเป็นจุดจางๆ เนื่องจากฟอสโฟลิปิดชนิด E นี้เป็นสาร intermediate ที่ใช้ในการเปลี่ยนไปเป็นฟอสโฟลิปิดชนิด A หรือ cardiolipin นั่นเอง

### ข้อเสนอแนะ

แอสคิตินัมยีสที่สามารวจริญได้ดีทั้งในอาหาร 3MA และ RASS ซึ่งเป็นอาหารที่มีการใช้ D-mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ arginine เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน ดังงานวิจัยของ Thakur *et al*, 2009 ที่ทำการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยกำหนดสภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกันในแต่ละอาหาร ได้แก่ ขนาดหัวเชื้อ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และการบ่ม ที่อาจจะส่งผลต่อปริมาณการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptomyces* sp. 201 รวมทั้งการสร้างสารปฏิชีวนะอีกด้วย ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะต่างๆ ที่แตกต่างกันมีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อดังกล่าว ชนิดของคาร์บอน ไนโตรเจน หรือแหล่งฟอสเฟตและธาตุที่ได้รับรายงานจะมีอิทธิพลต่อ *Streptomyces* ในการผลิตยาปฏิชีวนะ และยังพิสูจน์ให้เห็นว่าขนาดของหัวเชื้ออาจจะเป็นปัจจัยสำคัญในการหมักเชื้ออีกด้วย การเจริญเติบโตและยาปฏิชีวนะที่ผลิตได้โดยขนาดของหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. 201 พบว่าจะเจริญเติบโตได้ดี โดยส่วนใหญ่ได้รับอิทธิพลจากสารอาหารที่เติมลงไปในการอาหารและปริมาณที่เหมาะสม

Raytapadar และ Pual รายงานว่าการผลิตสูงสุดของยาปฏิชีวนะที่ด้านรา IDA-28 โดย *S. aburavirensis* ขึ้นอยู่กับสภาวะของอาหารที่ดีที่สุด พวกเขาได้พบว่าการเสริมของอาหารด้วยการเติม casein hydrolysate ทำให้ทั้งการเจริญเติบโตและการสร้างสารปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นการหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนทดแทนจึงเป็นทางเลือกในการช่วยลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงในระดับที่ใหญ่ขึ้น เช่น ระดับอุตสาหกรรมที่ต้องให้ถังหมักขนาดใหญ่และต้องเติมสารอาหารประเภท enrichment media ในปริมาณมากๆ ทำให้มีต้นทุนสูง แต่ถ้าเราเลือกใช้อาหารที่สามารถหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนทดแทนดังเช่นอาหาร 3MA และ RASS ก็จะสามารถช่วยลดต้นทุนได้ในปริมาณมาก

จากผลการทดลองครั้งนี้ยังพบว่ามีแอสคิตินัมยีสที่สามารวจริญได้ดีในอาหาร 3MA และ RASS หลายไอโซเลทสามารถสร้างฟอสโฟลิปิดที่สำคัญเช่น cardiolipin ซึ่งมีส่วนช่วยในการแบ่ง

เซลล์ของแอกติโนมายซีท ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ และถ้าไอโซเลทเหล่านี้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ด้วยก็จะช่วยเพิ่มปริมาณของสารปฏิชีวนะอีกด้วย ถือเป็นไอโซเลทที่น่าสนใจที่สามารถนำมาทำการทดลองในขั้นต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- เกษม ชเนศวรสรรค์, ฉัฐวรรณ อยู่ตะออ และ ชเนศ สุริยะรังสี. 2552. การคัดกรองเชื้อแอคติโนมัย  
 สัตว์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชจากดิน. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิตสถาบัน  
 เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- งามนิจ นนทโส. 2537. การแยกเชื้อสเตรปโตมัยส์จากดิน. มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะ  
 วิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา.
- ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา, น้ำฝน ป้อมทอง, จริญญา เจตนะจิตร, พัชรี สุนทรนัน และ วิเชียร กิจ  
 ปรีชานิช. 2546. เชื้อแอคติโนมัยส์จากดินป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัย  
 สัตว์ป่าเขานางรำเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. รายงานการประชุมวิชาการของ  
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 สาขาวิทยาศาสตร์สาขาการจัดการทรัพยากรและ  
 สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. 2546. แอคติโนมัยส์ที่หายากในดินจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกกราชและ  
 สถานีวิจัยพืชไร่สุวรรณวจากกลกิจ จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย. วิทยานิพนธ์  
 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง  
 เฮ้าส์.
- มนตรี จุฬาวัดนทล, ชัยณัฐร สวัสดิวัฒน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด โกमार  
 ทัด, พิณทิพ รื่นวงษา, ชีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สมนยานนท์, สุมาลี ตั้งประดับกุล และ  
 มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. 2542. ชิวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีวเคมี คณะ  
 วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- รัชฎา แก่นสาร. 2544. ชิวเคมี. นนทบุรี: โครงการสวัสดิการวิชาการ สถาบันพระบรมราชชนก.
- รัชนี มิ่งมา. 2552. แอคติโนมัยส์จากรากและดินรอบรากพืชตระกูลถั่วและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อ  
 โรคพืช. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา  
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัตนา สุดตา และ รุ่งอรุณ งามพงศ์พรรณ. การคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยส์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต  
 ของข้าวที่แยกจากเนื้อเยื่อและจากพื้นผิวดินข้าว. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิตสถาบัน  
 เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- รัตนภรณ์ ศรีวิบูล. 2548. แอคติโนมัยส์. ชลบุรี: สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

- วิวัฒน์ นันบัญญัติ และ เอกภพ สกกุลกิจกาญจน์. 2549. การตรวจสอบลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากป่าชายเลน. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิตสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วิโรจน์ กนกศิลป์ธรรม. 2549. *วิทยาแบคทีเรีย*. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากรพระราชวังสนามจันทร์.
- สนิท อักษรแก้ว. 2542. ป่าชายเลน นิเวศวิทยาและการจัดการ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สายพิน ไชยนันท์. 2547. *จุลินทรีย์ดิน*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- อากัสสรา ชมิดท์. 2543. *ชีวเคมี*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. 2nd ed. Wiley & Sons, New York.
- Alexander, M. 1991. *Introduction to Soil Microbiology*. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida.
- Alongi DM, Christoffersen P, Tirendi F. 1993. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. *J Exp Mar Biol Ecol* 171, 201-223.
- Amoroso, M.J., G.R. Castro, G.A. Durán, O. Peraud, G. Oliver and R.T. Hill. 2001. Chromium accumulation by two *Streptomyces* spp. isolated from riverine sediments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 210-215.
- Augustinus, P. G. E. F. 1995. Geomorphology and sedimentology of mangroves. In: Perillo G.M.E. (ed.), *Geomorphology and Sedimentology of Estuaries*. Developments in Sedimentology 53. Amsterdam: Elsevier Science.
- Bandaranayake, W.M. 1998. Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and Salt Marshes* 2, 133-148.
- Benimeli, C.S., M.S. Fuentes, C.M. Abate and M.J. Amoroso. 2008. Bioremediation of lindanecontaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61, 233-239.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics* (Tokyo) 58, 1-26.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Order Actinomycetales, pp. 657-861. In S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin and R.Y. Stanier, eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

