

การคัดแยกแอกติโนมายซีตที่ผลิตเซลลูเลสและสารปฏิชีวนะ

นางสาวศิวาภรณ์ สุขวโรทัย

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION OF CELLULASE AND ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES



Miss Siraporn Sukhawatotai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การคัดแยกแอกติโนไมซีตที่ผลิตเซลลูเลสและสารปฏิชีวนะ

โดย

นางสาวศิราภรณ์ สุขวโรทัย


สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม


อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. ประภัสร์สิน สีहनนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

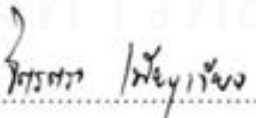
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ อนิยวัน)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประภัสร์สิน สีहनนท์)

  
..... กรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เจริญสำราญ)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เทียงเขียว)

ศิวภรณ์ สุวโรทัย : การคัดแยกแอกติโนมัยซีดที่ผลิตเซลลูเลสและสารปฏิชีวนะ (ISOLATION OF CELLULASE AND ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ประภีร์ ดีสิน สีนันทน์, 185 หน้า.

แยกแอกติโนมัยซีดได้ทั้งหมด 115 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดิน 36 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจาก 11 จังหวัดในประเทศไทย เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเซลลูเลสเบื้องต้นบนอาหารแข็งคาร์บอนิมิลเซลลูโลส และวัดอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่เวลา 7 วันพบว่า มีแอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างเซลลูเลสได้จำนวน 71.30% โดยแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ NKP3-2 ที่แยกได้จากดินใน อ.โกรกพระ จ. นครสวรรค์ มีประสิทธิภาพสูงสุดเท่ากับ 4.3 เซนติเมตร สายพันธุ์ NV1-4 ที่แยกได้จากดินใน อ.เวียงสา จ. น่านและสายพันธุ์ LK3-10 ที่แยกได้จากดินใน อ.เกาะคา จ.ลำปาง มีค่าเท่ากับ 3.8 และ 2.9 เซนติเมตร ตามลำดับ ได้ทำการศึกษาเซลลูเลสแอกติวิตีของสายพันธุ์ NKP3-2 พบว่ามีเซลลูเลสแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 390.38 mU/ml เมื่อนำมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะเบื้องต้นโดยวิธี Dual-culture ยับยั้งราโรคพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Pythium aphanidermatum* DOAC 1662 *Phytophthora parasitica* DOAC 0005 *Collectotrichum capsici* DOAC 1196 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DOAC 0874 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* DOAC 0893 และ *Alternaria porri* DOAC 1756 มีแอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราโรคพืชได้จำนวน 66.96% พบว่าสายพันธุ์ LK3-10 NKP3-2 และ NV1-4 สามารถยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิด โดยสายพันธุ์ LK3-10 สามารถยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum* ( $\Delta\gamma=31$  มม.) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ( $\Delta\gamma=11.7$  มม.) ได้ดีที่สุด สายพันธุ์ NKP3-2 สามารถยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum* ( $\Delta\gamma=28.8$  มม.) ได้รองลงมา และสายพันธุ์ NV1-4 สามารถยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum* ( $\Delta\gamma=25.2$  มม.) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ( $\Delta\gamma=9.5$  มม.) ได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ NKP3-2 และ LK3-10 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาทางอนุพันธุศาสตร์พบว่า ลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ NKP3-2 มีความคล้ายกับ *Streptomyces* sp. 1A01654 มากที่สุด ที่ระดับความเหมือน 98% แอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ LK3-10 มีความคล้ายกับ *Streptomyces* sp. AB2A, *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* และ *Streptomyces hygroscopicus* ที่ระดับความเหมือน 99% แอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ NV1-4 มีความคล้ายกับ *Streptomyces hygroscopicus* strain 3088 ที่ระดับความเหมือน 100%

ดังนั้นการนำแอกติโนมัยซีดทั้งสามสายพันธุ์ซึ่งช่วยย่อยสลายเซลลูโลสและทั้งยังช่วยทำลายราโรคพืชทั้ง 6 ชนิด มาประยุกต์ใช้ร่วมกันในกระบวนการทำปุ๋ยหมัก น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทางด้านการเกษตรต่อไป

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....ศิวภรณ์ สุวโรทัย  
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*Prasit*  
 ปีการศึกษา.....2550.....



# # 4872481923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ACTINOMYCETES / CELLULASE / ANTIFUNGAL

SIRAPORN SUKHAWAROTAI : ISOLATION OF CELLULASE AND ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, Ph.D., 185 pp.

Cellulase and antibiotic producing by isolated actinomycetes were studied. One hundred fifteen actinomycetes strains were isolated from soil samples collected from 11 provinces in Thailand. Seventy one percent of these isolated strains showed cellulolytic activity by forming clear zone around colony on carboxymethylcellulose agar. NKP3-2 strain isolated from Krok Phra District, Nakhon Sawan Province exhibited the highest cellulolytic activity by the ratio of clear zone and colony diameter at day 7 of 4.3 centimeter. LK3-10 strain isolated from Koh Kha District, Lam Phang Province and NV1-4 strain isolated from Viang Sa District, Nan Province showed the ratio of 2.9 and 3.8 centimeter, respectively. Study of cellulase activity of strain NKP3-2 showed the highest cellulase activity of 390.38 mU/ml. Antimicrobial activity assay by Dual-culture method against 6 species of plant pathogenic fungi, included *Pythium aphanidermatum* DOAC 1662, *Phytophthora parasitica* DOAC 0005, *Collectotrichum capsici* DOAC 1196, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DOAC 0874, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* DOAC 0893 and *Alternaria porri* DOAC 1756. The NKP3-2, LK3-10 and NV1-4 strain exhibited the broad spectrum antimicrobial activity against all 6 tested fungi. LK3-10 isolated showed highest antifungal activity against *Pythium aphanidermatum* ( $\gamma=31\text{mm.}$ ) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. ( $\Delta\gamma=11.7\text{mm}$ ) NKP3-2 strain showed high activity against *Pythium aphanidermatum*. ( $\Delta\gamma=28.8\text{ mm.}$ ) NV1-4 strain was also inhibited *Pythium aphanidermatum* ( $\Delta\gamma=25.2\text{mm.}$ ) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ( $\Delta\gamma=9.5\text{ mm.}$ ) at lower level when comparing with to the LK3-10 and NKP3-2 strain.

Molecular identification of the nucleotide sequence of the 16s rRNA gene of NKP3-2 isolated strain showed 98% similarity closely related to *Streptomyces* sp. 1A01654. LK3-10 isolated strain showed 99% similarity closely related to 3 *Streptomyces* sp. included *Streptomyces* AB2A, *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* and *Streptomyces hygrosopicus*. NV1-4 isolated strain showed 100% similarity closely related to *Streptomyces hygrosopicus* strain 3088.

So the three promising isolated strain which showed cellulase and antimicrobial activity against plant pathogenic fungi could be able to use in the application of compost making, which will be useful in agricultural practice.

Department.....Microbiology.....Student's signature..... Siraporn Sukhawarotai  
Field of study.....Industrial Microbiology....Advisor's signature..... Prakitsin Sihanonth  
Academic year.....2007.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประภัสสร์ สีนันทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ แนะนำแนวทางในการทำวิจัย และสนับสนุนในด้านต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว ที่กรุณาช่วยเหลือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอกติโนมายซีตและให้คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆอย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็น ที่ช่วยในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เริงสำราญ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็น ที่ช่วยในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อคิดเห็น ที่ช่วยในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์โรคพืชที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณนางสาวทศนา นิธิสกุลกาญจน์ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเอกติโนมายซีตเป็นอย่างดี นางสาวสุนัดดา โยมญาติ นางสาวสุกัญญาณี แซ่ประเสริฐ นางสาวธีรวัฒนา ภาระมาตย์ รวมทั้งพี่ๆและน้องๆห้อง 401 ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดจนคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ให้โอกาสทางการศึกษา เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆด้านเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

## สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....		จ
กิตติกรรมประกาศ.....		ฉ
สารบัญ.....		ช
สารบัญตาราง.....		ญ
สารบัญภาพ.....		ฎ
บทที่		
1	บทนำ.....	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
	2.1 ลักษณะทั่วไปและแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัซีต.....	4
	2.2 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัซีต.....	6
	2.3 การจัดจำแนกแอกติโนมัซีต.....	16
	2.4 การแยกและการคัดเลือกแอกติโนมัซีต.....	22
	2.5 ปุ๋ยหมัก.....	25
	2.6 เชลลูโลส.....	28
	2.7 เอนไซม์ที่ผลิตโดยแอกติโนมัซีต.....	29
	2.8 สารปฏิชีวนะ.....	34
	2.9 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัซีต.....	35
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	49
	3.1 อุปกรณ์.....	49
	3.2 สารเคมี.....	51
	3.3 ตัวอย่างดิน.....	53
	3.4 การแยกแอกติโนมัซีตจากดินตัวอย่าง.....	53
	3.5 การเก็บรักษาแอกติโนมัซีต.....	54
	3.6 การทดสอบการสร้างเชลลูเลสของแอกติโนมัซีต.....	54
	3.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งคาร์บอนกับเชลลูเลสแอกติโนมัซีตของ แอกติโนมัซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	54

บทที่	หน้า
3.8 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งไนโตรเจนกับเซลล์แอกติวิตีของ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	55
3.9 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับเซลล์แอกติวิตีของ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	56
3.10 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิ กับเซลล์แอกติวิตีของ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	57
3.11 การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีตกับราที่ก่อให้เกิด โรคพืช.....	58
3.12 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4.....	59
3.13 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA.....	62
4 ผลการทดลอง.....	65
4.1 ลักษณะของตัวอย่างดิน.....	65
4.2 การแยกแอกติโนมัยซีตจากตัวอย่างดิน.....	69
4.3 การทดสอบการสร้างเซลล์ของแอกติโนมัยซีต.....	71
4.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งคาร์บอนกับเซลล์แอกติวิตีของ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	76
4.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งไนโตรเจนกับเซลล์แอกติวิตีของ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	78
4.6 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับเซลล์แอกติวิตีของ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	80
4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับเซลล์แอกติวิตีของ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	82
4.8 การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีตกับราที่ก่อให้เกิด โรคพืช.....	84
4.9 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างเซลล์.....	108



บทที่	หน้า
4.10 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช.....	108
4.11 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้.....	109
4.12 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10.....	109
4.13 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA...	130
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	139
รายการอ้างอิง.....	143
ภาคผนวก.....	147
ภาคผนวก ก.....	148
ภาคผนวก ข.....	156
ภาคผนวก ค.....	160
ภาคผนวก ง.....	162
ภาคผนวก จ.....	175
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	185

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีต.....	35
2.2 ตัวอย่างกลุ่มของสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรีย รา และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตและปีที่ค้นพบ.....	38
3.1 แสดงส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆในสารละลาย PCR 20 ไมโครลิตร.....	63
4.1 แสดงแหล่งที่มา pH และลักษณะของตัวอย่างดิน.....	66
4.2 แสดงสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่แยกได้จากดินตัวอย่าง 36 ตัวอย่าง.....	69
4.3 แสดงสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่สร้างเซลล์ลูลีสจากดินตัวอย่าง 36 ตัวอย่าง.....	71
4.4 จำนวนสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่สร้างเซลล์ลูลีสแต่ละกลุ่ม.....	73
4.5 ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคพืชของแอกติโนมัยซีต.....	84
4.6 จัดกลุ่มจำนวนชนิดราโรคพืชที่ถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีตที่แยกได้.....	90
4.7 แสดงการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 บนอาหาร ISP.....	117
4.8 แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบของสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	126
4.9 แสดงความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆของสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	126
4.10 แสดงความสามารถในการเจริญที่ pH ต่างๆของสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	127
4.11 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	128
4.12 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	129
4.13 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 เปรียบเทียบกับ <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .....	136

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 การพัฒนาสายใยของ <i>Streptomyces</i> .....	7
2.2 แสดงวงชีวิตของแอกติโนมัยซีต <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	8
2.3 องค์ประกอบภายในไซโตพลาซึมของสายใยอาหารในแอกติโนมัยซีต.....	9
2.4 แสดงการสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีต.....	11
2.5 แสดงแอกติโนมัยซีตกลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายคู่และสายสั้น.....	12
2.6 แสดงการสร้างสปอร์แบบสายยาวของแอกติโนมัยซีต.....	13
2.7 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนสายใยอาหาร.....	15
2.8 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนสายใยอากาศ.....	16
2.9 แสดงระดับความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของแอกติโนมัยซีตและแบคทีเรียกลุ่มอื่น.	21
2.10 แผนภูมิวงกลมแสดงการกระจายตัวของวงค์ของแอกติโนมัยซีต.....	24
2.11 วัฏจักรคาร์บอน.....	29
2.12 แสดงการไฮโดรลิซิสของ amorphous และ microcrystalline cellulose.....	31
2.13 แสดงกระบวนการหมักปุ๋ยและความสัมพันธ์ของอุณหภูมิ pH ในกระบวนการหมักปุ๋ย.....	33
2.14 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides.....	41
2.15 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline.....	42
2.16 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม chloramphenicol.....	42
2.17 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide.....	43
2.18 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene.....	44
2.19 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin.....	44
2.20 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม vancomycin.....	45

รูปที่	หน้า
4.1 แผนภูมิวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์การจัดกลุ่มการสร้างเซลล์.....	74
4.2 ภาพการสร้างเซลล์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	75
4.3 การเปลี่ยนแปลง CMCase และ alpha-cellulase และ pH ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	76
4.4 การเปลี่ยนแปลง CMCase และ alpha-cellulase และ น้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2.....	77
4.5 การเปลี่ยนแปลงเซลล์แอกติวิตีและ pH ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.04%NH <sub>4</sub> Cl และ 0.07%KNO <sub>3</sub> .....	78
4.6 การเปลี่ยนแปลงเซลล์แอกติวิตีและน้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.04%NH <sub>4</sub> Cl และ 0.07%KNO <sub>3</sub> .....	79
4.7 การเปลี่ยนแปลงเซลล์แอกติวิตีของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ.....	80
4.8 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ.....	81
4.9 การเปลี่ยนแปลงเซลล์แอกติวิตีและ pH ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญที่อุณหภูมิ 30 45 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ.....	82
4.10 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญที่อุณหภูมิ 30 45 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ.....	83
4.11 แผนภูมิวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์ของแอกติโนมัยซีตต่อการยับยั้งราโรคพืช.....	91
4.12 แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ <i>Alternaria porri</i> DOAC 1756 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10.....	94
4.13 แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ <i>Collectotrichum capsici</i> DOAC 1196 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10.....	95
4.14 แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> DOAC 0874 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10.....	97
4.15 แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> DOAC 0893 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10.....	99
4.16 แสดงการยับยั้ง แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ <i>Pythium aphanidermatum</i> DOAC 1662 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10.....	100

รูปที่	หน้า
4.17 แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ <i>Phytophthora parasitica</i> DOAC 0005 โดย แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10.....	102
4.18 แสดงการยับยั้งราโรคพืชทั้ง 6 ชนิดของสายพันธุ์ NV1-4 และ NKP3-2.....	104
4.19 แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช <i>Alternaria porri</i> โดยแอกติโนมัยซีต สายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	105
4.20 แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช <i>Collectotrichum capsici</i> DOAC 1196 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	105
4.21 แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> DOAC 0874 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	105
4.22 แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> DOAC 0893 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	106
4.23 แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช <i>Pythium aphanidermatum</i> DOAC 1662 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	106
4.24 แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช <i>Phytophthora parasitica</i> DOAC 0005 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	107
4.25 แผนภูมิแท่งแสดงระยะทางเฉลี่ย( $\Delta Y$ )ที่เส้นใยรากถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4.....	107
4.26 แสดงการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของสายพันธุ์ NKP3-2.....	110
4.27 แสดงการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของสายพันธุ์ LK3-10.....	111
4.28 แสดงการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของสายพันธุ์ NV1-4 .....	112
4.29 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 3 วัน กำลังขยาย 10,000x.....	113
4.30 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 3 วัน กำลังขยาย 20,000x.....	113
4.31 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10 เจริญ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol mungbean ระยะเวลา 7 วัน กำลังขยาย 5,000x .....	114