- Carlsohn, M.R., I. Groth, G.Y.A. Tan, B. Schütze, H.P. Saluz, T. Munder, J. Yang, J. Wink and M. Goodfellow. 2007. *Amycolatopsis saalfeldensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a medieval alum slate mine. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 57, 1640-1646.
- Carlton, J. M. 1974. Land-building and stabilization by mangroves. *Environmental Conservation* 1(4), 285-294.
- Castillo U., Harper JK., Strobel GA., Sears J., Alesi K., Ford E., Lin J., Hunter M., Maranta M, Ge H., Yaver D., Jensen JB., Porter H., Robison R., Millar D., Hess WM., Condrón M., Teplov D. 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol.* 224(2), 183-90.
- Castillo, M.A., N. Felis, P. Arago, G. Cuesta and C. Sabater. 2006. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 58, 196-202.
- Celso R. Denser Pamboukian; Luciana M. Guimarães; Maria Cândida R. Facciotti. 2002. Applications of image analysis in the Characterization of *Streptomyces olindensis* in Submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology.* vol. 33 no.1
- Colquhoun, J.A., J. Mexson, M. Goodfellow, A.C. Ward, K. Horikoshi and A.T. Bull. 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek* 74, 27-40.
- Couch, J.N. 1963. Some new genera and species of the *Actinoplanaceae*. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* 79, 53-70.
- Cross, T. and Goodfellow M. 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. In *Actinomycetales*, 76. Edited by Sykes, G, and Skinner F.A. London: Academic Press.
- Cui, L., G. Du, D. Zhan and J. Chen. 2008. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. *Bioresour. Technol.* 99, 3794-3800.
- Davis, G.H.G. 1959. The classification of certain filamentous bacteria with respect to their Chemical composition. *Journal of General Microbiology.* 21, 612-621.
- Dias ACF, Andreote FD, Dini-Andreote F, Lacava PT, Sa ALB, Melo IS, Azevedo JL, Araujo WL. 2009. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. *World J Microbiol Biotechnol* 25(7), 1305–1311.
- Eccleston GP, Brooks PR, Kurtböke DI. 2008. The occurrence of bioactive micromonosporae in aquatic habitats of the Sunshine Coast in Australia. *Mar Drugs* 6, 243–261.

- El-Naggar, M.Y., S.A. El-Assar and S.M. Abdul-Gawad. 2006. Meroparamycin production by newly isolated *Streptomyces* sp. strain MAR01: taxonomy, fermentation, purification and structural elucidation. *J. Microbiol.* 44, 432-438.
- El-Tarabily, K.A.; Soliman, M.H.; Nassar, A.H. AlHassani H.A., Sivasithamparam, K., McKenna, F. and St. J. Hardy G.E. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol.* 49, 573-83
- El-Tarabily, K.A. 2006. Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can. J. Bot.* 84, 211-222.
- El-Tarabily KA. 2008. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant and Soil* 308, 161-174.
- E. Stahl, Ed., 1965. *Thin Layer Chromatography*, Springer-Verlage, Berlin.
- Ewel, K.C., R.R Twilley, and J. E. Ong. 1998. Different kinds of mangrove forests provide different goods and services. *Global Ecology and Biogeography Letters* 7, 83-94.
- Germaine, K et al. 2006. Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 302-310.
- Gesheva, V. 2002. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. *Eur. J. Soil Biol.* 38, 85-88.
- González, I., A. Ayuso-Sacido, A. Anderson and O. Genilloud. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 401-415.
- Goodfellow and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 189-216.
- Goodfellow, M. and Simpson, K.E. 1987. Ecology of streptomycetes. *Frontiers in Applied Microbiology* 2, 97-125.
- Gupta N, Sahoo D, Basak UC. 2010. Evaluation of in vitro solubilization potential of phosphate solubilising *Streptomyces* isolated from phyllosphere of *Heritiera fomes* (mangrove). *Afr J Microbiol Res* 4(3), 136–142.
- Hayakawa, M., Kenya Ishizawa, and Hideo Nonomura. (1998). Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils. *J. Ferment. Technol.* 66, 4, 367-373.

- Hirsch, P., U. Mevs, R.M. Kroppenstedt, P. Schumann and E. Stackebrandt. 2004. Cryptoendolithic actinomycetes from antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* jensen 1932. **Syst. Appl. Microbiol.** 27, 166-174.
- Holt *et al.* 1994. *Bergey's of determinative bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Li J, Yao XC, Goodfellow M, Ruan JS. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar Drugs* 7, 24–44.
- Hrudayanath Thatoi, Bikash Chandra Behera, Rashmi Ranjan Mishra and Sushil Kumar Dutta. 2012. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Ann Microbiol.* Springer-Verlag and the University of Milan.
- Huang H, Lv J, Hu Y, Fang Z, Zhang K, Bao S. 2008. *Micromonospora rifamycinica* sp. nov, a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 17–20.
- Janssen, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719-1728.
- Jarerat, A. and Y. Tokiwa. 2001. Degradation of poly (tetramethylene succinate) by thermophilic actinomycetes. *Biotechnol. Lett.* 23, 647-651.
- J.E. Meinhard and N.F. Hall, 1949. *Anal. Chem.*, 21, 185.
- Jiang, C.L. and L.H. Xu. 1996. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Appl. Microbiol.* 62, 249-253.
- Jones, C.R. and D.A. Samac. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces* *Biol. Control.* 7, 196-204.
- Jun Tab Bae, Jong Pil Park, Chi Hyun Song, Choon Bal Yu, Moon Ki Park, And Jong Won Yun. 2001. Effect of Carbon Source on the Mycelial Growth and Exo-Biopolymer Production by Submerged Culture of *Paecilomyces japonica*. *Journal Of Bioscience and Bioengineering* Vol. 91, No. 5, 522-524.
- Kalakoutsii, L.V. 1989. Genus *Intsrasporangium Kalakoutslii*, Kirillova and Krassil'nikov. S.T. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, MD. 4, 2395-2397.
- Khanungkan Klanbut. 2013. The role of phospholipids in the growth and development of *Streptomyces*. Ph.D in Microbiology (SIPBS). University of Strathclyde, Glasgow, UK., 50-51.

- Kathiresan K., Bingham BL. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Adv Mar Biol* 40, 81–251.
- Kathiresan K. 2003. How do mangrove forests induce sedimentation. *Rev Biol Trop* 51, 355–360.
- Kawamoto, I. 1989. Genus *Micromonospora*, pp. 2442-2450. In S.T. Williams, M.S. Sharpe and J.G. Holt (eds.) *Bergey's manual of determinative bacteria*. Vol 4. Williams and Wilkin, Baltimore, USA.
- Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Method in microbiology*. 19, 161-207.
- Korn-Wendisch, F., Kempf, A., Grund, E., Kroppenstedt, R.M. and Kutzner, H.J. 1989. Transfer of *Faenia rectevirgula* Kurup and Agre 1983 to the genus *Sacharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, elevation of *Sacharopolyspora hirsute* subsp. *taberi* Labeda 1987 to species level, and emended description of the genus *Saccharopolyspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39, 430-441.
- Kozo Ochi. 1987. Changes in Nucleotide Pools during Sporulation of *Streptomyces griseus* in Submerged Culture. *Journal of General Microbiology*. 133, 2787-2795.
- Kraynak, J., & Tetrault, K.W. 2003. *The Complete Idiot's Guide to The Oceans*. Penguin Group (USA) Inc.
- Laksmanaperumalsamy P, Chandramohan D, Natarajan R. 1978. Antibacterial and antifungal activity of *streptomycetes* from Porto Novo coastal environment. *Mar Biol* 11, 15–24.
- Lechevalier, H.A.; Lecheralier, M.P.; & Gerber N.N. 1971. Chemical composition as criterion the classification of actinomycetes. *Advances in Applied Microbiology* 14, 47-72.
- Lin YC, Wu XY, Feng S, Jiang GC, Luo JH, Zhou SN, Vrijmoed LLP, Jones EBG, Krohn K, Steingröver K, Zsila F. 2001. Five unique compounds: xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea coast. *J Org Chem* 66, 6252–6256
- Lui, J., Barrt, E.C., Besra, S.G., and Nikaïdo. H. 1996. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *Journal of Biological Chemistry*. 271, 29545-29551.
- Maitra, P.K. and S.C. Roy. 1960. Trace elements and the synthesis of vitamin B12 by *Streptomyces olivaceus*. *Biochem. J.* 75, 483-487.
- Maria GL, Sridha KR, Raviraja NS. 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove fungi of south west coast of India. *J Agric Technol* 1, 67–80.
- McCarthy, A.J.; & Williams, S.T. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment a review. *Gene* 115, 189-192.

- Mitra A, Santra SC, Mukherjee J. 2008. Distribution of actinomycetes and antagonistic behaviour with the physico-chemical characteristics of the world's largest tidal mangrove forest. *Appl Microbiol Biotechnol* 80, 685–695.
- Miyadoh S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. *Actinomycetologica* 9, 100-106.
- Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. Asakura Publishing Co., Ltd. Japan.
- N.A. Izamailov and M.S. Shraiber, 1938. *Farmatsiya*, 3, 1.
- Nathan A. Magarvey, Jessica M. Keller, Valerie Bernan, Martin Dworkin and David H. Sherman. 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Applied and Environmental microbiology*. p. 7520–7529.
- Ninawe, S., M. Kapoor and R.C. Kuhad. 2008. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresour. Technol.* 99, 1252-1258.
- Odum, W.E. and C.C. McIvor. 1990. Mangroves. Pp. 517-548. In *Ecosystems of Florida*, R. L. Myers and J. J. Ewel (eds.). University of Central Florida Press.
- Parales, R.E., J.E. Adamus, N. White and H.D. May. 1994. Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4527-4530.
- Pathom-aree, W., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T. and Goodfellow, M. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from the Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* 10, 181-189.
- Petrolini, B. S., Quaroni, S., Sardi, P., Saracchi, M. and Andriollo, N. A. 1993. A sporangiate actinomycetes with unusual morphological features: *Streptosporangium claviforme* sp. nov. *Actinomycetes* 3, 45-50.
- Polti, M.A., M.J. Amoroso and C.M. Abate. 2007. Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. *Chemosphere* 67, 660-667.
- Prabahar, V., S. Dube, G.S.N. Reddy and S. Shivaji. 2004. *Pseudonocardia Antarctica* sp. nov. an actinomycetes from McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 66-71.
- Raytapadar S, Paul AK. Production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces aburavirensis* IDA-28. *Microbiol Res* 2001;155, 315—23.

- Reh fuss, M. and J. Urban. 2005. *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 695-701.
- R. WAGNER *et al.* 2003. Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum*, *Food Technol. Biotechnol.* Current Techniques for the Cultivation of *Ganoderma lucidum* for the Production of Biomass, Ganoderic Acid and Polysaccharides 41 (4), 371–382.
- Sahu MK, Sivakumar K, Thangaradjou T, Kannan L. 2007. Phosphate solubilizing actinomycetes in the estuarine environment: an inventory. *J Environ Biol* 28, 795–798.
- Samac and L.L. Kinkel. 2001. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. *Pl. Soil* 235, 35-44.
- Sen N., Naskar K. 2003. Algal flora of Sundarbans Mangal. Daya, New Delhi.
- Sette, L.D., V.M. de Oliveira and G.P. Manfio. 2005. Isolation and characterization ofalachlorodegrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 87, 81-89.
- Shih, H.D., Y.C. Liu, F.L. Hsu, V. Mulabagal, R. Dodda and J.W. Huang. 2003. Fungichromin: A substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory Effects on *Rhizoctonia solani*. *J. Agric. Food Chem.* 51, 95-99.
- Sivakumar K. 2001. Actinomycetes of an Indian mangrove (Pichavaram). Environment. PhD thesis, Annamalai Universit.
- Sivakumar K, Sahu MK, Thangaradjou T, Kannan L. 2007. Research on marine Actinobacteria in India. *Ind J Microbiol* 47, 186–196.
- Stamford, T.L.M., N.P. Stamford, L.C.B.B. Coelho and J.M. Araújo. 2002. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresour. Technol.* 83, 105-109.
- Steinbüchel A, Fuchtenbusch B. 1998. Bacteria and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol* 16, 419–427.
- Strzelczyk, E. and U. Leniarska. 1985. Production of B-group vitamins by mycorrhizal fungi and actinomycetes isolated from the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Pl. Soil* 86, 387-394.
- Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.T., Zuberer, E. 1998. Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, London. 550 p.