รูปที่	หน้า
4.32 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol mungbean ระยะเวลา 7 วัน กำลังขยาย 15,000x....	114
4.33 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 4 วัน กำลังขยาย 7,500x.....	115
4.34 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 4 วัน กำลังขยาย 15,000x.....	115
4.35 ลักษณะโคโลนีและสีของแอกติโนมัยซีตบนอาหาร ISP1.....	119
4.36 ลักษณะโคโลนีและสีของแอกติโนมัยซีตบนอาหาร ISP2.....	120
4.37 ลักษณะโคโลนีและสีของแอกติโนมัยซีตบนอาหาร ISP3.....	121
4.38 ลักษณะโคโลนีและสีของแอกติโนมัยซีตบนอาหาร ISP4.....	122
4.39 ลักษณะโคโลนีและสีของแอกติโนมัยซีตบนอาหาร ISP5.....	123
4.40 ลักษณะโคโลนีและสีของแอกติโนมัยซีตบนอาหาร ISP6.....	124
4.41 ขนาดของ PCR product เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆบนอะกาโรสเจล.....	131
4.42 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 .....	132
4.43 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10 .....	133
4.44 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 .....	134
4.45 Dendogram แสดงระดับความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 NV1-4 และแบคทีเรียกลุ่มอื่น โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA.....	135

# บทที่ 1

## บทนำ

แอกติโนมัยซีตเป็นจุลินทรีย์ที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย เพราะไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไม่โตคอนเดรีย มีความไวต่อสารปฏิชีวนะที่ทำลายแบคทีเรียแต่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ทำลายรา ตืดสีแกรมบวก มีลักษณะบางประการคล้ายรา คือมีการสร้างสปอร์เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) บนสายใยอาหาร (substrate mycelium) และสายใยอากาศ (aerial mycelium) (Cross และ Goodfellow, 1973) มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือต่อกันเป็นสายยาว มีการสร้างผนังกันเส้นใย สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง เป็นวง ขดเป็นเกลียว อาจมีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์ เช่น *Actinoplanaceae Dactylosporangium* และพบการสร้าง clamydospores ใน *Actinosporangium violacles* แต่เส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-2.0 ไมโครเมตร (Sykes และ Skinner, 1973) มีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีนและไซโตซีนในดีเอ็นเอสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีตยังประกอบด้วย mucopeptide (N-acetyl glucosamine เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid) 2,6-diaminopimelic acid glutamic acid glycine และ alanine ส่วนผนังเซลล์ของราประกอบด้วย glucan mannan และ chitin โคนิเดียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะเป็น ผงแป้ง หรือ เป็นแผ่นหนัง ทึบแสง ผิวของโคนิเดียอาจเรียบ หนูน ขรุขระ เป็นเม็ดเล็ก หรือเป็นเกล็ด โคนิเดียมีหลากหลายสี ได้แก่ ขาว เหลือง ส้ม ชมพู เขียว ม่วง ดำ และแดง เป็นต้น เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะเห็นเป็นเส้นใย และมีสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายขดม้วนอยู่บริเวณปลายเส้นใย เช่น *Streptomyces* แอกติโนมัยซีตบางชนิดไม่สร้างสปอร์แต่เส้นใยจะแตกหักเป็นอนุภาคคล้ายอาโทรสปอร์ (arthospore) เช่น *Nocardia* (Lederberg และคณะ, 2000)

ในดินพบแอกติโนมัยซีตมากเป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรียชนิดอื่น (Sykes และ Skinner, 1973) หน้าที่ที่สำคัญในธรรมชาติ คือทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) อินทรีย์วัตถุในดิน โดยการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญได้หลากหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญคือ เซลลูเลส แอกติโนมัยซีตมีความสามารถในการย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน ได้แก่ ซากพืช ซากสัตว์ และสารไฮโพลิเมอร์ ต่างๆ เช่น เซลลูโลส เคราติน เพคติน และไคติน เป็นต้น (ยูวดี มหาศักดิ์ศิริ, 2546) รวมทั้งปุ๋ยหมัก ซึ่งเป็นปุ๋ยอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ส่วนใหญ่ได้มาจากพืชที่ถูกหมักให้ย่อยสลายโดยกระบวนการของจุลินทรีย์ต่างๆกัน แอกติโนมัยซีตเป็นหนึ่งในกลุ่มจุลินทรีย์ที่สำคัญในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์หรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ในกระบวนการทำปุ๋ยหมัก ในระหว่างการย่อยสลายวัสดุเศษพืชโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์แบบ

ต้องการอากาศ จะมีผลทำให้สภาพแวดล้อมทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพบางประการเปลี่ยนแปลง มีผลต่อเชื้อก่อโรคพืชและศัตรูบางชนิด เช่น เกิดปฏิกิริยาระหว่างจุลินทรีย์ในกองปุ๋ย และเชื้อก่อโรคพืช รวมถึงประโยชน์บางประการของจุลินทรีย์อื่นเนื่องมาจากกองปุ๋ยหมักเช่น เเร่งอัตราการย่อยสลายในกองปุ๋ยหมัก ช่วยยับยั้งหรือทำลายโรคพืชบางชนิดในกองปุ๋ยหมัก ช่วยทำลายไข่ของแมลงบางชนิด ช่วยเพิ่มคุณภาพของปุ๋ยหมัก เป็นต้น

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีตมีความหลากหลาย ได้แก่ สารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียและรา สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง หรือสารยับยั้งเอนไซม์ การค้นพบสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีตเริ่มขึ้นในปี 1940 โดย Waksman และ Woodruff ซึ่งค้นพบ Actinomycin โดย 60-70 เปอร์เซ็นต์ของยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่ที่ผลิตได้มาจากแอคติโนมัยซีต ส่วนที่เหลือมาจากราและแบคทีเรีย และในกลุ่มแอคติโนมัยซีตนั้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์มาจาก *Streptomyces* spp. แอคติโนมัยซีตมีระดับความสามารถที่หลากหลายในการยับยั้งหรือลดจำนวนเชื้อราในดิน (Zaitlin และคณะ, 2004) นอกจากนี้แอคติโนมัยซีตยังถูกนำมาใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช โดยมีรายงานสนับสนุนว่า มีการใช้ fungichromin ที่ผลิตโดย *Streptomyces padanus* ในการควบคุมโรคคอกเน่าในกะหล่ำปลี (Shih และคณะ, 2003) มีการทดสอบความสามารถของ *Streptomyces* 10 สายพันธุ์ ต่อความต้านทานเชื้อราก่อโรคพืช 10 ชนิดพบว่า *Streptomyces halstedii* และ *Streptomyces rochei* มีความสามารถในการต้านทานเชื้อราก่อโรคในพืชได้ดีที่สุด (Zaitlin และคณะ, 2004) *Streptomyces nodosus* สามารถผลิต amphotericin B ใช้เป็นสารปฏิชีวนะยับยั้งรา (Lederberg และคณะ, 2000) *Micromonospora carbonacea* สามารถในการต้าน *Sclerotinia minor* ซึ่งเป็นสาเหตุของ drop disease ในผักกาดหอม (El-Tarabily และคณะ, 2000)

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จะคัดแยกแอคติโนมัยซีตจากแหล่งดินต่างๆในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพสูงในการช่วยย่อยสลายวัสดุอินทรีย์หรือวัสดุทางการเกษตรในการทำปุ๋ยหมัก และมีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะที่ใช้ควบคุมจุลินทรีย์โรคพืช เพื่อทำให้ได้ปุ๋ยหมักคุณภาพดี และปราศจากเชื้อที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช ซึ่งสามารถนำไปทำผลิตภัณฑ์หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายวัสดุอินทรีย์เพื่อทำปุ๋ยหมักต่อไป

### วัตถุประสงค์

เพื่อแยกแอคติโนมัยซีตจากแหล่งดินต่างๆในประเทศไทย ที่สามารถในการสร้างเซลล์และสารปฏิชีวนะ จำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีตที่คัดเลือก

### ขั้นตอนการวิจัย

1. สุ่มและเก็บตัวอย่างดิน
2. แยกชนิดของแอกติโนมัยซีตให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์
3. ทดสอบความสามารถในการสร้างเซลล์และสารปฏิชีวนะ
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเซลล์
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ที่คัดเลือกซึ่งมีความสามารถในการสร้างเซลล์และสารปฏิชีวนะ

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตที่สร้างเซลล์ และสารปฏิชีวนะยับยั้งราก่อโรคพืช จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานของเซลล์และสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีต ซึ่งสามารถนำเชื้อที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ต่อการพัฒนาทางด้านเกษตรหรืออุตสาหกรรมยาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ลักษณะทั่วไปและแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีตเป็นแบคทีเรียที่ลักษณะคล้ายรา มีลักษณะเป็น prokaryotic cell เซลล์เป็นเส้นสาย(filament) คล้าย hypha ของรา แต่มีขนาดเล็กและสั้นกว่ามาก แอกติโนมัยซีตเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีนและไซโตซีนในดีเอ็นเอสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป เช่น *Bacillus Clostridium Staphylococcus* และ *Streptococcus* แอกติโนมัยซีตถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียเพราะไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสและไม่โตคอนเดรีย นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีตยังประกอบด้วย mucopeptide ( N-acetyl glucosamine เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid) 2,6- diaminopimeli acid glutamic acid glycine และ alanine ส่วนผนังเซลล์ของราประกอบด้วย Glucan Mannan และ Chitin แต่แอกติโนมัยซีตมีลักษณะบางอย่างที่คล้ายกับรา คือ มีการสร้างสปอร์บนสายใยอาหารเรียก คอนิเดีย (conidia) แต่เส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-2.0 ไมโครเมตร มีการสร้างสปอร์บนสายใยอาหาร (Substrate mycelium) และสายใยอากาศ (aerial mycetium) มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือต่อกันเป็นสายยาว สายคอนิเดียอาจมีลักษณะตรง เป็นวง ขดเป็นเกลียว อาจมีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์(sporangium) เช่น *Actinoplanaceae Dactylosporangium* และพบการสร้าง Clamydospores ใน *Actinosporangium violacles* นอกจากนี้แอกติโนมัยซีตยังสามารถขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ไม่มีเพศ ( asexual spore) มีชื่อเรียกว่า conidia ได้อีกด้วย แอกติโนมัยซีตมีความสำคัญต่อมนุษย์ บ้างก็ทำให้เกิดโรคแก่คน สัตว์ พืช แต่ก็มีด้านที่เป็นประโยชน์มากมายเช่น ย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ในดิน ทำให้ดินอุดมสมบูรณ์ และพวกที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งรา สารต้านเนื้องอก เป็นต้น แอกติโนมัยซีตสกุลที่นิยมศึกษาในเรื่องการสร้างสารทุติยภูมิ ได้แก่ Sporostreptomycetes Norcardioform actinomycetes Actinoplanete โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* มีความสำคัญในการผลิตสารปฏิชีวนะที่ใช้ในด้านการแพทย์ การเกษตรและอาหาร นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมผลิตเอนไซม์ต่างๆ อีกด้วย

#### ลักษณะของแอกติโนมัยซีตที่คล้ายคลึงกับรา

1. เส้นใยของแอกติโนมัยซีตชั้นสูงจะแตกสาขาคล้ายเส้นใยของรา



2. แอคติโนมัยซีตหลายกลุ่มจะสร้างเส้นใยที่เจริญอยู่ในอากาศ(aerial mecelium) ซึ่งตรงปลายจะมี conidia คล้ายกันเส้นใยและสปอร์ของรา
3. การเจริญของแอคติโนมัยซีตในอาหารเหลวไม่ค่อยจะปรากฏว่าทำให้เกิดสีขุ่น (turbidity) อันเนื่องมาจากการแขวนลอยของเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวเช่นแบคทีเรีย แต่แอคติโนมัยซีตจะเจริญแบบกลุ่มก้อน
4. การเพิ่มจำนวนของแอคติโนมัยซีตจะคล้ายกับรา(apically) ส่วนการเพิ่มจำนวนของพวกแบคทีเรียจะเป็นแบบทวีคูณ (exponential)

### ลักษณะของแอคติโนมัยซีตที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย

1. มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกัน คือจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.2 ไมโครเมตร
2. ส่วนที่ขาดออกเป็นท่อนๆ(fragment)จะมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม Mycobacterium และ Coryneform ไม่ว่าจะป็นรูปร่าง การติดสีย้อมและลักษณะทางสรีระวิทยา
3. ถูกทำลายโดยแบคทีเรียโอฟาจ และสารปฏิชีวนะประเภทเดียวกับที่ทำลายแบคทีเรีย
4. เป็นเซลล์ชั้นต่ำที่ยังไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (prokaryotes)
5. ผนังเซลล์ไม่มีไคตินหรือเซลลูโลส แต่เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (polymer) ของน้ำตาลกรดอะมิโน ซึ่งคล้ายกับผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria)

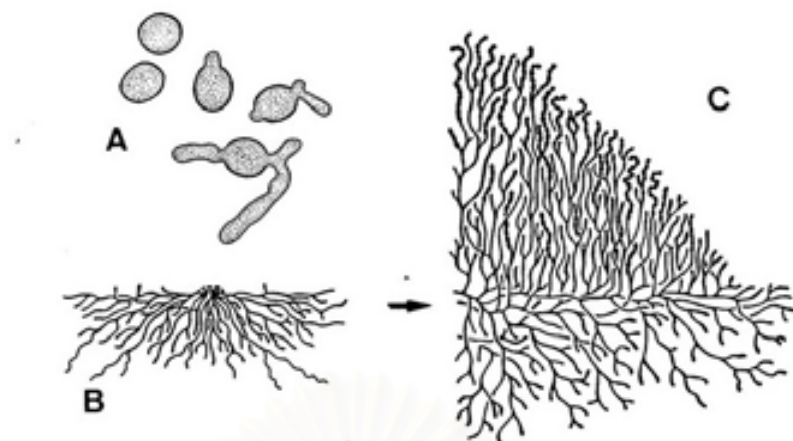
แอคติโนมัยซีตเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันพอสมควร คือ นอกจากจะพบในดินที่เป็นสภาพธรรมชาติแล้ว ยังจะพบในกองปุ๋ยหมักที่อุณหภูมิสูง ในโคลน แม่น้ำ ใต้ทะเลสาบ แต่โดยปกติมักจะเจริญอยู่ผิวดินหรือในดินที่ไม่ลึกไปกว่า 4 ซม. จากการนับจำนวนจากดินตัวอย่างที่ไม่มีการจำกัดการเจริญ พบว่ามีจำนวนใกล้เคียงกับแบคทีเรีย แต่ถ้าในดินที่มีสภาพเป็นด่าง จะพบแอคติโนมัยซีตในอัตราส่วนที่สูงขึ้น เช่น ดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ pH 6-8 จะมีแอคติโนมัยซีตสูงถึง 95% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แต่ในดินต่างทั่วไป จะพบประมาณ 10-70% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด จากความสามารถในการทนความแห้งแล้งได้ดี ทำให้สภาพดินแห้งจะพบแอคติโนมัยซีตเป็นอัตราส่วนที่สูงขึ้น จึงมักพบในดินเขตร้อนมากกว่าเขตอบอุ่น จากลักษณะการเจริญที่ช้ากว่าแบคทีเรียและรา ทำให้ในสภาพธรรมชาติแอคติโนมัยซีตไม่สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ 2 ชนิดดังกล่าว แต่แอคติโนมัยซีตมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบที่ย่อยสลายยาก จึงพบว่าการเจริญมักจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลังจากที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเจริญลดลงแล้ว จากสภาพดังกล่าวทำให้สภาพที่เหมาะสมกับแอคติโนมัยซีตอยู่ใน

ลักษณะที่ไม่ค่อยจะมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้ เช่น ดินที่ค่อนข้างเป็นด่าง แห้งแล้งและอุณหภูมิสูง

## 2.2 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีด

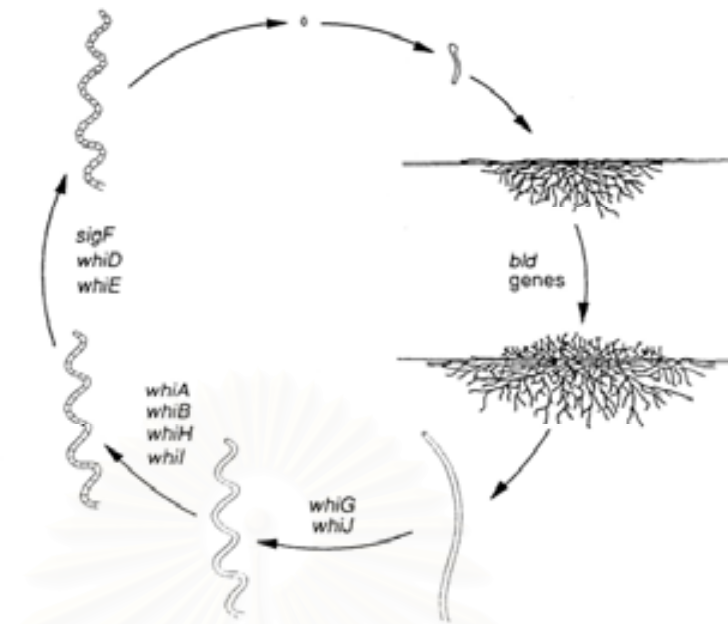
### 2.2.1 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีด

โคโลนีของแอกติโนมัยซีดเกิดจากการรวมกันของกลุ่มเส้นใย โคโลนีของแอกติโนมัยซีดจะต่างจากโคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียจะเกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนกัน แต่โคโลนีของแอกติโนมัยซีดเกิดจากการรวมกันของเส้นใย เป็นกลุ่มเส้นใยที่มีความหนาแน่น การเจริญของโคโลนีเริ่มจากการที่หัวเชื้อเจริญในปริมาณที่พอเหมาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยหัวเชื้ออาจมาจากสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่แตกหัก หรือจากส่วนของโคโลนีที่มีอายุมาก และจะพัฒนาเป็นสายใยอาหาร เมื่อสายใยอาหารเจริญเต็มที่ในแนวตั้งโดยผ่านทางอาหารขึ้นมาเป็นสายใยอากาศ และจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี เช่น สร้างสปอร์เส้นใยจะแบ่งตัวเริ่มจากการสร้างผนังกันภายใน โดยทั่วไปเส้นใยมักมีผนังกันชั้นเดียวเพื่อความคงตัว และสร้างเป็นเส้นใยแข็ง (Kalakoutskii และ Agre, 1976) เป็นการยากที่จะสรุปความหลากหลายทั้งหมดของลักษณะโคโลนีเช่นเดียวกับการชั่งสปอร์ของแอกติโนมัยซีด ความแตกต่างของสายใยอาหารและสายใยอากาศจึงนำมาใช้เป็นหลักในการแยกชนิดของโคโลนี เช่น กรณีของ *Streptomyces* มีทั้งสายใยอาหารและสายใยอากาศเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี ดังรูปที่ 2.1 ใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีสายใยอากาศ นอกจากนี้ยังพบว่า *Sporichthya* จะมีวงชีวิตที่สมบูรณ์เมื่อมีการสร้างสายใยอากาศสั้นๆ โคโลนีของแอกติโนมัยซีดอาจฟู (raised) หรือเรียบแบน (flat) บางครั้งปกคลุมด้วยชั้นที่มีลักษณะคล้ายหนัง (leather) ลักษณะอาจมีตั้งแต่นุ่มมาก เหนียวจนถึงแข็งมาก สีของโคโลนีเช่น ขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง ฟ้ำ เทียว น้ำตาลและดำ พื้นผิวของโคโลนีอาจมีลักษณะเรียบ (smooth) ขูด (ridged) ขรุขระ (rough) เป็นรอยย่น (wrinkled) เป็นเม็ดเล็ก (granular) เป็นผง (powder) หรือเป็นเกล็ด (squamous) ขนาดของโคโลนีขึ้นอยู่กับ สปอร์ อายุ และสภาวะในการเจริญเติบโต เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร



**รูปที่ 2.1** การพัฒนาของสายใยของ *Streptomyces* A : การงอกของสปอร์ B : การสร้างสายใยอาหาร C : ขอบของโคโลนีที่กำลังเจริญเติบโตพร้อมกับการสร้างสปอร์ของสายใยอากาศ [ที่มา Atlas of Actinomycetes(1997)]

โดยตัวอย่างวงชีวิตของแอกติโนมัยซีตที่สามารถศึกษาระยะต่างๆได้ชัดเจน และเป็นสายพันธุ์ที่มีการศึกษาระดับพันธุกรรมอย่างกว้างขวางคือ *Streptomyces coelicolor* แสดงดังรูปที่ 2.2 Chater (1993) ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในระยะต่างๆของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) มียีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในระยะต่างๆ โดยภายใต้สภาวะที่เหมาะสม germ tube งอกออกมาจากสปอร์ เจริญโดยการยืดยาวและแตกแขนงบริเวณปลายเส้นใย ได้เส้นใยอาหารจำนวนมาก หลังจากนั้น 2-3 วัน เส้นใยอากาศจะเจริญแทงขึ้นมาจากในอาหารออกสู่อากาศซึ่งถูกควบคุมโดย ยีน *blc* จากนั้นเจริญโดยการยืดยาวบริเวณปลายเส้นใย เมื่อเส้นใยอากาศเจริญเต็มที่ ยีน *whiG* และ *whiJ* ควบคุมให้ปลายเส้นใยม้วนเป็นเกลียว หลังจากนั้น ยีน *whiA whiB whiH* และ *whiI* ควบคุมให้มีการแบ่งเซลล์ที่ปลายเส้นใยโดยการสร้างผนังกันแบ่งเส้นใยออกเป็น ส่วน ๆ ยีน *whiD* และ *sigF* ควบคุมให้ผนังเซลล์หนาขึ้นเป็นผนังสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนต่อความแห้ง และ ยีน *whiE* ควบคุมให้สปอร์มีสีเข้มขึ้น

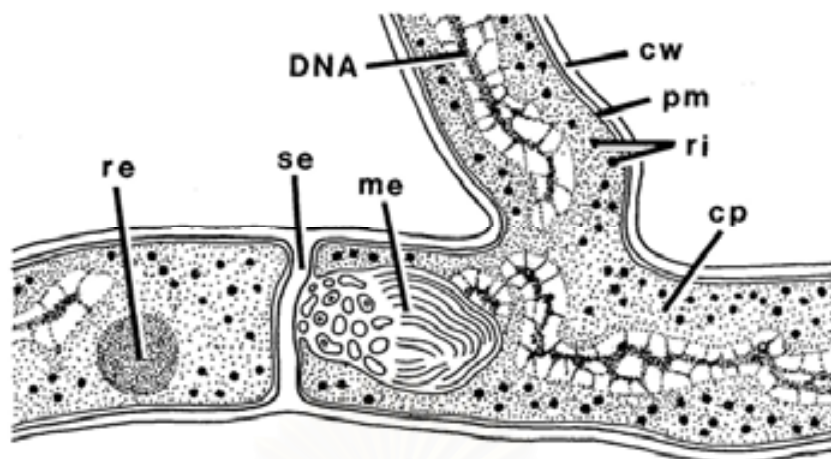


**รูปที่ 2.2** แสดงตัวอย่างวงชีวิต (life cycle) ของแอกติโนมัยซีต *Streptomyces coelicolor* [ที่มาจาก Atlas of Actinomycetes (1997)]

### 2.2.2 โครงสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีต

โคโลนีของแอกติโนมัยซีตจะมีสายใย 2 แบบ คือ สายใยอาหาร (substrate mycelium) และสายใยอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งจะแสดงลักษณะและหน้าที่ทางชีววิทยาที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปแอกติโนมัยซีตจะมีการสร้างสายใยทั้ง 2 แบบ แต่บางชนิดสร้างเฉพาะสายใยอาหาร ปกติไม่พบผนังกันเซลล์ภายในสายใย แต่อาจพบได้ในช่วงแรกของกระบวนการแตกหักเป็นชิ้น ๆ (fragmentation) ของสายใย โครงสร้างภายในสายใยที่แสดงว่าแอกติโนมัยซีตเป็นโปรคาริโอต แสดงในรูปที่ 2.3 จะประกอบด้วย ผนังเซลล์ซึ่งหนาประมาณ 10-20 นาโนเมตร ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไซโตพลาสซึม ซึ่งมีบริเวณของสายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่าง ๆ ที่สะสมภายในเซลล์ เช่น polyphosphates, lipids หรือ polysaccharides มีพลาสมาเมมเบรน(plasma membrane)หรือเยื่อหุ้มเซลล์ ห่อหุ้มไซโตพลาสซึม ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์บางส่วนตรงบริเวณที่ติดกับผนังเซลล์ สามารถพัฒนาไปเป็นมีโซโซม (mesosomes)





**รูปที่ 2.3** องค์ประกอบภายในไซโตพลาสซึมของสายใยอาหารในแอกติโนมัยซีต (cp) ไซโตพลาสซึม, (pm) พลาสมาเมมเบรน, (cw) ผนังเซลล์, (me) มีโทโซม, (se) ผนังกันเซลล์, (ri) ไรโบโซม, (DNA) สายดีเอ็นเอ, และ (re) สารที่เก็บสะสมภายในเซลล์ [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

สายใยอาหาร คือ สายใยที่สร้างขึ้นในช่วงเป็น vegetative cell จะเจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน ช่วงแรกสีของสายใยจะเป็นสีขาวขุ่นหรือครีม แต่เมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะกลายเป็นสีเหลือง แดง เขียว ชมพู ส้ม หรือ น้ำตาล และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดการเจริญอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-6 ชั่วโมง โดยจะมีการสร้างท่อเจริญ (germ tube) หนึ่งท่อหรือหลายท่อ ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นสายใยที่ยาวขึ้นและพัฒนาไปเป็นสายใยที่ซับซ้อนยิ่งขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของสายใยประเภทนี้พบตั้งแต่ 0.2-0.8 ไมโครเมตร บางชนิดสายใยมีลักษณะโค้งและแตกแขนง โครงสร้างของสายใยจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภาวะที่เชื้อเจริญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิและสารเคมี เมื่อเชื้อมีอายุมากสายใยชนิดนี้จะมีการแตกหักเป็นชิ้นส่วนสั้น ๆ บางชนิดอาจมีการแตกหักอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูงหรือเจริญอยู่ในภาวะที่เป็นของเหลว (Sykes และ Skinner, 1973)

สายใยอากาศ (aerial mycelium) คือ สายใยที่สร้างขึ้นด้านบนของสายใยอาหาร พบมากในแอกติโนมัยซีตส่วนใหญ่โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* ลักษณะของสายใยอากาศจะแตกต่างกันไปตามกลุ่มของแอกติโนมัยซีต ส่วนประกอบของอาหาร และสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1-1.4 ไมโครเมตร การเจริญของสายใยอากาศจะเริ่มจากการแตกหน่อ (sprout) หรือแตกแขนง (branching) จากส่วนของเส้นใยอาหารแล้วเจริญขึ้นด้านบนสัมผัสกับอากาศ และเกิดการแบ่งตัว (subdivision) เพื่อเจริญต่อไปเป็นเซลล์ที่



จะพัฒนาไปเป็นสปอร์ต่อไป โดยปกติสายใยชนิดนี้จะมีลักษณะสั้นหรือยาว ตรงหรือโค้ง และมี การแตกแขนงจำนวนมาก สายใยอากาศจะเจริญปกคลุมทั้งโคโลนี เมื่อสังเกตดูจะอาจลักษณะ คล้ายฝุ่นซอสล์อยู่บนสายใยอาหาร แอคติโนมัยซีตบางกลุ่มสร้างสายใยอากาศที่มีลักษณะคล้าย วงแหวนเมื่อมองจากด้านบนของโคโลนี โดยลักษณะดังกล่าวเกิดจากการชักนำของยีนของสายใย ที่จะพัฒนาไปเป็นสปอร์ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปรากฏการณ์นี้คือ การแพร่ของสารเคมีบางชนิด ความเข้มของแสง อุณหภูมิและความชื้น (Waksman, 1950)

สปอร์ของแอคติโนมัยซีต การสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยซีตมีหน้าที่ในการ สืบพันธุ์และแสดงถึงความแตกต่างของชนิด สปอร์รูปร่างหลากหลาย เช่น กลม (globose) รูปไข่ (ovoid) รูปแท่ง (rod) และมีผิวสปอร์หลายรูปแบบ เช่น เรียบ (smooth) ขรุขระ (irregular rugose) รอยบุบเป็นร่องขนาน (parallel rugose) ปุ่ม (warty) ตุ่มยาว (tuberculate) หนาม (spiny) และ เป็นขน (hairy) การสร้างสปอร์แบ่งได้ 3 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอก คือ สปอร์เดี่ยว (single spore) สายสปอร์ (spores formed in chains) และสร้างสปอร์ภายใน อับสปอร์ (spore formed within sporangia)

1. กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว (monosporous) พบในหลายสกุล เช่น ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (sporophores) เกิดขึ้นบนสายใยอาหาร สร้างสปอร์ติดอยู่กับ ก้านชูสปอร์สั้น ๆ และแยกออกมาเดี่ยว ๆ การสร้างสปอร์เริ่มจากส่วนปลายสุดของเส้นใยมีการ พองตัวออก จากนั้นมีการสร้างผนังกันระหว่างก้านชูสปอร์และส่วนที่พองออกเป็นสปอร์ และสร้าง ผนังสปอร์หนาขึ้น (Kawamoto, 1989) ปลายสุดของก้านชูสปอร์อาจแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงของปลายก้านชูสปอร์ทำให้ *Thermomonospora* ที่สร้างสปอร์เดี่ยวตรงบริเวณ ปลายก้านชูสปอร์มีสปอร์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และอาจสร้างสปอร์บนเส้นใยอาหารด้วย *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายสายใยอากาศ มีก้านชูสปอร์สั้นและ ไม่แตกแขนง อาจเรียกสปอร์เดี่ยวของทั้ง 3 สกุลข้างต้นว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจาก ปลายเส้นใยมีการโป่งออก (Cross, 1970 อ้างถึงโดย McCarthy, 1989) ลักษณะการสร้างสปอร์ เดี่ยวของ *Micromonospora* *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* แสดงดังรูปที่



รูปที่ 2.4 แสดงการสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีตใน

(A) *Micromonospora*

(B) *Themomonospora*

(C) *Saccharomonospora*

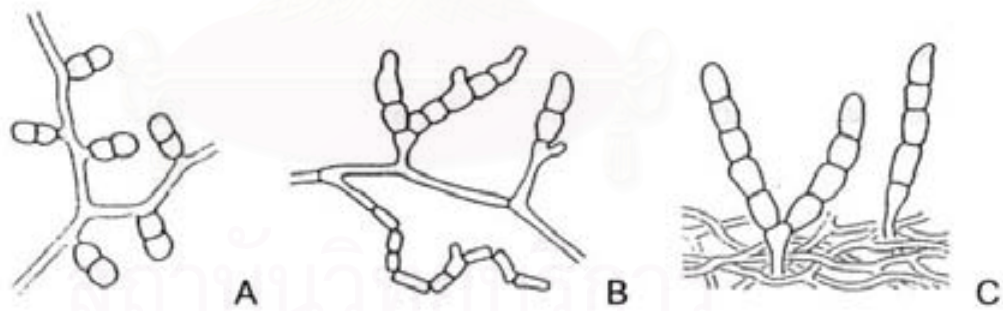
[ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

2. กลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสาย การสร้างสปอร์เป็นสายเกิดจากเส้นใยมีการแบ่งตัวเป็น segments ตามขวาง แต่ละ segments สามารถพัฒนาเป็นสปอร์ได้ ในแอกติโนมัยซีตมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้โดยพิจารณาถึงความยาวของสายสปอร์หรือจำนวนสปอร์ คือ สปอร์คู่ (bisporous) สปอร์สายสั้น (oligosporous) และสปอร์สายยาว (polysporous)

สปอร์คู่ ประกอบด้วย คู่ของสปอร์ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก มีลักษณะเป็นสปอร์คู่ทรงรีมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนสายใยอากาศโดยตรง หรือเกิดบนก้อนชูสปอร์สั้น ๆ ลักษณะสปอร์ของ *Microbispora* แสดงดังรูป 2.5 (A) การสร้างสปอร์ของ *Microbispora* เริ่มจากเส้นใยอากาศแตกหน่อออกทางด้านข้างเป็นกิ่งสั้น ๆ จากนั้นส่วนที่เป็นกิ่งมีการพองออกและสร้างผนังกันตรงกลาง แอกติโนมัยซีตที่สร้างสปอร์แบบ bisporous ไม่ได้พบเฉพาะในสกุล *Microbispora* เท่านั้นซึ่งลักษณะสปอร์ 2 สปอร์ ที่ต่อกันตามแนวยาวยังพบใน *Actinomadura echinospora* *Actinomadura rugatobispora* (Kroppenstedt และคณะ, 1990 อ้างอิงโดย Miyadoh และคณะ, 1990) และสกุล *Actinobispora* (Jiang และคณะ, 1991)

สปอร์สายสั้น ส่วนมากพบ 7-20 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ เช่น *Nocardia brevicatena* สร้างสปอร์สายสั้น ๆ บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ โดยมีจำนวนสปอร์ 2-7 สปอร์อยู่บนก้อนชูสปอร์ สายสปอร์อาจมีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใยอาหารแสดงดังรูป 2.5 (B) *Saccharopolyspora*

*rectivirgula* สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายมีจำนวนสปอร์น้อยกว่า 5 สปอร์บนก้านชูสปอร์ที่อยู่บริเวณด้านข้างและปลายของเส้นใย (Korn-Wendisch และคณะ, 1989) ในสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspora* สร้างสายสปอร์สั้น ๆ บนสายใยอากาศ จำนวนสปอร์บนสายสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์ จนถึง 20 สปอร์ สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง (straight) เป็นขอ (hooked) เป็นวงเปิด (open loop) หรือเป็นเกลียว (spiral) ที่ซ้อนกัน 1-4 ชั้น เช่น *Actinomadura pusilla* สร้างสายสปอร์เป็นเกลียวพันกันแน่น *Streptoverticillum* มีลักษณะเฉพาะคือ สร้างก้านชูสปอร์เป็นวงรอบเส้นใยแกน สายสปอร์สั้นอาจมีลักษณะบิดเป็นเกลียวซ้อนติดกัน หรือโค้งงอ และเส้นใยแกนที่มีสายสปอร์จะมีการบิดตัว (Locci และ Schofield, 1989) แสดงดังรูปที่ 2.6 (D) สกุล *Macrospora* *Microcelobospora* และ *Elytrosporangium* สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ในสายสปอร์สั้น ๆ อยู่บนสายใยอาหาร *Sporichthya polymorpha* สร้างสปอร์สายสั้นบนสายใยอากาศ ซึ่งสปอร์มีลักษณะเป็นรูปแท่งจนถึงรูปกลม *Catellatospora* สายสปอร์มีลักษณะตรงจนถึงโค้งงอ มีจำนวนสปอร์ 5-30 สปอร์ อยู่บนปลายก้านชูสปอร์ที่แทงขึ้นมาจากอาหาร ก้านชูสปอร์มีขนาดสั้นและอาจแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง (Asano และ Kawamoto, 1986) ดังแสดงในรูป 2.5 (C)



รูปที่ 2.5 แสดงแอกติโนมัยซีตกลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายคู่และสายสั้น  
 (A) การสร้างสปอร์แบบ disporous ของ *Microbispora*  
 (B) และ C. การสร้างสปอร์แบบ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena*  
 และ *Catellatospora* ตามลำดับ [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

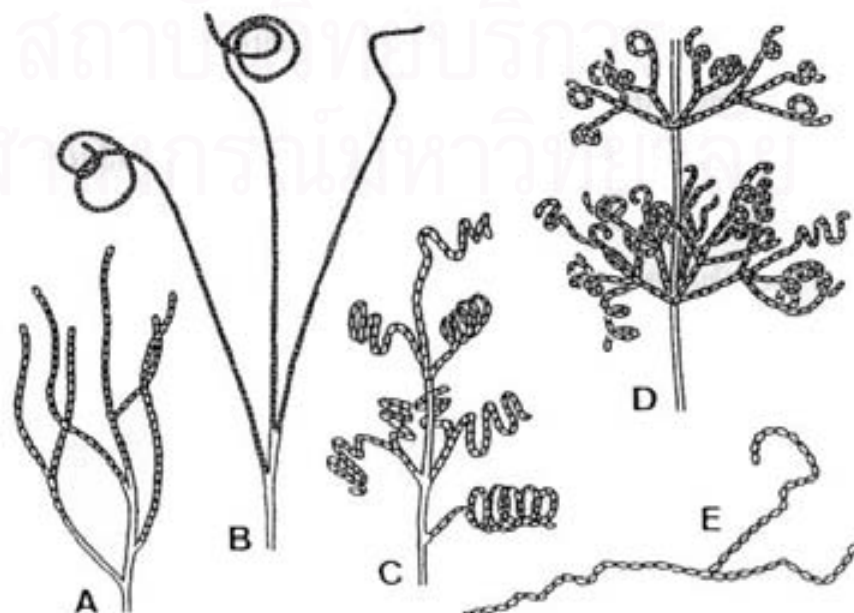
สปอร์สายยาว แอกติโนมัยซีตที่สร้างสปอร์สายยาวที่สำคัญ คือ สกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวมากกว่า 50 สปอร์ สปอร์ของ *Streptomyces* และแอกติโนมัยซีตชนิดอื่นที่มีสปอร์สายยาว มักเรียกว่าอาโทรสปอร์ (arthospores) คือมีการสร้างสปอร์เป็นสายโดยเกิดการแตกหักของเส้นใยที่เกิดจากการแบ่งเป็นส่วน ๆ ของเส้นใยเดิม



บริเวณที่เกิดการแตกหักเกิดจากการกระตุ้นโดยยีนแบบสุ่ม ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ (Ettlinger และคณะ, 1958 อ้างถึงโดย Pridham และคณะ, 1958 อ้างถึงโดย Korn-Wendisch และ Kutzner, 1992) การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* แสดงดังรูปที่ 2.6 (A B C และ D) ซึ่งมีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

- 1.) Rectiflexibiles ลักษณะของสายสปอร์ตรงหรือโค้งงอ
- 2.) Spira สายสปอร์เป็นเกลียว แยกออกได้เป็น 2 แบบ คือ เป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่น และเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาวยืดไม่ติดกันแน่น
- 3.) Retinaculiaperti ปลายสายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิด หรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1-3 ชั้น
- 4.) Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายกันหอย และแตกแขนงออกเป็นข้อ

ในบางกรณีสายสปอร์ขดเป็นเกลียวแน่นและมีสปอร์จำนวนมาก ทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์ หรือ pycnidia เช่นในสกุล *Actinosporangium* และ *Actinopycnidium* ส่วนในสกุล *Pseudonocardia* สร้างสายสปอร์บนสายใยอาหารและสายใยอากาศที่มีลักษณะซิกแซก (zigzag shaped) สกุล *Nocardiosis* สามารถสร้างสายสปอร์บนสายใยอากาศได้จำนวนมาก สปอร์อาจเป็นสายตรง งอ หรือซิกแซก (Meyer, 1989 อ้างถึงโดย Miyadoh และคณะ, 1997) แสดงดังรูปที่ 2.6 (E)

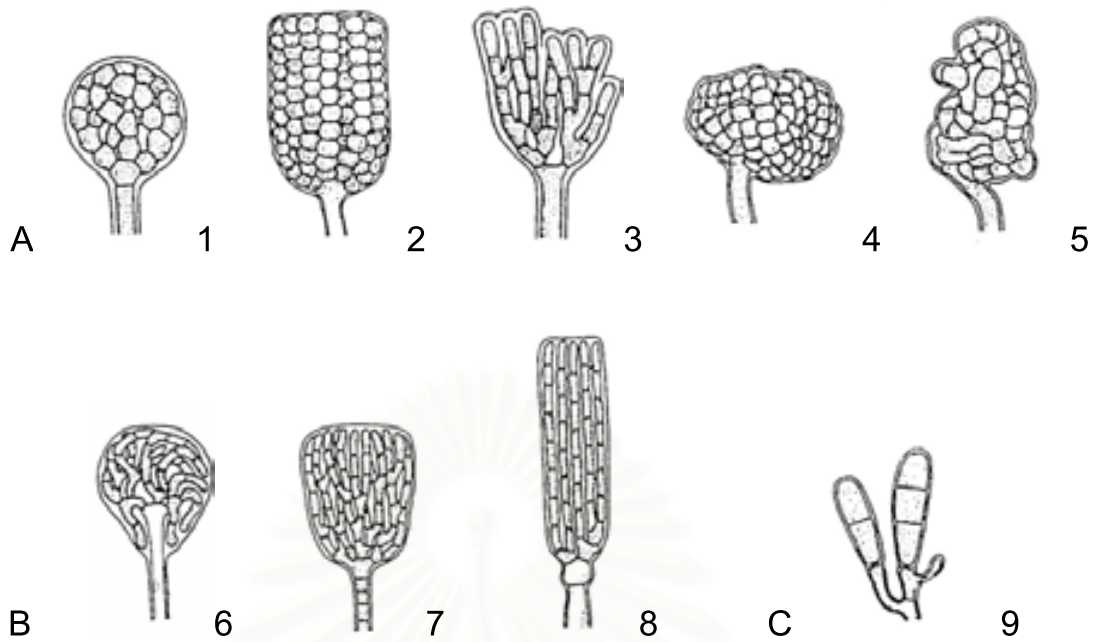


- รูปที่ 2.6** แสดงการสร้างสปอร์แบบสายยาวของแอกติโนมัยซีตใน สกุล *Streptomyces* :
- (A) Rectiflexibiles
  - (B) Retinaculiaperti
  - (C) Spira
  - (D) Verticillati
  - (E) fragmenting branched ในสายใยอากาศของสกุล *Nocardioopsis* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

3. กลุ่มที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมาย สามารถแบ่งกลุ่มที่สร้างอับสปอร์ได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหารและกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะทรงกลม หรือเกือบกลมจนถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-15 ไมโครเมตร อับสปอร์สร้างขึ้นบนสายใยอาหารโดยตรง โดยมีก้านชูอับสปอร์ (sporangiophore) ยื่นขึ้นมาจากสายใยอาหาร และที่ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์มีการแตกแขนงออกเป็นสายสปอร์หลายสายชดกันเป็นก้อนภายในผนังห่อหุ้ม บางสปีชีส์ในสกุล *Actinoplans* สร้างอับสปอร์รูปทรงกระบอก ทรงขวด ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 15 ไมโครเมตร ภายในอับสปอร์มีสปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย (Couch, 1963 อ้างถึงโดย Vobis, 1987) ลักษณะของอับสปอร์ในสกุล *Actinoplans* แสดงดังรูปที่ 2.7 (A) อีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์คือ *Pilimelia* อับสปอร์สร้างขึ้นบนผิวของอาหาร มีรูปทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10-15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งเรียงตัวเป็นแถวขนานกัน หรือคววนไม่เป็นระเบียบ ลักษณะของอับสปอร์ในสกุล *Pilimelia* แสดงดังรูปที่ 2.7 (B) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายสกุลที่มีการสร้างอับสปอร์ เช่น สกุล *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจำนวนสปอร์แบบ oligosporous คือ มีสปอร์ประมาณ 2-5 สปอร์อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้ว แสดงดังรูปที่ 2.7 (C) (Vobis และ Kothe, 1985)

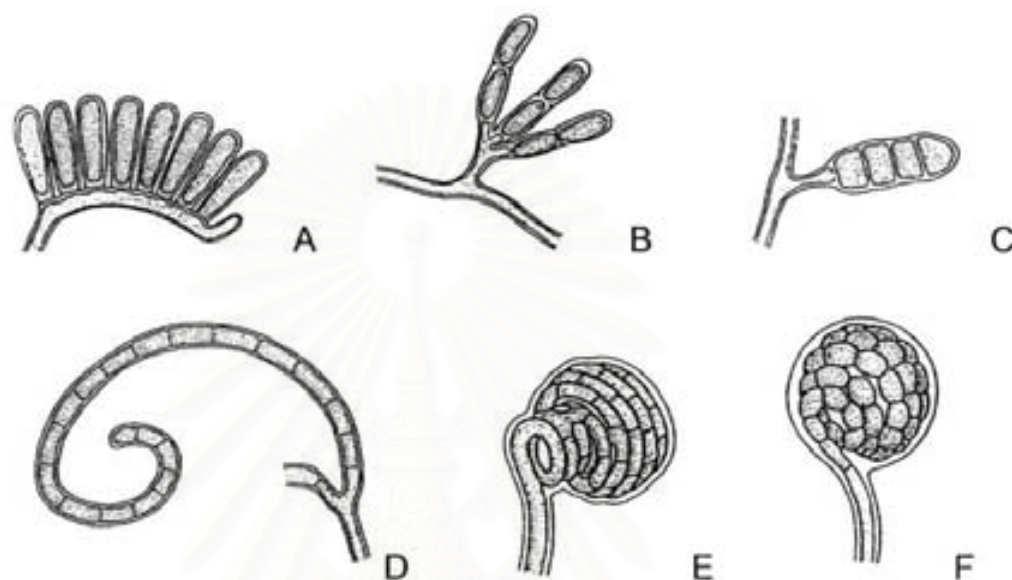




**รูปที่ 2.7** แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนสายใยอาหาร  
 (A) *Actinoplanes* : 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู่ 4. กิ่งทรงกลม  
 5. ไม่เป็นรูปทรง  
 (B) *Pilimelia* : 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก  
 (C) *Dactylosporangium* : 9. รูปทรงกระบอก  
 [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศแสดงดังรูปที่ 2.8 ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* สร้างอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในมีเพียงหนึ่งสปอร์ สกุล *Planobispora* สร้างสปอร์คู่ต่อกันตามยาวอยู่ภายในอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* สร้างอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ ต่อกันเป็นหนึ่งแถว (Runmao และคณะ, 1993) สกุล *Planopolyspora* เมื่อเจริญเต็มที่อับสปอร์จะมีลักษณะเป็นเส้นยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมากต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ภายในอับสปอร์ (Petrolini และคณะ, 1993) สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นรูปทรงกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเป็นสปอร์เดี่ยวต่อกันเป็นสายยาวขดเป็นวงอยู่ภายในอับสปอร์ ในปัจจุบันสกุล *Kutzneria* ได้ถูกแยกออกจากสกุล *Streptosporangium* ซึ่งสร้างอับสปอร์ลูกกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 48 ไมโครเมตร อับสปอร์มีผนังบางติดอยู่บนก้านชูสปอร์ยาว สกุล *Spirillospora* มีอับสปอร์เป็นรูปทรงกลม หรือรูปร่างเหมือนหนอน (vermiform) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-24 ไมโครเมตร สปอร์เรียงตัวกันเป็นสายและขดเป็นวง ภายในวง

ของสายสปอร์ที่มีการแตกแขนงของสายสปอร์ สปอร์เป็นรูปแท่ง และโค้งงอ (Williams และ Sharples, 1976 อ้างถึงโดย Petrolini และคณะ, 1992)