- Thakur D., Bora T.C., Bordoloi G.N., Mazumdar S. 2009. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *Journal de Mycologie Médicale*. 19, 161-167.
- Thatoi HN, Biswal AK. 2008. Mangroves of Orissa coast: floral diversity and conservation status. *Special habitats and threatened plants of India. ENVIS Wild Life And Protected Area* 11 (1), 201–207.
- Thiemann, J.E. 1967. A new species of the Genus *Amorphosporangium* isolate from Italian soil. *Mycopathol.* 33, 233-240.
- Touchstone, Joseph C. 1992. **Practice of thin layer chromatography**. 3<sup>rd</sup> ed. Canada.
- Tuncer, M., A.S. Ball, A. Rob and M.T. Wilson. 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 38-47.
- Vobis, G. 1986. Spore development in sporangia-forming actinomycetes. In: Szabo, G., biro, S. and Goodfellow, M. (eds.) *Biological, Biochemical and Biomedical aspects of Actinomycetes*. Akademiai Kiado, Budapest, 443-452.
- Vobis, G. 1997. Morphology of actinomycetes. *In Atlas of Actinomycetes*. (edited by Miyadoh, Hamada, Hotta, Kudo, Seino, Vobis and Yokota). Asakura Publishing, Tokyo pp. 180-191.
- Waksman, S.A. 1959. *The Actinomycetes Vol. I: Natuer, Occurrence and Activities*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 327 p.
- Waksman SA (1961). *The Actinomycetes, Classification, Identification and Description of Genera and Species*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company. Vol. 2 pp. 61-292.
- Waksman, S.A. and Henrici. 1974. Streptomycetaceae, pp. 747-753. *In* R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. *Bergey's manual of Determinative bacteriology*. 8<sup>th</sup> ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Williams, S. T., Sharples, G. P. 1976. *Streptosporangium corrugatum* sp. nov., an actinomycete with some unusual morphological features. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Vol 26, 45-52.
- Williams, S.T. and E.M.H. Wellington. 1982. Actinomycetes, *In* A.L. Page, R.H. Miller and O.R. Keency, eds. *Method of Soil Analysis part 2, Chemical and Microbiological Properties*. 2<sup>nd</sup> ed. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison. pp. 969-987.

- Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G. 1989. Genus *Streptomyces*, pp. 2452-2492. In S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.). Bergey's manual of determinative bacteria. Vol 4. Williams and Wilkin, Baltimore, USA.
- Xiao, K., D.A. Samac and L.L. Kinkel. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. Biol. Control. 23, 285-295.
- Xie XC, Mei WL, Zhao YX, Hong K, Dai HF. 2006. A new degraded sesquiterpene from marine actinomycete *Streptomyces* sp. 0616208. Chin Chem Lett 17, 1463–1465.
- Yakimov MM, Abraham WR, Meyer H, Laura G, Golyshin PN. 1999. Structural characterisation of lichenycin. A component by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. Biochem Biophys Acta 1438, 230–280.
- Yamada, Y. 1998. Identification of isoprenoid quinone homologs in the classification of bacteria. tentative program for workshop on isolate and identification of actinomycetes, National Science and Technology Development Agency, Bangkok, Thailand. March 16-19.
- Yamaguchi, T. 1965. Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct Actinomycetes. *Journal of Bacteriology*. 89, 445-453.
- Yañez-Arancibia, A., A. L. Lara-Domínguez, J.L. Rojas-Galaviz, P. Sánchez-Gil, J.W. Day and C.J. Madden. 1988. Seasonal biomass and diversity of estuarine fishes coupled with tropical habitat heterogeneity (southern Gulf of Mexico). *Journal of Fisheries Biology* 33, 191-200.
- Zheng, Z., W. Zeng, Y. Huang, Z. Yang, J. Li, H. Cai and W. Su. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol. Lett.* 188, 87-91.

**ภาคผนวก**

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media)

สูตรอาหารแต่ละชนิดต่อไปนี้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร อาหารส่วนใหญ่หนึ่งมาเชื้อ โดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### Starch – Casein agar (SCA)

Soluble starch	10.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
Casein	0.3	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.0-7.2		

#### Soya bean flour mannitol agar

Soya bean flour	20.0	กรัม
Mannitol	20.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
pH 7.0-7.2		

หมายเหตุ: หนึ่งมาเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำร้อน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

#### Hickey Tresner agar (HT)

Soluble starch	2.0	กรัม
Peptone	0.4	กรัม
Beef extract	0.2	กรัม
Yeast extract	0.2	กรัม
Agar	15	กรัม
pH 7.2		

**International *Streptomyces* Project agar, ISP medium no.2**

Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
pH 7.0 – 7.3		

**Skim milk agar**

Skim milk powder	28.0	กรัม
Casein enzyme hydrolysate	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

**Bouillon gelatin broth**

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Malt extract	5.0	กรัม
Gelatin	150.0	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

**Peptone KNO<sub>3</sub> broth**

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	1.0	กรัม
pH 7.0 – 7.2		

**Inorganic salts starch agar, ISP medium no.4**

Soluble starch	10.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
pH 7.0 – 7.4		
Trace salts solution		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

**Minimal medium plus mannitol (3MA)**

L-asparagine	0.5	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
Agar	10.0	กรัม
pH 7.2		

หมายเหตุ: เติม D-mannitol 10.0 กรัม หลังนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้ความดันไอน้ำร้อน

**Reduced arginine-starch-salts (RASS)**

Arginine	0.1	กรัม
Soluble starch	12.5	กรัม
$K_2HPO_4$	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
pH 7.0		

## ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1(ข) ลักษณะสีฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้

ลำดับ	ไอโซเลต	การเจริญ <sup>a</sup>	สีของโคโลนีด้านบน <sup>b</sup>	สีของโคโลนีด้านล่าง <sup>c</sup>	รงควัตถุ <sup>d</sup>
1	CBI 01021	ดี	สีเขียวอมน้ำเงิน (Brilliant Bluish Green, #009B76)	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	-
2	CBI 01031	ดี	สีเหลืองอมเทา (Grayish Yellow , #CEA262)	สีน้ำตาลอมแดงเข้ม (Strong Reddish Brown, #7F180D)	น้ำตาลแดง
3	CBI 01041	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเขียวอมเหลืองสว่างมาก (Very Light Yellowish Green, #C6DF90)	-
4	CBI 01052	ดี	สีเขียวเข้ม (Dark Green, #203A27)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Light Yellow Green, #DCD36A)	-
5	CBI 02011	ดี	สีเทาเข้ม (Dark Gray, #49423D)	สีเหลืองอมเขียวเข้ม Strong Greenish Yellow, #CCA817)	-
6	CBI 02021	ดี	สีม่วงอมเทา (Grayish Violet, #46394B)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Light Yellow Green, #DCD36A)	-
7	CBI 02031	ปานกลาง	สีเขียวอมน้ำเงิน (Brilliant Bluish Green, #009B76)	สีเหลืองอมเขียว (Brilliant Greenish Yellow, #FFDC33)	-
8	CBI 02041	ดี	สีเขียวปนเหลืองเข้ม (Dark Olive Green, #232C16)	สีเขียวซีดมาก (Very Pale Green, #D8DEBA)	-