รูปที่ 2.8 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนสายใยอากาศ  
 (A) สกุล *Planomonospora* : สร้าง monosporous รูปกระบอง  
 (B) สกุล *Planobispora* : สร้าง disporous รูปทรงกระบอง  
 (C) สกุล *Planotetraspora* : สร้าง tetrasporous รูปทรงกระบอง  
 (D) สกุล *Planopolyspora* : สร้าง polysporous รูปทรงคล้ายท่อ  
 (E) สกุล *Spirillospora* : สร้าง polysporous รูปทรงกลม  
 (F) สกุล *Streptosporangium* : สร้าง polysporous รูปทรงกลม  
 [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

### 2.3 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีด

วิธีพื้นฐานในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีด คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะรูปร่างและสีของสายใยอากาศ สายใยอาหาร พื้นผิวของสปอร์ รูปแบบของสายสปอร์ และอับสปอร์ หรือการสร้างรงควัตถุ (diffusible pigment) นอกจากนี้ลักษณะทางเคมีของเซลล์ คือ องค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย dibasic amino acid สามารถแบ่งผนังเซลล์ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ I-IV โดยแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันไปตามกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ 3

ของสายเคตระเปปไทด์ (tetrapeptide) และไกลซีนในอินเตอร์เปปไทด์บริดจ์ (interpeptide bridges) และยังรวมถึงการวิเคราะห์รูปแบบน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ คือ อะราบินโนส (arabinose) ฟรุคโตส (fucose) กาแลคโทส (galactose) เมดูโรส (madurose) และไซโลส (xylose) โดยอ้างอิงการจัดจำแนกของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams และคณะ, 1989) ในระยะหลังได้มีการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ร่วมด้วย ทำให้ทราบถึงความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมเป็นเหตุผลนำมาซึ่งการแก้ไขโดยย้ายบางสกุล (Genus) ในวงศ์ (Order) เดิมไปอยู่ในวงศ์ใหม่ถึงแม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะแตกต่างกันก็ตาม นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นที่มีความสำคัญอีก คือ การสร้างรงควัตถุที่แพร่สู่อาหาร (diffusible pigment) และการสร้างรงควัตถุเมลานิน ตามรายละเอียดข้างต้นสามารถใช้ในการจำแนกแอกติโนมัยซีต ออกได้เป็น 8 กลุ่ม (Miyadoh และคณะ, 1997) และ (William และคณะ, 1994)

#### 1. *Micromonococcus Microbacterium* และสกุลที่ใกล้เคียง

กลุ่มนี้หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic) เป็น chemoorganotrophic ผนังเซลล์มี L-diaminopimelic acid (L-DAP) หรือ meso-diaminopimelic acid (meso-DAP) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ สมาชิกในกลุ่มนี้มีความหลากหลายเป็นอย่างมาก ได้แก่ สกุล *Micrococcus*, *Kineococcus*, *Luteococcus*, และ *Microlunatus* เป็นพวกที่ไม่สร้างเส้นใยมีเซลล์เป็นรูปกลม สกุล *Arthrobacter*, *Aureobacterium* และ *Curtobacterium* เซลล์มีลักษณะเป็นรูปกลม รูปแท่ง และรูปตัววี (V shaped) สกุล *Cellulomonas* เซลล์มีลักษณะเป็นรูปแท่งมีการแตกแขนงของเซลล์ *Oerskovia* และ *Dermatophilus* เป็นสกุลที่มีการสร้างเส้นใยอาหารและมีการแตกหักของเส้นใยกลายเป็นสปอร์เคลือบที่ได้อาศัยโดยเส้นใยมีผนังกันแบ่งตัวทั้งตามยาวและตามขวาง สกุล *Agromyces* สร้างเส้นใยอาหารและมีการแตกหักของเส้นใยเป็นสปอร์รูปกลม และรูปแท่ง ส่วนสกุล *Nocardioidea* และ *Promicromonospora* สร้างทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศและมีการแตกหักของเส้นใยกลายเป็นสปอร์รูปแท่ง

#### 2. *Mycobacterium Nocardia* และสกุลที่ใกล้เคียง

กลุ่มนี้มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ซับซ้อนประกอบด้วย meso-DAP micolic acid และ arabinogalactan ได้แก่ สกุลที่มีเซลล์เป็นรูปกลม และหรือรูปแท่ง ไม่สร้างเส้นใย คือสกุล *Corynebacterium* (มีการสร้างผนังกันตามขวางภายในเซลล์รูปแท่ง) *Gordona Thukamurella*



และ *Mycobacterium* (เซลล์เป็นรูปร่างบางครั้งสร้างเส้นใยที่มีการแตกแขนง) ส่วนสกุล *Rhodococcus* สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงยืดยาว และมีการแตกหักเป็นรูปกลมจนถึงแท่งสั้น *Nocardia* สร้างเส้นใยอาหารมีการแตกหักเป็นรูปกลมและรูปร่าง และสร้างเส้นใยอากาศมีสายสปอร์ (conidia) สั้นจนถึงยาว ในกลุ่มนี้มีสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม (*C. glutamium* และ *C. monoagenes* มีความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิก) และทางการแพทย์ (*M. bovis* สายพันธุ์ BCG ใช้ผลิตวัคซีนป้องกันวัณโรค)

### 3. *Pseudonocardiaceae* และสกุลที่ใกล้เคียง

กลุ่มนี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP มีน้ำตาล arabinose galactose และ rhamnose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ กลุ่มที่สร้างสายสปอร์ยาวบนสายใยอากาศ คือ *Actinopolyspora*, *Amycolatopsis* (สร้างสายสปอร์ในเส้นใยอาหารด้วย), *Saccharopolyspora*, *Actinokineospora* (สปอร์เคลื่อนที่ได้) และ *Lentzea* ส่วนสกุล *Pseudonocardia* และ *Saccharothrix* สายใยอากาศมักเป็นรูปขี้กแรก สกุล *Saccharomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนสายใยอากาศ สกุลที่สร้างโครงสร้างคล้ายอับสปอร์รูปกลม (pseudosporangium) บนสายใยอากาศ ได้แก่ *Kibdelosporangium* (สร้างทั้งสายสปอร์และโครงสร้างคล้ายอับสปอร์ สปอร์เคลื่อนที่ได้) *Kutzneria* และ *Thermocrisum* ในสกุล *Actinosynnema* สร้างสายสปอร์บน synnemata ที่ถูกสร้างขึ้นบนสายใยอาหาร (สปอร์เคลื่อนที่ได้)

### 4. *Micromonosporaceae*

กลุ่มนี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP หรือ L-lysine มีน้ำตาล xylose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ มีชั้น peptidoglycan ชนิด glycolyl กลุ่มนี้ส่วนมากเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงแต่ไม่แตกหัก แบ่งออกได้เป็นกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหารซึ่งภายในบรรจุสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ สกุล *Actinoplanes* *Pilimelia* (สร้างอับสปอร์ทรงกลม หรือ ทรงกระบอก ภายในบรรจุสปอร์จำนวนมาก) และ *Dactylosporangium* (สร้างอับสปอร์รูปนิ้ว ภายในบรรจุสปอร์แถวเดียว 2-4 สปอร์) กลุ่มที่ไม่สร้างอับสปอร์แต่สร้างสปอร์บนสายใยอาหาร คือ สกุล *Micromonospora* (สร้างสปอร์เดี่ยวทรงกลมขนาดใหญ่) และ *Catellatospora* (สร้างสปอร์สายสั้น) และยังมีกลุ่มที่สร้างเส้นใยอากาศจำนวนน้อยสร้างสปอร์สายสั้นบนเส้นใยอากาศโดยสายสปอร์และสายใยอากาศมักพันกันเป็นก้อนกลมคล้ายอับสปอร์ คือ สกุล *Catenuloplanes* และ *Couchioplanes* (สปอร์เคลื่อนที่ได้)

## 5. Thermomonosporaceae

กลุ่มนี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP เส้นใยอาหารแตกแขนงแต่ไม่แตกหัก ได้แก่ สกุล *Thermomonospora* ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เป็นพวก thermophilic เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45-50 °C แยกได้จากกองอินทรีย์วัตถุที่เกิดการหมัก สร้างสปอร์เดี่ยว (aleuriospores) ที่ปลายก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงจากเส้นใยอากาศ อาจสร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารด้วย ส่วนในสกุล *Actinomadura* มีน้ำตาล madurose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ สร้างสายสปอร์แบบ artrospores สายสปอร์อาจสั้นหรือยาวมีลักษณะตรง ม้วน หรือขดเป็นวง ผิวสปอร์เรียบ ขรุขระ หรือเป็นหนาม

## 6. Streptosporangiaceae

กลุ่มนี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP มีน้ำตาล madurose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ สมาชิกในกลุ่มนี้มีความหลากหลาย ใช้จำนวนสปอร์ และการสร้างสปอร์ในอับสปอร์ หรือสร้างสายสปอร์บนก้านชูสปอร์เป็นเกณฑ์ในการแบ่งสกุล สมาชิกในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่สร้างสายสปอร์หรืออับสปอร์บนเส้นใยอากาศ กลุ่มที่สร้างสปอร์สายสั้น ๆ คอนนิตีเดียร์ไม่เคลื่อนที่ ได้แก่ *Microbispora* (2 สปอร์) และ *Microtetraspora* (4 สปอร์) กลุ่มที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ สปอร์เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Planobispora* (สองสปอร์เรียงต่อกันในอับสปอร์รูปกระบอก) *Planomonospora* (หนึ่งสปอร์อยู่ในอับสปอร์รูปทรงกระบอก) หรือสกุลที่สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สร้างสปอร์จำนวนมากขดเป็นวงอยู่ในอับสปอร์ทรงกลม คือสกุล *Streptosporangium*

## 7. Streptomycetaceae

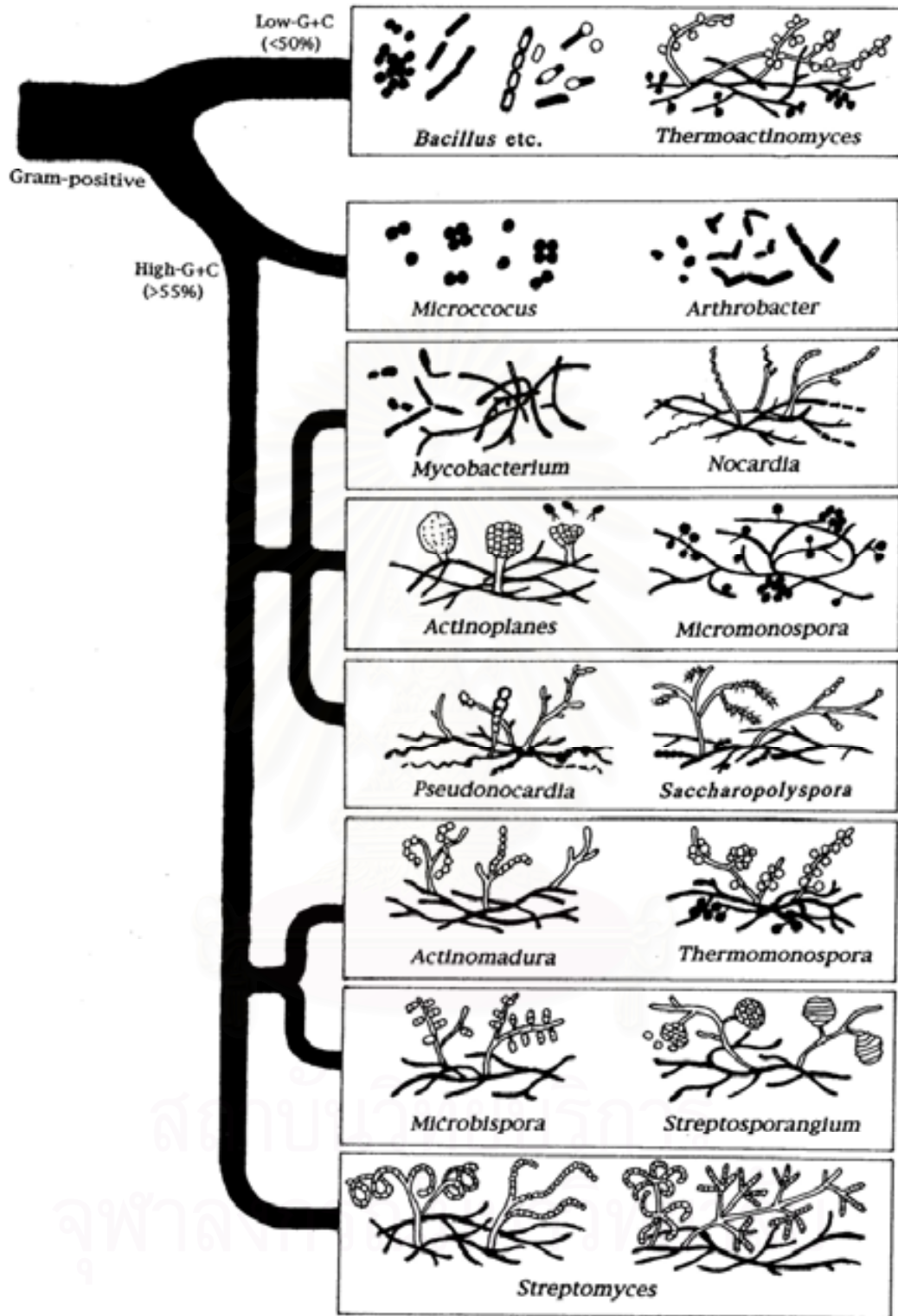
กลุ่มนี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย L-DAP หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic) เป็น chemoorganotrophic เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดในพื้นที่ดินสิ่งแวดล้อม ได้แก่ *Streptomyces* เส้นใยอาหารแตกแขนงและแตกหักเล็กน้อย สร้างสายสปอร์ยาวประกอบด้วยคอนนิตีเดียร์มากกว่า 50 คอนนิตีเดียร์ บนเส้นใยอากาศที่เจริญเต็มที่ สายสปอร์อาจมีลักษณะโค้ง ปลายงอเหมือนตะขอ ปลายม้วนเป็นวง ขดเป็นเกลียว ผิวคอนนิตีเดียร์อาจเรียบ ขรุขระ มีหนามหรือมีขน มีจำนวนน้อยที่สร้างสปอร์สายสั้น หรืออาจจะมีโครงสร้างคล้าย Sclerotia pycnidia sporangia และ synnemata ส่วนสกุล *Streptoverticillium* สร้างเส้นใยอากาศเป็นสายตรง มีก้านชูสปอร์แตกแขนงออกเป็นวง (verticils) รอบเส้นใยหลัก ปลายก้านชูสปอร์สร้างสปอร์สายสั้นหลายสาย ผิวสปอร์เรียบ หรือขรุขระเล็กน้อย



## 8. กลุ่มอื่น ๆ

เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจัดเข้าในกลุ่มอื่นได้ เช่น *Frankia* สร้างเฉพาะเส้นใยอาหารอาศัยอยู่ในปมรากพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่วทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน *Geodermatophilus* เชลล์มีลักษณะกลมถึงสี่เหลี่ยมแบ่งเชลล์โดยการสร้างผนังกันตามยาวและตามขวาง *Nocardiopsis* สร้างสปอร์สายยาวบนเส้นใยอากาศ *Kineosporia* สร้างโครงสร้างคล้ายอับสปอร์รูปกระบอกบนเส้นใยอาหาร *Spirillospora* สร้างสายสปอร์ขดอยู่ในอับสปอร์รูปกลมบนเส้นใยอากาศ สายสปอร์มีการแตกแขนง *Sporichthya* มีความแตกต่างจากลักษณะของแอกติโนมัยซีตตามปกติคือไม่สร้างเส้นใยอาหาร สร้างแต่เส้นใยอากาศสายสั้นที่แบ่งตัวเป็นรูปแท่ง *Actinocorallia* สร้างสปอร์สายยาวเป็นกลุ่มที่ปลายก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงจากเส้นใยอาหาร *Actinobisposa* สร้างสปอร์รูปไข่ 2 สปอร์ต่อกันตามยาวบนเส้นใยอาหาร อาจมีการสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศที่สร้างขึ้นอย่างเบาบาง *Glycomyces* สร้างสายใยอาหารและสายใยอากาศที่ไม่มีการแตกหัก สร้างสปอร์สายสั้น *Thermoactinomyces* สร้างสปอร์เดี่ยวทั้งบนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศภายในสปอร์ประกอบด้วย dipicolinic acid ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูงเหมือนกับ endospores ใน แบคทีเรีย สกุล *Bacillus* ซึ่ง *Thermoactinomyces* มีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีนและไซโตซีน ใน DNA น้อยกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA มีความใกล้เคียงกับ สกุล *Bacillaceae* มากกว่าแอกติโนมัยซีต

นอกจากการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีแล้ว ยังสามารถใช้วิธีทางอณูพันธุศาสตร์ โดยการวิเคราะห์ลำดับยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA อาจให้ผลการจำแนกได้ถึงระดับวงศ์ (family) ดังรูปที่ 2.9 โดย *Thermoactinomyces* ซึ่งจัดเป็นแอกติโนมัยซีตเนื่องจากการสร้างสายใยและสปอร์สำหรับสืบพันธุ์กลับมีความใกล้ชิดกันทางพันธุศาสตร์กับแอกติโนมัยซีตกลุ่มอื่น ๆ น้อยกว่า *Micrococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีการสร้างเส้นใย *Actinomadura* และ *Thermomonospora* ซึ่งถูกจัดอยู่คนละกลุ่มใน *Bergey's manual* เนื่องจากมีโครงสร้างสปอร์แตกต่างกัน กลับมีความใกล้ชิดทางพันธุศาสตร์มากเมื่อเปรียบเทียบความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 2.9 แสดงระดับความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของแอกติโนมัยซีต และแบคทีเรียกลุ่มอื่น โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

## 2.4 การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีด

ในดินพบแอกติโนมัยซีดมากเป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรียชนิดอื่น (Sykes และ Skinner, 1973) หน้าที่ที่สำคัญในธรรมชาติ คือทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) อินทรีย์วัตถุในดิน โดยการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญได้หลากหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญคือ เซลลูเลส แอกติโนมัยซีดมีความสามารถในการย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน ได้แก่ ซากพืช ซากสัตว์ และสารไบโอโพลิเมอร์ต่างๆ เช่น เซลลูโลส เคราติน เพคติน และไคติน เป็นต้น (ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ, 2546) รวมทั้งปุ๋ยหมัก ซึ่งเป็นปุ๋ยอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ส่วนใหญ่ได้มาจากพืชที่ถูกหมักให้ย่อยสลายโดยกระบวนการของจุลินทรีย์ต่างๆกัน แอกติโนมัยซีดเป็นหนึ่งในกลุ่มจุลินทรีย์ที่สำคัญในการย่อยสลายวัสดุอินทรีย์หรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในกระบวนการทำปุ๋ยหมัก ในระหว่างการย่อยสลายวัสดุเศษพืชโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์แบบต้องการอากาศ จะมีผลทำให้สภาพแวดล้อมทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพบางประการเปลี่ยนแปลง มีผลต่อเชื้อก่อโรคพืชและศัตรูบางชนิด เช่น เกิดปฏิกริยาระหว่างจุลินทรีย์ในกองปุ๋ย และเชื้อก่อโรคพืช รวมถึงประโยชน์บางประการของจุลินทรีย์อันเนื่องมาจากกองปุ๋ยหมักเช่น เร่งอัตราการย่อยสลายในกองปุ๋ยหมัก ช่วยยับยั้งหรือทำลายโรคพืชบางชนิดในกองปุ๋ยหมัก ช่วยทำลายไข่ของแมลงบางชนิด ช่วยเพิ่มคุณภาพของปุ๋ยหมัก เป็นต้น

### 2.4.1 รายงานเกี่ยวกับการแยกแอกติโนมัยซีด

Reiner และคณะ (2005) ได้มีการค้นพบสายพันธุ์ใหม่ของแอกติโนมัยซีดจีแนส *Micromonospora* 8 สปีชีส์คือ *Micromonospora citrea* sp. nov. *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov. *Micromonospora echinofusca* sp. nov. *Micromonospora fulviviridis* sp. nov. *Micromonospora inyonensis* sp. nov. *Micromonospora peucetia* sp. nov. *Micromonospora sagamiensis* sp. nov. และ *Micromonospora viridifaciens* sp. nov. โดยศึกษาทางสัณฐานวิทยา การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การจำแนกกลุ่มโดยใช้สารเคมี การสร้างสารทุติยภูมิ ยีน และทำการยืนยันสปีชีส์โดย mass spectrometric analysis โดย matrix adsorbed laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF)

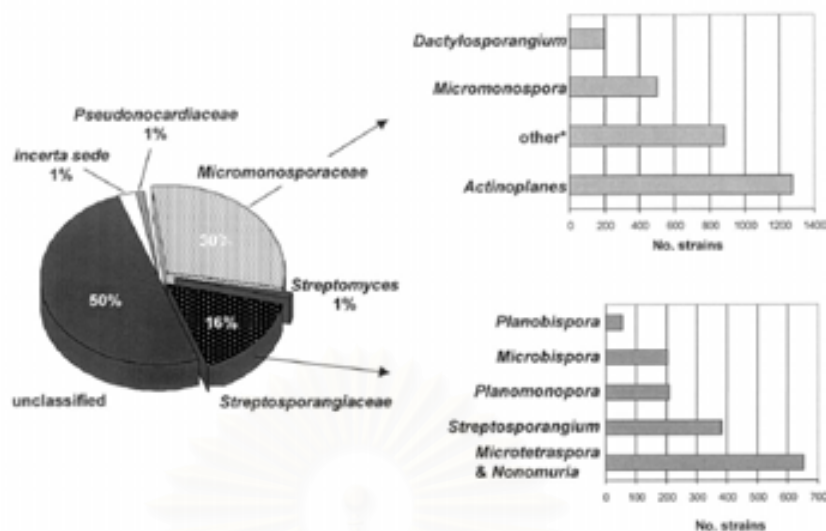
Boudemagh และคณะ (2005) ได้ทำการแยกและชี้บ่งชนิดของแอกติโนมัยซีดในระดับโมเลกุล จาก Saharian soils ทางตะวันออกเฉียงใต้ของอัลจีเรีย แยกได้ 27 สายพันธุ์และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราด้วยวิธี Agar piece method ตัวอย่างดินจากบริเวณต่างกัน มีจำนวนของแอกติโนมัยซีดต่างกันด้วย พบว่าอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการคัดแยกเชื้อ

แอกติโนมัยซีตจากบริเวณดังกล่าวคือ GLM medium ซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญคือกลูโคส ยีสต์สกัด และมอลต์ พบสองสายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการสร้างสารต้านเชื้อราและยีสต์ การขีบ่งใช้ universal 16s rDNA primers สองสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพนี้พบว่าอยู่ในจีนัส *Streptomyces*

Zaitlin และคณะ (2004) ศึกษาผลของการไถพรวนและปุ๋ยอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของแอกติโนมัยซีตในดิน และศึกษาการยับยั้งเชื้อราโดยแอกติโนมัยซีตบางชนิด โดยเริ่มจากการลดการไถพรวนและกำหนดให้มีความแตกต่างของไนโตรเจนของ barley และ canola มีการทดสอบความ antagonism ระหว่างแอกติโนมัยซีต(*Streptomyces*) 10 สายพันธุ์กับเชื้อราก่อโรคในพืช 10 สายพันธุ์ พบว่า *Streptomyces halstedii* และ *Streptomyces rochei* มีประสิทธิภาพดีที่สุด ทำการนับจำนวนของ *Streptomyces halstedii* และนับจำนวนของแอกติโนมัยซีตทั้งหมดในฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง พบว่าการลดการไถพรวนทำให้จำนวนของ *Streptomyces halstedii* และนับจำนวนของแอกติโนมัยซีตทั้งหมดลดลงทั้งในฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง การไม่มีการไถพรวนเลยทำให้จำนวน *Streptomyces halstedii* เท่านั้นที่ลดลงในฤดูใบไม้ผลิ ในโตรเจนไม่มีผลต่อจำนวนแอกติโนมัยซีตทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนต่ำทำให้จำนวน *Streptomyces halstedii* ลดลงเล็กน้อยในฤดูใบไม้ผลิ พบ *Streptomyces halstedii* ใน canola residue งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า ความแตกต่างของกิจกรรมทางการทำการเกษตรอาจจะไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อจำนวนและความหลากหลายของแอกติโนมัยซีตในดิน

Stefano และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาเทคนิคทางจุลชีววิทยาเพื่อใช้ในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ในประเทศอิตาลีได้มีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์แล้วมากกว่า 50,000 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นแอกติโนมัยซีตและรา โดยหลักการในการค้นพบสารเหล่านี้ คือการคัดแยกจุลินทรีย์โดยขณะเดียวกันต้องมีความสามารถเป็นผู้ผลิตสารทุติยภูมิที่ดีด้วย ได้มีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลมาใช้ เพื่อพัฒนาวิธีการค้นหาในระดับโมเลกุล และเพื่อความรวดเร็ว พบแอกติโนมัยซีตที่หายากหลายชนิด อย่างไรก็ตามถึงแม้แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์หายากนั้นจะมีโอกาสในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ แต่ข้อมูลทางพันธุกรรมและสรีรวิทยายังคงต้องมีการศึกษาต่อไปอีกมาก เพื่อความรวดเร็วผู้วิจัยได้พัฒนาเวกเตอร์ที่สามารถรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ของแอกติโนมัยซีต โดยการสร้างกลุ่มของยีนจากชิ้นส่วนเล็กๆของ cloned DNA เป็นการเตรียม insert library ขนาดใหญ่จากสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่หายากและสร้าง environmental libraries ได้ความสัมพันธ์ของแอกติโนมัยซีตที่แยกได้ดังรูปที่ 2.10





**รูปที่ 2.10** แผนภูมิวงกลมแสดงการกระจายตัวของวงศ์ ของแอกติโนมัยซีตประมาณ 9,300 สายพันธุ์ที่แยกได้ในช่วงปีค.ศ.1996-2000. สัดส่วนของจำนวนแอกติโนมัยซีตที่แยกได้ส่วนใหญ่พบว่า เป็นสายพันธุ์ต่างๆในวงศ์ Micromonosporaceae และ Streptosporangiaceae

Boudjella และคณะ (2005) แยก *Streptosporangia* จากดินในทะเลทราย sahara (Saharan) โดยการนำดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปิเปตสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ citin-B vitamins agar ที่เติม kanamycin 25 ug/ml และ cycloheximide 50 ug/ml

Suzuki และคณะ (2001) แยกสกุล *Planomonospora* จากดิน โดยใช้อาหาร Humic acid-trace salts gellan gum ที่ pH9 เป็นอาหารที่ใช้คัดเลือก โดย *Planomonospora* สร้างอับสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถแยกสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้จากอับสปอร์โดยใช้ 0.1% skim milk 5 mM N-cyclohexyl-2-amino-ethanesulfonic acid (CHES) ที่ pH9 เป็นสารละลายในการล้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ออกมา จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ เป็นเวลา 90 นาที แยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที วิธีนี้สามารถแยกสกุล *Planomonospora* ได้ 246 สายพันธุ์จากดินตัวอย่างทั้งหมด 1,200 ตัวอย่าง

Suzuki และคณะ (2000) แยกสกุล *Actinobispora* จากดิน โดยการอบดินตัวอย่างที่อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.85% NaCl 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสปอร์ เจือจางสายละลายสปอร์ด้วย 0.85% NaCl และนำมาเกลี่ย (spread) บนผิวหน้าอาหาร Humic acid-vitamin gellan gum ที่เติมสารปฏิชีวนะ leucomycin



1 ug/ml, nivobiocin 1 ug/ml, tuniamycin 0.5 ug/ml, cycloheximide 50 ug/ml และ nystatin 50 ug/ml การใช้วิธีนี้สามารถแยกสกุล *Actinobispora* ได้ 18% ของตัวอย่างดิน

Hayakawa และคณะ (1996) แยก *Microtetraspora glauca* จากดิน โดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บีบเปิดสารละลายดิน 0.5 มิลลิลิตร ที่ระดับการเจือจาง  $10^{-1}$  เติมนลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (5 mmol/l, pH7.0) 5 มิลลิลิตร ที่มีการเติม benzethonium 0.05% บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที บีบเปิดสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหาร LSV-SE agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 20 mg, norfloxacin 20 mg และ nalidixic acid 10 mg/l

Hayakawa และคณะ (1991) แยก *Streptosporangium Dactylosporangium Micromonospora* และ *Microbispora* จากดินโดยแต่ละสกุลใช้วิธี pretreatment แตกต่างกัน คือ แยก *Streptosporangium* โดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม benzethonium chloride (BC) 0.01% นำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที บีบเปิดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนอาหาร HV agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg และ leucomycin 1 mg/L แยก *Dactylosporangium* โดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม benzethonium chloride (BC) 0.03% นำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที บีบเปิดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนอาหาร HV agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg และ tunicamycin 10 mg/L แยก *Micromonospora* โดยนำดินตัวอย่างมาตากลม นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.5 % นำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที บีบเปิดสารละลายเจือจาง 0.2 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนอาหาร HV agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg และ tunicamycin 20 mg/L แยก *Microbispora* โดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.5 % และ chlorhexidine gluconate 0.03% นำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที บีบเปิดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนอาหาร HV agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg

## 2.5 ปุ๋ยหมัก

ปุ๋ยหมัก หมายถึง ปุ๋ยอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ทำขึ้นโดยเลียนแบบธรรมชาติในป่า ได้จากเศษพืช มูลสัตว์มากองรวมกันแล้วเกิดการย่อยสลายโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์จนกระทั่งได้เศษวัสดุที่มีความคงทนต่อการย่อยสลาย มีสีน้ำตาลดำที่เรียกว่า ฮิวมัส มีสมบัติในการปรับปรุงดิน ทำให้ดิน

โปร่งเพิ่มความพรุนให้แก่ดิน ทำให้การระบายน้ำและอากาศในดินดีขึ้น ช่วยให้ดินอุ้มน้ำและการดูดซับธาตุอาหารของพืชดีขึ้น ช่วยเพิ่มปริมาณธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพของพืช ช่วยทำให้พืชและจุลินทรีย์เติบโตและส่งเสริมกิจกรรมต่างๆให้ดีขึ้น

### 2.5.1 ปัจจัยที่ควบคุมอัตราการย่อยสลายในกองปุ๋ยหมัก

#### 1. ลักษณะของเศษวัสดุ (Characteristic of plant residue)

ลักษณะของเศษวัสดุที่มีส่วนสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลาย ได้แก่

1.1 ขนาดของเศษวัสดุ ถ้าวัสดุมีขนาดเล็ก จะมีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก ทำให้ผสมคลุกเคล้าได้ทั่วถึงจึงถูกย่อยสลายได้มากกว่า ถ้าเศษวัสดุขนาดใหญ่จะผสมคลุกเคล้าไม่ทั่วถึง จึงควรกองเป็นชั้นๆ และการกลับกองปุ๋ยจะเป็นการช่วยผสมวัสดุให้เข้ากันดี แต่วัสดุขนาดใหญ่ที่มีลักษณะเป็นเส้นหรือท่อน จะทำให้มีการแพร่กระจายหรือระบายอากาศได้ดีกว่าวัสดุขนาดเล็ก

1.2 ความสดของเศษวัสดุ ปกติจะทำปุ๋ยหมักจากเศษพืชที่แห้งเพราะสะดวกในการกองและการควบคุมความชื้นและการระบายอากาศ แต่เศษพืชสดก็ทำปุ๋ยหมักได้แต่ต้องระวังเรื่องความชื้น เพราะถ้าปริมาณน้ำมากเกินไปการระบายอากาศจะไม่ดี อาจเกิดกระบวนการเน่าเสียและเกิดกลิ่นเหม็นได้ ดังนั้นถ้าเป็นเศษพืชสด เช่น ผักตบชวา ก็อาจนำมาตากแดด 2-3 วัน ก่อนนำไปทำปุ๋ยเพื่อระเหยน้ำออกไปบ้าง หรือนำมาผสมวัสดุอื่นเช่น ฟางข้าว