ลำดับ	ไอโซเลต	การเจริญ <sup>a</sup>	สีของโคโลนีด้านบน <sup>b</sup>	สีของโคโลนีด้านล่าง <sup>c</sup>	รงควัตถุ <sup>d</sup>
9	CBI 02051	ดี	สีน้ำเงินอมเขียวสว่าง (Brilliant Greenish Blue, #2A8D9C)	สีขาวอมเหลือง (Yellowish White, #FFE2B7)	-
10	CBI 02061	ดี	สีน้ำเงินอมเขียวสว่าง (Brilliant Greenish Blue, #2A8D9C)	สีขาวอมเหลือง (Yellowish White, #FFE2B7)	-
11	CBI 02071	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเขียวอมเหลืองสว่างมาก (Very Light Yellowish Green, #C6DF90)	-
12	CBI 02081	ดี	สีเขียวปนเหลืองเข้ม (Dark Olive Green, #232C16)	สีเขียวซีดมาก (Very Pale Green, #D8DEBA)	-
13	CBI 02101	ดี	สีเขียวปนเหลืองเข้ม (Dark Olive Green, #232C16)	สีเขียวซีดมาก (Very Pale Green, #D8DEBA)	-
14	CBI 02112	ดี	สีเขียวปนเหลืองเข้ม (Dark Olive Green, #232C16)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Brilliant Yellowish Green, #8CCB5E)	เหลือง
15	CBI 02122	ดี	สีเขียวปนเหลืองเข้ม (Dark Olive Green, #232C16)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Brilliant Yellowish Green, #8CCB5E)	-
16	CBI 03011	ดี	สีน้ำเงินอมม่วงเข้ม (Dark Purplish Blue, #1A162A)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	เหลืองเข้ม
17	CBI 03021	ปานกลาง	สีขาว (White, #FFC9D7)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Light Yellow Green, #DCD36A)	-
18	CBI 03041	ดี	สีน้ำเงินอมม่วงเข้ม (Dark Purplish Blue, #1A162A)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	เหลืองเข้ม

ลำดับ	ไอโซเลต	การเจริญ <sup>a</sup>	สีของโคโลนีด้านบน <sup>b</sup>	สีของโคโลนีด้านล่าง <sup>c</sup>	รงควัตถุ <sup>d</sup>
19	CBI 03051	ดี	สีเขียวเข้ม (Dark Green, #203A27)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Vivid Yellowish Green, #93AA00)	-
20	CBI 03061	ดี	สีเขียวปนเหลืองเข้ม (Dark Olive Green, #232C16)	สีเทาเข้ม (Dark Gray, #49423D)	-
21	CBI 03092	ดี	สีเทาน้ำเงินซีด (Pale Blue, #919192)	สีเทาน้ำเงินซีด (Pale Blue, #919192)	-
22	CBI 03102	ดี	สีเหลืองอมเทา (Grayish Yellow, #CEA262)	สีเหลืองส้มเข้ม (Dark Orange Yellow, #C37629)	-
23	CBI 03112	ดี	สีขาวอมเหลือง (Yellowish White, #FFE2B7)	สีขาวอมเหลือง (Yellowish White, #FFE2B7)	-
24	CBI 04011	ดี	สีน้ำเงินอมม่วงเทา (Grayish Purplish Blue, #413D51)	สีเหลืองสว่าง (Light Yellow, #FFD35F)	เหลืองอ่อน
25	CBI 04062	ดี	สีเขียวปนเหลืองเข้ม (Dark Olive Green, #232C16)	สีเขียวซีดมาก (Very Pale Green, #D8DEBA)	-
26	CBI 04072	ดี	สีแดงเข้ม (Deep Red, #7B001C)	สีแดงเข้ม (Deep Red, #7B001C)	-
27	CBI 05011	ดี	สีม่วงอมเทา (Grayish Violet, #46394B)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Light Yellow Green, #DCD36A)	-
28	CBI 05021	ดี	สีเทาน้ำเงินซีด (Pale Blue, #919192)	สีน้ำเงินอมม่วงเข้ม (Dark Purplish Blue, #1A162A)	-
29	CBI 05031	ดี	สีน้ำเงินอมม่วงซีด (Pale Purplish Blue, #8A7F8E)	สีน้ำเงินอมม่วงเข้ม (Dark Purplish Blue, #1A162A)	-

ลำดับ	ไอโซเลต	การเจริญ <sup>a</sup>	สีของโคโลนีด้านบน <sup>b</sup>	สีของโคโลนีด้านล่าง <sup>c</sup>	รงควัตถุ <sup>d</sup>
30	CBI 05041	ปานกลาง	สีแดงสว่าง (Vivid Red, #C10020)	สีเทาอมเหลือง (Yellowish Gray, #CAA885)	-
31	CBI 05062	ปานกลาง	สีเทาอมน้ำเงินเข้ม (Dark Bluish Gray, #464544)	สีเหลืองสว่าง (Light Yellow, #FFD35F)	เหลืองอ่อน
32	CBI 05072	ดี	สีน้ำเงินอมม่วงเข้ม (Dark Purplish Blue, #1A162A)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	เหลืองเข้ม
33	CBI 06011	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเขียวอมเหลืองสว่างมาก (Very Light Yellowish Green, #C6DF90)	-
34	CBI 06041	ดี	สีขาวอมเหลือง (Yellowish White, #FFE2B7)	สีขาวอมเหลือง (Yellowish White, #FFE2B7)	-
35	CBI 06052	ดี	สีเทาน้ำเงินอมม่วงซีดมาก (Very Pale Purplish Blue, #CBBAC5)	สีน้ำตาลเข้ม (Strong Brown, #753313)	เหลืองเข้ม
36	CBI 06062	ปานกลาง	สีแดงสว่าง (Vivid Red, #C10020)	สีแดงเข้ม (Deep Red, #7B001C)	-
37	CBI 06072	ปานกลาง	สีเหลืองส้มเข้ม (Dark Orange Yellow, #C37629)	สีน้ำตาลอมเขียวเหลือง (Light Olive Brown, #945D0B)	-
38	CBI 07011	ดี	สีเทาอมเหลือง (Yellowish Gray, #CAA885)	สีแดงเข้ม (Dark Red, #681C23)	-
39	CBI 07031	ดี	สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black, #140F0B)	สีดำอมน้ำตาล (Brownish Black, #140F0B)	เหลือง

ลำดับ	ไอโซเลต	การเจริญ <sup>a</sup>	สีของโคโลนีด้านบน <sup>b</sup>	สีของโคโลนีด้านล่าง <sup>c</sup>	รงควัตถุ <sup>d</sup>
40	CBI 07041	ปานกลาง	สีเทาเข้ม (Dark Gray, #49423D)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Light Yellow Green, #DCD36A)	-
41	CBI 07072	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเหลืองอมเทา (Grayish Yellow, #CEA262)	-
42	CBI 08011	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเขียวอมเหลืองสว่างมาก (Very Light Yellowish Green, #C6DF90)	-
43	CBI 08031	ดี	สีแดงสว่าง (Vivid Red, #C10020)	สีเทาอมเหลือง (Yellowish Gray, #CAA885)	-
44	CBI 08042	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเขียวอมเหลืองสว่างมาก (Very Light Yellowish Green, #C6DF90)	-
45	CBI 08052	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเหลืองอมเทา (Grayish Yellow, #CEA262)	-
46	CBI 08062	ดี	สีเขียวปนเหลืองเข้ม (Dark Olive Green, #232C16)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Light Yellow Green, #DCD36A)	-
47	CBI 08072	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเขียวอมเหลืองสว่างมาก (Very Light Yellowish Green, #C6DF90)	-
48	CBI 08082	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Light Yellow Green, #DCD36A)	-
49	CBI 09021	ดี	เขียวเข้มปนเหลืองอมเทา (Grayish Olive, #52442C)	สีเหลืองอมเทา (Grayish Yellow, #CEA262)	-

ลำดับ	ไอโซเลต	การเจริญ <sup>a</sup>	สีของโคโลนีด้านบน <sup>b</sup>	สีของโคโลนีด้านล่าง <sup>c</sup>	รงควัตถุ <sup>d</sup>
50	CBI 09031	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเขียวอมเหลืองสว่างมาก (Very Light Yellowish Green, #C6DF90)	-
51	CBI 09041	ดี	สีขาว (White, #FFC9D7)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Light Yellow Green, #DCD36A)	-
52	CBI 10011	ดี	สีม่วงอมเทา (Grayish Violet, #46394B)	สีเขียวอมเหลืองสว่าง (Light Yellow Green, #DCD36A)	-
53	CBI 10021	ดี	สีขาวอมเหลือง (Yellowish White, #FFE2B7)	สีขาวอมเหลือง (Yellowish White, #FFE2B7)	-
54	CBI 10032	ดี	สีเทาอมเหลือง (Yellowish Gray, #CAA885)	สีเขียวซีดมาก (Very Pale Green, #D8DEBA)	-
55	CBI 10042	ดี	สีเขียวปนเหลืองปานกลาง (Moderate Olive Green, #434B1B)	สีเขียวอมเหลืองสว่างมาก (Very Light Yellowish Green, #C6DF90)	-

หมายเหตุ a = การเจริญบนอาหารต่างๆ โดยรวม  
b = สีโคโลนีด้านบนของเชื้อบนอาหารต่างๆ โดยรวม  
c = สีโคโลนีด้านล่างของเชื้อบนอาหารต่างๆ โดยรวม  
d = สีรงควัตถุในอาหารต่างๆ โดยรวม

## ภาคผนวก ก

### 1. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

จากสูตร      น้ำหนักแห้งของเซลล์แอกติโนมัยซีท      = A - B

โดยที่      A = น้ำหนักกระดาศกรอง + น้ำหนักเซลล์แอกติโนมัยซีท (กรัม)

                    B = น้ำหนักกระดาศกรอง (กรัม)

### 2. การหาน้ำหนักดิน

จากสูตร      น้ำหนักดิน      = A - B

โดยที่      A = น้ำหนักบีกเกอร์+ดิน (หลังอบ) (กรัม)

                    B = น้ำหนักบีกเกอร์ก่อนอบ (กรัม)

### 3. การหาปริมาณความชื้น

จากสูตร      เปอร์เซ็นต์ความชื้น      =  $\frac{\text{น้ำหนักที่หายไป (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$

## ภาคผนวก ง

ตารางที่ 2(ง) คำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์จากการเจริญของเชื้อแอสคิตินอมัยซีท 19 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) ชุดการทดลองที่ 1

ไอโซเลท	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
<b>CBI 01011</b>	0.0029	0.0031	0.0036	0.0043	0.0045	0.0049	0.0048	0.0064	0.0052	0.0059	0.0052	0.0049
<b>CBI 02091</b>	0.0032	0.0029	0.0031	0.0034	0.0034	0.0032	0.0037	0.0043	0.0028	0.0031	0.0034	0.0082
<b>CBI 03031</b>	0.0037	0.0039	0.0039	0.0034	0.0037	0.0035	0.0047	0.0062	0.0040	0.0043	0.0040	0.0049
<b>CBI 03071</b>	0.0022	0.0025	0.0028	0.0031	0.0030	0.0042	0.0041	0.0062	0.0061	0.0063	0.0042	0.0039
<b>CBI 03081</b>	0.0031	0.0034	0.0038	0.0040	0.0038	0.0031	0.0043	0.0051	0.0037	0.0062	0.0060	0.0047
<b>CBI 04021</b>	0.0029	0.0027	0.0025	0.0031	0.0029	0.0036	0.0030	0.0049	0.0044	0.0055	0.0056	0.0032
<b>CBI 04031</b>	0.0010	0.0048	0.0059	0.0078	0.0066	0.0162	0.0241	0.0270	0.0301	0.0340	0.0293	0.0330
<b>CBI 04041</b>	0.0019	0.0020	0.0023	0.0025	0.0027	0.0025	0.0031	0.0049	0.0045	0.0044	0.0034	0.0054
<b>CBI 04051</b>	0.0028	0.0031	0.0053	0.0057	0.0055	0.0051	0.0053	0.0060	0.0057	0.0064	0.0049	0.0056
<b>CBI 05051</b>	0.0033	0.0042	0.0035	0.0039	0.0044	0.0039	0.0053	0.0056	0.0045	0.0048	0.0057	0.0021
<b>CBI 07052</b>	0.0020	0.0041	0.0046	0.0058	0.0054	0.0038	0.0059	0.0063	0.0059	0.0052	0.0061	0.0069
<b>CBI 07062</b>	0.0030	0.0046	0.0043	0.0053	0.0033	0.0047	0.0048	0.0070	0.0108	0.0164	0.0141	0.0154
<b>CBI 07021</b>	0.0037	0.0045	0.0046	0.0059	0.0015	0.0026	0.0039	0.0049	0.0077	0.0111	0.0101	0.0116
<b>CBI 08092</b>	0.0041	0.0038	0.0052	0.0056	0.0050	0.0040	0.0046	0.0073	0.0062	0.0056	0.0063	0.0069
<b>CBI 08021</b>	0.0037	0.0037	0.0039	0.0044	0.0046	0.0025	0.0031	0.0053	0.0054	0.0046	0.0038	0.0049
<b>CBI 06031</b>	0.0053	0.0051	0.0055	0.0091	0.0071	0.0152	0.0205	0.0278	0.0307	0.0330	0.0246	0.0296
<b>CBI 03122</b>	0.0053	0.0042	0.0058	0.0084	0.0072	0.0094	0.0081	0.0136	0.0133	0.0115	0.0159	0.0193
<b>CBI 09011</b>	0.0047	0.0046	0.0044	0.0051	0.0051	0.0053	0.0044	0.0064	0.0048	0.0058	0.0052	0.0047
<b>CBI 06021</b>	0.0038	0.0043	0.0043	0.0045	0.0034	0.0047	0.0048	0.0053	0.0064	0.0059	0.0038	0.0031