#### 2. องค์ประกอบทางเคมีของเศษวัสดุ (Composite of residue)

วัสดุที่นำมาทำปุ๋ยหมักมักจะพิจารณาถึงอัตราส่วนของสารประกอบคาร์บอนต่อไนโตรเจนของเศษวัสดุนั้นๆ เพราะโครงสร้างของเศษพืชส่วนมากไม่ค่อยแตกต่างกันมาก องค์ประกอบไนโตรเจนจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดอัตราการย่อยสลาย วัสดุเศษพืชที่นำมาทำปุ๋ยหมักแบ่งได้ 2 พวกคือ พวกที่ย่อยสลายได้ง่ายและพวกที่ย่อยสลายได้ยาก

สารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะย่อยสลายสารอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจน จนได้โมเลกุลเล็กและนำเข้าไปในเซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และสร้างส่วนประกอบของเซลล์ ปกติเซลล์จุลินทรีย์จะมีค่า C/N ratio ประมาณ 10-15 ซึ่งหมายความว่าถ้าจุลินทรีย์ดูดสารอินทรีย์คาร์บอนเข้าไปใช้ในเซลล์ 10-15 หน่วย จำเป็นต้องดูดสารประกอบไนโตรเจนเข้าไปด้วย 1 หน่วย จึงทำให้เกิดความสมดุลของสารประกอบทั้งสองในเซลล์และจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้

การทำปุ๋ยหมักจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีค่า C/N ratio ต่ำเช่น ต้นพืชตระกูลถั่วต่างๆ อาจไม่จำเป็นต้องเติมสารไนโตรเจน หรืออาจเติมในปริมาณที่น้อยกว่าที่ใช้กับเศษพืชที่มี C/N ratio สูง พวกเศษพืชตระกูลถั่วมีปริมาณไนโตรเจนค่อนข้างสูงกว่าเศษวัสดุการเกษตรชนิดอื่น



ซึ่งจะมีผลต่อการเพิ่มอัตราการย่อยสลายได้มากขึ้น และใช้ระยะเวลาการย่อยสลายสั้นกว่าวัสดุที่มีปริมาณไนโตรเจนต่ำ (Cotrufo และคณะ, 1995)

นอกจากนี้ค่า C/N ratio ยังสามารถนำมาใช้ในการพิจารณาว่าปุ๋ยหมักที่ทำนั้นจะนำไปใช้ได้หรือไม่ โดยปกติถ้าปุ๋ยหมักมี C/N ratio ลดต่ำกว่าหรือเท่ากับ 20:1 ถือว่าปุ๋ยหมักนั้นสามารถนำไปใช้ได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อพืชและเป็นปุ๋ยหมักที่มีคุณภาพดี ในการผลิตปุ๋ยหมักถ้าวัสดุมีปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงพออัตราการย่อยสลายจะต่ำ ดังนั้นจึงควรเติมไนโตรเจนลงไปเพื่อลดค่า C/N ratio ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในกิจกรรมสร้างเซลล์ โดย C/N ratio ที่เหมาะสมในการย่อยสลายมีค่าประมาณ 30-35:1 ฉะนั้นในระยะเริ่มแรกควรปรับให้กองปุ๋ยหมักมีค่า C/N ratio อยู่ในช่วงดังกล่าว

### 3. ความชื้น (Moisture content)

ระดับความชื้นในกองปุ๋ยหมักที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายประมาณ 50-60% โดยน้ำหนัก ถ้าความชื้นต่ำกว่า 40% การย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ แต่ถ้าความชื้นสูงกว่า 80% กองปุ๋ยหมักจะแฉะเกินไป การระบายอากาศไม่ดีเกิดสภาพไม่มีอากาศ กระบวนการย่อยสลายจึงเกิดขึ้นได้ช้า เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเศษพืชส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการอากาศใช้ในการสร้างพลังงาน และมีผลทางอ้อมคือ สภาพไม่มีอากาศทำให้เกิดกลิ่นเหม็นภายในกองปุ๋ยหมัก ซึ่งเกิดจากสารอินทรีย์ระเหยจำพวกมีเทน และไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศและทำให้สูญเสียธาตุอาหารด้วย เช่น ไนโตรเจนจะเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนีย เป็นต้น

### 4. การระบายอากาศ (Aeration)

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเศษพืชประมาณ 90% ต้องการอากาศ และจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ออกมาเพื่อทำการย่อยสลายเศษพืชอย่างมีประสิทธิภาพ การกลับกองปุ๋ยหมักจึงเป็นการช่วยให้เกิดการย่อยสลายเร็วขึ้น

### 5. อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิเป็นส่วนที่ชี้ให้เห็นว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงในกองปุ๋ยหมักช้าหรือเร็ว เป็นตัวบ่งชี้กิจกรรมของจุลินทรีย์ หลังกองปุ๋ยหมักประมาณ 2-4 วัน อุณหภูมิภายในจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึง 50-60 °C เนื่องจากพลังงานความร้อนจากกระบวนการย่อยสลายถูกปลดปล่อย และวัสดุพวกสารอินทรีย์ทำให้ความร้อนที่เกิดขึ้นไม่ค่อยแพร่กระจายออกจากกองปุ๋ย อุณหภูมิภายในกองปุ๋ยหมักแบ่งเป็น 2 ระยะคือ

- ความร้อนปานกลางอยู่ในช่วงไม่เกิน 45 °C
- ความร้อนสูงอยู่ในช่วง 45-70 °C

จากรายงานของ Bertoldi และคณะ (1983) ได้รายงานเกี่ยวกับปริมาณจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูง พบว่า เชื้อจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีตสามารถทนและอยู่รอดได้ดี แต่

เชื้อราที่มีปริมาณลดลงและพบว่า ที่อุณหภูมิ 57-60 °C ความชื้น 60% กระบวนการย่อยสลายเกิดได้ดี โดยมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปลดปล่อยออกมามาก แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่านี้ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ปลดปล่อยจะลดลง แสดงว่าที่ระดับอุณหภูมิสูงอัตราการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุสูงกว่าในสภาพอุณหภูมิกปกติ

#### 6. pH

การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรไม่ค่อยมีปัญหา pH มากนักเพราะส่วนใหญ่ค่าจะอยู่ในช่วงกลางหรือกรดเล็กน้อย Gaur และคณะ (1980) รายงานว่า ในช่วง 2-3 วันแรก pH ของกองปุ๋ยหมักมีระดับลดลงเนื่องจากในช่วงแรกสามารถย่อยสลายวัสดุที่ย่อยสลายได้ง่ายอย่างรวดเร็วและผลิตกรดอินทรีย์บางชนิด มีผลทำให้ pH สูงขึ้นเล็กน้อย และจะรักษาระดับ pH อยู่ในช่วงระหว่าง 7.5-8.5

#### 2.5.2 ชนิดของจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมัก

จุลินทรีย์ที่พบมี 3 กลุ่มใหญ่คือ แบคทีเรีย ราและแอกติโนมัยซีด เชื้อแบคทีเรียพวกชอบอุณหภูมิปานกลางเป็นพวกแรกที่ปรากฏ ต่อมาภายหลังเมื่ออุณหภูมิภายในกองปุ๋ยสูงขึ้น แบคทีเรียพวกที่ชอบอุณหภูมิสูงจะปรากฏ ส่วนเชื้อราที่ขึ้นในอุณหภูมิสูงมักจะมีเจริญใน 5-10 วัน หลังการกองปุ๋ย ในช่วงสุดท้ายของกระบวนการเป็นปุ๋ยหมักเมื่ออุณหภูมิภายในกองปุ๋ยลดลง จะพบแอกติโนมัยซีดเจริญเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะสังเกตได้จากบริเวณรอบนอกกองปุ๋ยหมักมีสีขาว หรือน้ำตาลของกลุ่มโคไลนีเชื้อแอกติโนมัยซีด

#### 2.5.3 ประโยชน์ของจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยหมัก

ในระหว่างการย่อยสลายวัสดุเศษพืชโดยกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์แบบต้องการอากาศ จะมีผลทำให้สภาพแวดล้อมทั้งทางด้านการภาพ เคมี และชีวภาพบางประการเปลี่ยนแปลง มีผลต่อเชื้อก่อโรคพืชและศัตรูบางชนิด เช่น เกิดปฏิกริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ในกองปุ๋ยและเชื้อก่อโรคพืช รวมถึงประโยชน์บางประการของเชื้อจุลินทรีย์อันเนื่องมาจากกองปุ๋ยหมักเช่น เร่งอัตราการย่อยสลายในกองปุ๋ยหมัก ช่วยยับยั้งหรือทำลายโรคพืชบางชนิดในกองปุ๋ยหมัก ช่วยทำลายไข่ของแมลงบางชนิด ช่วยเพิ่มคุณภาพของปุ๋ยหมัก ช่วยลดต้นทุนในการทำปุ๋ยหมัก

#### 2.6 เซลลูโลส

เซลลูโลสมีอยู่ในปริมาณมากถึงครึ่งหนึ่งของน้ำหนักแห้งของชีวมวลในโลก อยู่ในรูปของโพลีเมอร์ที่ไม่มีกิ่ง ประกอบด้วยหน่วยของ D-glucose ต่อด้วยพันธะ 1,4-β glycosidic เป็นมหโมเลกุลซึ่งเป็นโครงสร้างผลึกซับซ้อน ไม่ละลายน้ำและค่อนข้างทนต่อการ Depolymerize โดยเอนไซม์และสารเคมี ในสภาวะธรรมชาติเซลลูโลสทั้งหมดประกอบด้วย hemicellulose และ

lignin ซึ่งทำให้จุลินทรีย์ย่อยได้ยากขึ้น (Wietse de Boer และคณะ, 2005) และเซลลูโลสยังเป็นส่วนหนึ่งของชีวมวล มีบทบาทในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ซึ่งมีความสำคัญต่อ Carbon cycle ดังรูปที่ 2.11

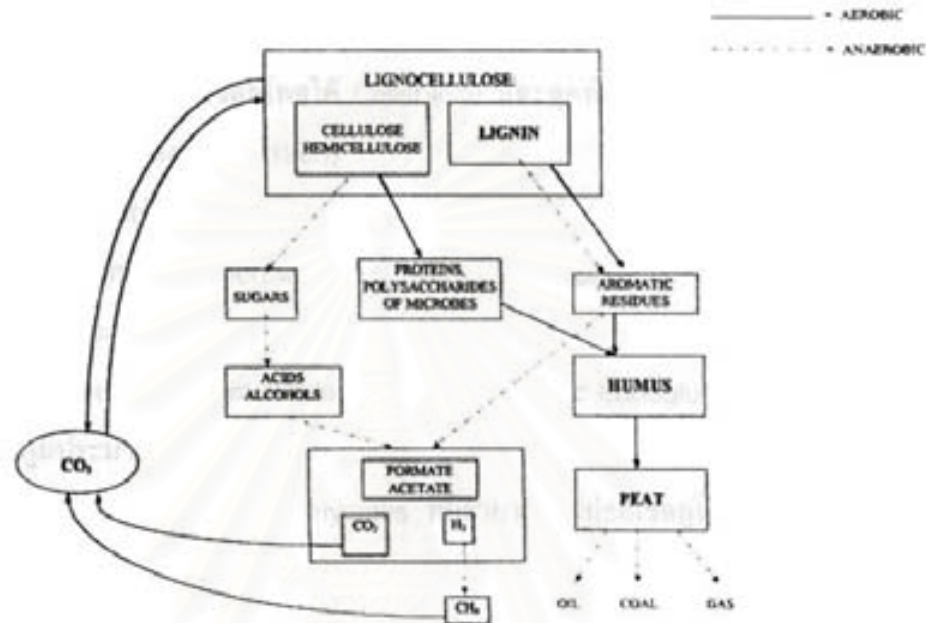


Fig. 1. Global carbon cycle (Brown, 1985; Colberg, 1988)

## รูปที่ 2.11 วงจรคาร์บอน (Wietse de Boer และคณะ, 2005)

### 2.7 เอนไซม์ที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีด

รองจากสารปฏิชีวนะแล้ว เอนไซม์นับว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญยิ่งของแอกติโนมัยซีด ปัจจุบันมีความต้องการเอนไซม์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้มากขึ้นทั้งจากแหล่งดั้งเดิมคือสัตว์และพืชชั้นสูง ทั้งยังมีแนวโน้มในการศึกษาค้นคว้าเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่คล้ายคลึงกันนี้จากจุลินทรีย์มากขึ้นด้วย การใช้เอนไซม์อย่างกว้างขวางเนื่องด้วยคุณสมบัติที่มีความจำเพาะเจาะจง สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ(Biocatalyst)

ด้วยความหลากหลายทางชีวภาพและความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ ทำให้แอกติโนมัยซีดเป็นแหล่งผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ที่สำคัญจำนวนมาก โดยแอกติโนมัยซีดสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มต่างๆเช่น กลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ที่สำคัญคือเซลลูเลส

เอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสถูกขับออกมาจากจุลินทรีย์ไปยังสิ่งแวดล้อมพร้อมกับเอนไซม์ที่ย่อยโพลีเมอร์ มีส่วนประกอบหลายอย่างของ lytic complex เอนไซม์ที่สามารถย่อย



เซลลูโลสได้ประกอบด้วย 3 กลุ่มคือ 1,4- $\beta$  glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.6) ทำหน้าที่เป็น endoglucanase 1,4- $\beta$ -D- glucan cellubiohydrolase (EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่เกี่ยวกับ exoglucanase activity และ  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย cellubiose

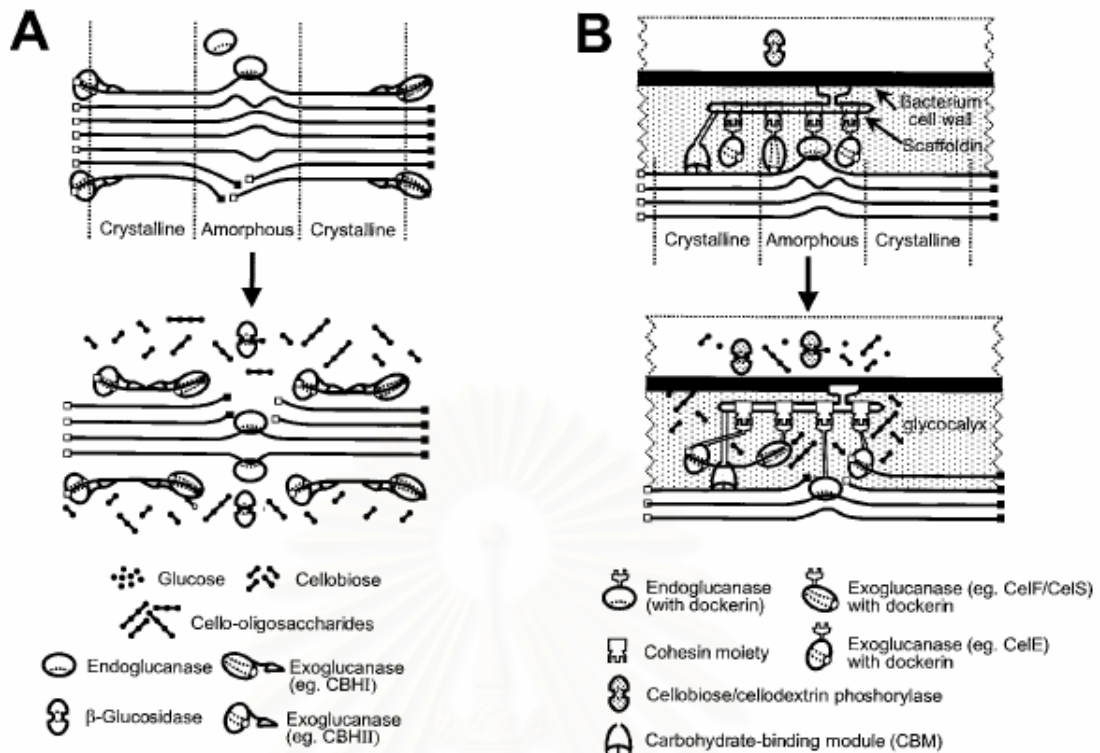
ระบบของเอนไซม์เซลลูเลสเป็นแบบทำงานร่วมกัน เช่น เอนไซม์ Endoglucanase ตัดสายของเซลลูโลสแบบสุ่มได้ Glucose และ Oligosaccharide เอนไซม์ Exoglucanase ย่อย Non-reducing end ของเซลลูโลสได้ Cellubiose และสุดท้าย Cellubiase ย่อย Cellubiose ได้ Glucose (Ryu และ Mendels, 1980)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาแอกติโนมัยซีดที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส โดยส่วนใหญ่เป็นพวก Thermophilic และ Mesophilic มีรายงานว่าสายพันธุ์ *Thermomonospora* มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสสูง โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างขึ้นจากสายพันธุ์นี้ประกอบด้วย Extracellular Exoglucanase และ Endoglucanase ทำงานได้ดีที่ pH 6 และอุณหภูมิประมาณ 60-70 °C