ตารางที่ 3(ง) ค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์จากการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีท 19 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Minimal medium plus mannitol (3MA) ชุดการทดลองที่ 1

ไอโซเลท	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
CBI 01011	0.0013	0.0016	0.0016	0.0026	0.0023	0.0029	0.0033	0.0019	0.0045	0.0077	0.0056	0.0060
CBI 02091	0.0011	0.0015	0.0018	0.0020	0.0023	0.0021	0.0027	0.0031	0.0046	0.0073	0.0063	0.0065
CBI 03031	0.0020	0.0020	0.0018	0.0021	0.0026	0.0036	0.0033	0.0045	0.0045	0.0068	0.0057	0.0047
CBI 03071	0.0018	0.0025	0.0027	0.0022	0.0029	0.0025	0.0027	0.0019	0.0043	0.0061	0.0054	0.0052
CBI 03081	0.0007	0.0007	0.0005	0.0009	0.0009	0.0013	0.0011	0.0004	0.0025	0.0049	0.0022	0.0052
CBI 04021	0.0007	0.0012	0.0021	0.0023	0.0029	0.0034	0.0031	0.0029	0.0047	0.0079	0.0067	0.0065
CBI 04031	0.0002	0.0033	0.0016	0.0018	0.0007	0.0009	0.0007	0.0029	0.0058	0.0083	0.0070	0.0071
CBI 04041	0.0005	0.0006	0.0007	0.0009	0.0007	0.0013	0.0016	0.0021	0.0053	0.0072	0.0060	0.0060
CBI 04051	0.0023	0.0020	0.0024	0.0023	0.0021	0.0023	0.0026	0.0021	0.0038	0.0045	0.0028	0.0041
CBI 05051	0.0016	0.0020	0.0026	0.0027	0.0025	0.0028	0.0031	0.0039	0.0047	0.0041	0.0038	0.0032
CBI 07052	0.0014	0.0018	0.0014	0.0032	0.0015	0.0008	0.0008	0.0022	0.0065	0.0077	0.0069	0.0090
CBI 07062	0.0015	0.0019	0.0016	0.0018	0.0013	0.0018	0.0015	0.0016	0.0054	0.0077	0.0055	0.0065
CBI 07021	0.0033	0.0034	0.0019	0.0020	0.0010	0.0017	0.0015	0.0013	0.0056	0.0069	0.0050	0.0069
CBI 08092	0.0027	0.0032	0.0042	0.0034	0.0031	0.0028	0.0032	0.0033	0.0059	0.0072	0.0054	0.0079
CBI 08021	0.0030	0.0032	0.0028	0.0024	0.0027	0.0020	0.0025	0.0022	0.0062	0.0077	0.0052	0.0073
CBI 06031	0.0046	0.0041	0.0032	0.0042	0.0045	0.0044	0.0047	0.0025	0.0057	0.0064	0.0057	0.0163
CBI 03122	0.0046	0.0035	0.0024	0.0027	0.0029	0.0031	0.0034	0.0028	0.0062	0.0081	0.0062	0.0085
CBI 09011	0.0053	0.0058	0.0050	0.0055	0.0051	0.0052	0.0048	0.0066	0.0061	0.0070	0.0060	0.0061
CBI 06021	0.0042	0.0049	0.0044	0.0046	0.0039	0.0052	0.0046	0.0050	0.0054	0.0076	0.0060	0.0058

ตารางที่ 4(ง) คำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์จากการเจริญของเชื้อแอสคิตินอสซ์ 19 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว International *Streptomyces* Project (ISP2) ชุดการทดลองที่ 2

ไอโซเลท	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
CBI 01011	0.0027	0.0041	0.0041	0.0045	0.0046	0.0037	0.0040	0.0059	0.0022	0.0024	0.0031	0.0011
CBI 02091	0.0027	0.0031	0.0030	0.0033	0.0032	0.0030	0.0035	0.0045	0.0023	0.0029	0.0032	0.0007
CBI 03031	0.0033	0.0035	0.0034	0.0028	0.0030	0.0032	0.0043	0.0071	0.0049	0.0041	0.0055	0.0044
CBI 03071	0.0025	0.0028	0.0026	0.0029	0.0030	0.0038	0.0042	0.0066	0.0047	0.0045	0.0054	0.0029
CBI 03081	0.0024	0.0028	0.0025	0.0029	0.0030	0.0025	0.0030	0.0048	0.0041	0.0029	0.0045	0.0059
CBI 04021	0.0021	0.0022	0.0020	0.0021	0.0022	0.0024	0.0039	0.0055	0.0053	0.0071	0.0084	0.0065
CBI 04031	0.0033	0.0068	0.0064	0.0057	0.0096	0.0141	0.0265	0.0324	0.0237	0.0301	0.0307	0.0273
CBI 04041	0.0021	0.0022	0.0020	0.0022	0.0024	0.0028	0.0033	0.0066	0.0047	0.0026	0.0031	0.0023
CBI 04051	0.0025	0.0022	0.0023	0.0032	0.0030	0.0031	0.0041	0.0068	0.0055	0.0033	0.0045	0.0044
CBI 05051	0.0030	0.0029	0.0025	0.0030	0.0034	0.0030	0.0040	0.0059	0.0039	0.0025	0.0044	0.0048
CBI 07052	0.0016	0.0026	0.0026	0.0018	0.0025	0.0032	0.0048	0.0062	0.0059	0.0036	0.0056	0.0042
CBI 07062	0.0035	0.0062	0.0024	0.0029	0.0049	0.0065	0.0072	0.0107	0.0118	0.0089	0.00129	0.0138
CBI 07021	0.0034	0.0037	0.0069	0.0107	0.0086	0.0065	0.0100	0.0137	0.0146	0.0153	0.0180	0.0184
CBI 08092	0.0031	0.0024	0.0020	0.0032	0.0029	0.0030	0.0037	0.0064	0.0052	0.0037	0.0051	0.0043
CBI 08021	0.0018	0.0021	0.0020	0.0033	0.0021	0.0018	0.0018	0.0058	0.0036	0.0024	0.0033	0.0025
CBI 06031	0.0051	0.0061	0.0030	0.0052	0.0066	0.0132	0.0276	0.0347	0.0316	0.0310	0.0303	0.0285
CBI 03122	0.0019	0.0023	0.0025	0.0028	0.0023	0.0014	0.0027	0.0057	0.0040	0.0040	0.0059	0.0056
CBI 09011	0.0035	0.0026	0.0027	0.0031	0.0030	0.0031	0.0029	0.0095	0.0094	0.0050	0.0051	0.0056
CBI 06021	0.0020	0.0022	0.0024	0.0042	0.0034	0.0016	0.0022	0.0049	0.0038	0.0017	0.0029	0.0020

ตารางที่ 5(ง) คำนวณน้ำหนักแห้งของเซลล์จากการเจริญของเชื้อแอสคิตินิมัยซีท 19 ไอโซเลท ในการเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Reduced arginine-starch-salts (RASS) ชุดการทดลองที่ 2

ไอโซเลท	เวลา (ชั่วโมง)											
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
CBI 01011	0.0035	0.0040	0.0041	0.0042	0.0045	0.0050	0.0043	0.0071	0.0067	0.0031	0.0041	0.0042
CBI 02091	0.0033	0.0040	0.0044	0.0044	0.0045	0.0035	0.0051	0.0056	0.0069	0.0030	0.0039	0.0031
CBI 03031	0.0027	0.0029	0.0025	0.0026	0.0034	0.0037	0.0043	0.0064	0.0053	0.0031	0.0038	0.0036
CBI 03071	0.0024	0.0027	0.0029	0.0030	0.0031	0.0036	0.0038	0.0054	0.0045	0.0033	0.0035	0.0026
CBI 03081	0.0018	0.0025	0.0024	0.0029	0.0035	0.0045	0.0043	0.0064	0.0061	0.0042	0.0055	0.0048
CBI 04021	0.0030	0.0038	0.0041	0.0045	0.0039	0.0038	0.0047	0.0070	0.0054	0.0026	0.0034	0.0021
CBI 04031	0.0024	0.0030	0.0033	0.0037	0.0035	0.0029	0.0030	0.0056	0.0041	0.0025	0.0038	0.0036
CBI 04041	0.0021	0.0020	0.0022	0.0019	0.0022	0.0032	0.0030	0.0047	0.0049	0.0029	0.0044	0.0032
CBI 04051	0.0019	0.0023	0.0020	0.0021	0.0027	0.0032	0.0032	0.0066	0.0043	0.0021	0.0033	0.0017
CBI 05051	0.0039	0.0044	0.0040	0.0041	0.0044	0.0050	0.0063	0.0075	0.0061	0.0044	0.0057	0.0047
CBI 07052	0.0024	0.0032	0.0029	0.0030	0.0031	0.0033	0.0032	0.0057	0.0040	0.0021	0.0033	0.0019
CBI 07062	0.0018	0.0042	0.0053	0.0021	0.0025	0.0027	0.0036	0.0060	0.0041	0.0028	0.0037	0.0041
CBI 07021	0.0025	0.0058	0.0052	0.0056	0.0037	0.0037	0.0046	0.0073	0.0051	0.0030	0.0036	0.0029
CBI 08092	0.0039	0.0036	0.0034	0.0044	0.0046	0.0053	0.0059	0.0086	0.0070	0.0052	0.0066	0.0091
CBI 08021	0.0053	0.0062	0.0048	0.0073	0.0069	0.0060	0.0066	0.0086	0.0080	0.0051	0.0054	0.0063
CBI 06031	0.0076	0.0089	0.0097	0.0090	0.0091	0.0096	0.0105	0.0131	0.0112	0.0098	0.0100	0.0111
CBI 03122	0.0051	0.0056	0.0064	0.0064	0.0054	0.0047	0.0064	0.0083	0.0072	0.0050	0.0052	0.0069
CBI 09011	0.0051	0.0068	0.0060	0.0057	0.0052	0.0049	0.0060	0.0072	0.0067	0.0052	0.0051	0.0059
CBI 06021	0.0042	0.0052	0.0055	0.0057	0.0061	0.0068	0.0056	0.0080	0.0063	0.0025	0.0033	0.0041





## ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

### ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ดร.คณิงกานต์ กลั่นบุญชัย

ตำแหน่งปัจจุบัน -

### ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
PhD in Pharmacy and Biomedical Science	Molecular Microbiology	University of Strathclyde, UK	2557
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2547
วิทยาศาสตรบัณฑิต	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2544

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) การคัดแยกแอกติโนมัยซีทและยีนที่ควบคุม  
การสร้างฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีท

### ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2550	ทุนศึกษาต่อระดับปริญญาเอก ณ University of Strathclyde, UK	กระทรวงวิทยาศาสตร์

### ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

### งานวิจัย

1) Panuwan Chantawannakul, Anchalee Oncharoen, Khanungkan Klanbut, Ekachai Chukeatirote and Saisamorn Lumyong, (2002) Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia* 28: 241-245.

- 2) Khanuengkan Klanbut, Yuwadee Peerapornpisarn, Chartchai Khanongnuch and Masaharu Ishii. 2004. Phytase activity from thermophilic blue-green algae from hot spring in northern Thailand. *The Japanese Journal of Phycology* 52 (supplement): 57-60.
- 3) คณิงกานต์ กลั่นบุศย์, ยูวดี พีรพรพิศาล, ชาตชาย โจนงนุช และ Masaharu Ishii. 2547. การศึกษาเอนไซม์ไฟเตสที่สกัดจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทนอุณหภูมิสูงในน้ำพุร้อนบางแห่งบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. *วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ (Section T) ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ 1*: 237-244.
- 4) Khanuengkan Klanbut, Yuwadee Peerapornpisarn, Chartchai Khanongnuch and Masaharu Ishii. 2004. Phytase activity from thermotolerant blue-green algae from hot spring in northern Thailand. *The 15<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology" and JSPS-NRCT Symposium "The Forefront of Bioinformatics Application"*: I-7.
- 5) Vinod Jyothikumar, Khanungkan Klanbut, John Tiong, James S. Roxburgh, Iain S. Hunter, Terry K. Smith and Paul R. Herron, (2012) Cardiolipin synthase is required for *Streptomyces coelicolor* morphogenesis. *Molecular Microbiology* 84 (1): 181–197.

#### การเสนอผลงานวิชาการ

1. การนำเสนอโปสเตอร์เรื่อง Antimicrobial activity and phospholipids of actinomycetes isolated from mangrove forest soil samples of Klongtamrhu Chonburi Thailand ในงานประชุมวิชาการ The 13<sup>th</sup> International symposium on Biocontrol and Biotechnology abstracts and program วันที่ 6-8 พฤศจิกายน 2558 ณ เมือง Shen Zhen ประเทศจีน