พวก Mesophilic actinomycetes ที่มีรายงานว่าย่อยเซลลูโลสได้ เช่น *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces flavogriseus*, *Streptomyces viridosporus* และเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 5-7 มี activity สูงสุดที่ 40-55 °C ทั้ง Mesophilic และ Thermophilic actinomycetes ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมเซลลูโลสชนิดละลายน้ำได้ ดังรูปที่ 2.12

เนื่องด้วยความหลากหลายของโครงสร้างและการละลายน้ำได้ยากของเซลลูโลสบริสุทธิ์ ทำให้มีความนิยมในการใช้เซลลูโลสที่ละลายน้ำได้คือ Carboxymethylcellulose(CMC) เป็นสารตั้งต้นมากขึ้นสำหรับการศึกษากการผลิตเอนไซม์ Endoglucanase

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.12 แผนภาพแสดงการไฮโดรไลซิสของ amorphous และ microcrystalline cellulose โดย (A) noncomplexed cellulase systems และ (B) complexed cellulase systems โดยรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าแสดง reducing ends และรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าแสดง nonreducing ends (Lee และคณะ, 2002)

### 2.7.1 รายงานเกี่ยวกับแอกติโนมัยซีตที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส

Wietse de Boer และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของธาตุอาหารที่เหมาะสมของการเจริญของจุลินทรีย์ในดิน พบว่าบทบาทของธาตุและแบคทีเรียในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่ย่อยได้ยากเช่น เซลลูโลสและลิกนิน อยู่ในรูปแบบแข่งขันและแบบพึ่งพาซึ่งกันและกัน รวมทั้งเกิดการย่อยสลายได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ การย่อยสลายเซลลูโลสแบบใช้อากาศพบในจุลินทรีย์ในดิน ทั้งชนิดที่มีสายใยเช่น *Streptomyces* *Micromonospora* และไม่มีสายใยเช่น *Bacillus* *Cellulomonas* อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าส่วนประกอบในระบบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสในแบคทีเรียและราจะมีความแตกต่างกันบ้างแต่มีการทำหน้าที่คล้ายคลึงกัน เซลลูโลสไฟเบอร์มักพบในรูปแบบบริสุทธิ์ ตรึงอยู่ในโพลีเมอร์ต่างๆ โดยเฉพาะเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน นอกจากนี้เซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืชส่วนใหญ่จะทนต่อการไฮโดรไลซ์ โดยเอนไซม์อัน

เนื่องจากโครงสร้าง Crystalline(Fibrillose) ความหลากหลายของ Degree of accessibility และ crystallinity ของเซลลูโลสอาจขึ้นอยู่กับความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสในสารตั้งต้นต่างๆกันเช่น ไม้ หรือปุย เป็นต้น

การเจริญของสายใยของราและแอคติโนมัยซีดที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส พบว่ามีความสำคัญในการเข้าถึงเซลลูโลสไฟเบอร์ โดยผ่านช่องที่ผนังเซลล์และปล่อยเอนไซม์ เซลลูเลสเข้าไปสัมผัสกับโพลิเมอร์ของเซลลูโลส

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าแอคติโนมัยซีดที่มีสายใยบางชนิด ไม่สามารถย่อยสลายไม้ได้และพบว่าการสร้างสายใยของแอคติโนมัยซีดเพื่อเข้าไปยังสารตั้งต้นเป็นการแข่งขันโดยตรงกับราที่มีความสามารถในการย่อยสารตั้งต้นนั้นที่สังเกตเห็นได้ในชั้นแรก เอนไซม์เซลลูเลสและเอมิเซลลูเลสของแอคติโนมัยซีด จะทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกลางและเป็นด่าง ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์เหล่านี้ในราจะทำงานได้ดีที่สภาวะกรดต่ำ นอกจากนี้การย่อยสลายเซลลูโลสของแอคติโนมัยซีดสามารถเกิดได้ดีในปุยซึ่งมีสภาวะเป็นด่างและมีแอมโมเนียสูง และพบว่าในสภาวะ pH สูงและในกระบวนการที่มีการเพิ่มขึ้นของ pH เช่น Ammonification เป็นปัจจัยสำคัญส่งผลถึงระดับของการย่อยสลายเซลลูโลสโดยแอคติโนมัยซีด จากการที่ Streptomyces สามารถปล่อยสารประกอบที่ต้านทานต่อเชื้อราได้ แสดงให้เห็นว่า มีการแข่งขันกับเชื้อราในสภาวะที่เหมาะสมนั้น และมีเคยรายงานว่าแอคติโนมัยซีดมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายสายใยของราที่มีอายุมากขึ้นโดยมีการทดลองกระตุ้นการเจริญของราโดยการเพิ่มสารตั้งต้น พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของแอคติโนมัยซีดหลังจากการลดจำนวนลงของรา(De Boer และคณะ, 1999)

Wang และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลขององค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ในขณะการย่อยสลายเส้นใยฝ้าย พบว่าเป็นกระบวนการแบบ Heterogeneous ประกอบด้วยสองขั้นตอนคือการ depolymerize หรือ การ solubilized ระหว่าง cellobiohydrolase I (CBHI) กับ endoglucanase I (EGI) และขั้นตอนต่อไปคือการ hydrolyse โอลิโกเมอร์ไปเป็นกลูโคสโดย EGI และ beta-glucosidase มีการศึกษาแบบจำลองในทางสถิติโดยใช้ filter paper activity assay

Taiwo และ Oso (2003) ศึกษาผลของวิธีการหมักปุ๋ยต่อปริมาณจุลินทรีย์ อุณหภูมิและ pH ในปุ๋ยจากขยะ ในช่วง 3 ระยะของการหมักปุ๋ยคือ Mesophilic stage, Thermophilic stage และ Cooling down stage พบว่ามีความหลากหลายของชนิดของจุลินทรีย์ในช่วง Mesophilic stage มากกว่า Thermophilic stage แบคทีเรียที่พบในช่วง Mesophilic stage คือ *Bacillus* sp. faecal coliforms, *Pseudomonas*, *Streptomyces* sp.และ *Actionomyces* sp.และพบว่า



*Actionomyces* sp. ที่เจริญได้ในช่วง Mesophilic stage สามารถกลับมาเจริญได้อีกในช่วง Cooling stage ดังรูปที่ 2.13

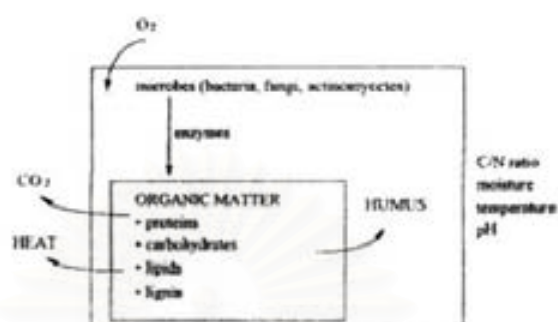


Fig. 2. The composting process (Silva et al., 1995).

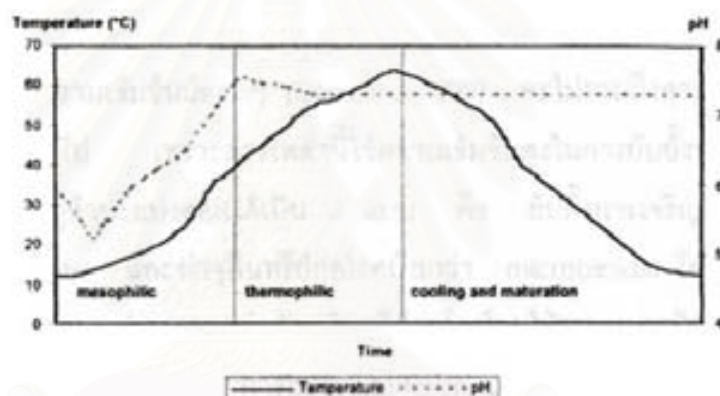


Fig. 3. Temperature and pH variation during actual composting process. The figure is redrawn from Gohucke (1991).

รูปที่ 2.13 แสดงกระบวนการหมักปุ๋ยและความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและ pH ในกระบวนการหมักปุ๋ย (Taiwo และ Oso, 2003)

Sudeep และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ Carboxymethyl cellulase ที่สร้างโดย alkalothermophilic actinomycete ที่แยกได้จากปุ๋ยในตำบล Uttar Pradesh ประเทศอินเดีย พบว่า จากการคัดเลือกโดยอาศัยทางสรีระวิทยา ความทนความร้อนของสปอร์ novobiocin guanine-cytosine content ของ chromosomal DNA และส่วนประกอบของผนังเซลล์พบว่าอยู่ในจีนัส *Thermomonospora* และทำการยืนยันผลจากการไม่มีการเจริญเติบโตของสปอร์ที่ผ่านการให้ความร้อน 90 °C นาน 10 นาที และไม่มีการเจริญเติบโตเมื่อมีการใส่ Novobiocin 50 µg/ml จากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า Alkalothermophilic actinomycete นี้ผลิตเอนไซม์ Carboxymethyl cellulase (CMCase) ได้ 23 IU/ml. ผ่านการทำให้อบริสุทธิ์และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต cellulose affinity chromatography และ Sephacryl S-200



gel filtration โดย CMCase มีน้ำหนักโมเลกุล 38 KD และมี pI เท่ากับ 4.1 pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 5 และที่อุณหภูมิ 50 °C โดยเอนไซม์มี pH stability ในช่วง 7-10 เอนไซม์ยังคงมี activity 100% ที่อุณหภูมิ 50 °C และมีครึ่งชีวิตเท่ากับ 7 และ 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60 °C และ 70 °C ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า CMCase มีความเสถียรเมื่อมีการใส่ commercial detergents เช่น Ariel, Henko, และ Surf Excel แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกได้

## 2.8 สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากจุลินทรีย์ ส่วนมากจะเป็น สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ สามารถยับยั้งหรือทำลาย จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีความเข้มข้นน้อย ๆ (Demain, 1999) จะไม่รวมถึงสารสกัดจากพืช หรือ แหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ เพราะสารเหล่านี้ใช้ความเข้มข้นสูงในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ การทำงานของสารปฏิชีวนะแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เรียกว่า microbistatic และฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbicidal โดยสารปฏิชีวนะแบบ microbistatic ร่างกายจะกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้ระบบการป้องกันของร่างกายคือ phagocytosis การผลิตแอนติบอดี การผลิต interferon เมื่อมีการติดเชื้อจากไวรัส หรือ กลไก การปฏิเสธรองลำไส้โดยการเกิดอาการท้องเสีย อาเจียน ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbicidal จะฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการทำให้เซลล์แตก แต่ร่างกายยังคงได้รับผลจากสารพิษที่จุลินทรีย์ สร้างขึ้น โดยกลไกการทำงานของสารปฏิชีวนะ แบ่งออกเป็น 5 แบบ (นงลักษณ์และปรีชา, 2544) คือ

1. กลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ เพนิซิลลิน (penicillin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) ไซโคลเซอรีน (cycloserine) แวนโคไมซิน (vancomycin) และ บาซิตราจิน
2. กลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ โพลิมิกซิน (polymixin) แกรมมิซิดิน (gramicidin) ไทโรซิดีน (tyrocidin) นิสเตติน (nystatin) และแอมโฟเทอริซิน (amphotericin)
3. กลุ่มที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน ได้แก่ สเตรปโตไมซิน (streptomycin) กานาไมซิน (kanamycin) นีโอไมซิน (neomycin) เตตราไซคลิน (tetracycline) ออริโอไมซิน (aureomycin) เทอราไมซิน (terramycin) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) อิริโทรไมซิน (erythromycin)

4. กลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของกรดนิวคลีอิก ได้แก่ ไรแฟมพิซิน (rifampicin) แอกติโนมัซซิน (actinomycin) ไมโตไมซิน (mitomycin) กรีสซิโอฟลูวิน (griseofluvin)
5. กลุ่มที่ยับยั้งระบบเอนไซม์ที่จำเพาะ ได้แก่ ซัลโฟนาไมด์ (sulfonamide)

## 2.9 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัซซีต

แอกติโนมัซซีตเป็นแหล่งที่สำคัญของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ 65-75% ผลิตจากแอกติโนมัซซีต รองลงมาคือราและแบคทีเรีย สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอกติโนมัซซีต 80% ผลิตจาก *Streptomyces* ดังตารางที่ 2.1 (Krsek และคณะ, 2000)

ตารางที่ 2.1 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอกติโนมัซซีต

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	สมบัติ
<i>Actinomadura carminata</i>	Carminomycin	ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Erythromycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces albovinaceus</i>	Rifamycin B	ต้านไวรัส
<i>Streptomyces albus</i>	8-Azaguanine	ต้านไวรัส
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tetracycline	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicidin	ยับยั้งรา
<i>Streptomyces griseus</i>	Cycloheximide	ยับยั้งรา
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Rifamicins	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotericin B	ยับยั้งรา

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีต

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	สมบัติ
<i>Streptomyces noursei</i>	Nystatin	ยับยั้งรา
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Vancomycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces peucetius</i>	Daunorubicin HCL	ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
<i>Streptomyces rimosus</i>	Oxytetracycline	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphenicol	ยับยั้งแบคทีเรีย, ต้านไวรัส
<i>Streptomyces verticillus</i>	Bleomycin sulfate	ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
<i>Streptomyces</i> spp.	Actinomycin D	ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
<i>Nocardia lactamdurans</i>	Cephamicin C	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces orchidaceae</i>	Cycloserine	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces roseosporus</i>	Daptomycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Micromonospora olivoasterospora</i>	Fortimicin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces</i> spp.	Fosfomycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Micromonospora</i> spp.	Gentamicin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lincomycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces argillaceus</i>	Mithramycin	ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
<i>Streptomyces verticillatus</i>	MitomycinC	ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
<i>Streptomyces nataensis</i>	Natamycin	ยับยั้งรา

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีต

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	สมบัติ
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces tendae</i>	Nikkomycin	ยับยั้งรา
<i>Nocardia uniformis</i>	Norcardicin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces niveus</i>	Novobiocin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Oleandomycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces verticillus</i>	Phleomycin	ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
<i>Streptomyces cacaoi</i> var. <i>asoensis</i>	Polyoxins	ยับยั้งรา
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	Pristinamycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Nocardia lurida</i>	Ristocetin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces spectabilis</i>	Spectinomycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces amofaciens</i>	Spiramycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces graminofaciens</i>	Streptogramins	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Teichoplanin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces cattleya</i>	Thienamycin	ยับยั้งแบคทีเรีย
<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Tobramycin	ยับยั้งแบคทีเรีย

นอกจากนี้ตัวอย่างกลุ่มของสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรีย, รา และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สร้างโดยแอคติโนมัยซีตและปีที่ค้นพบ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 (Bull, A.T.,2004)



**ตารางที่ 2.2** ตัวอย่างกลุ่มของสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรีย, รา และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตและปีที่ค้นพบ

Compound	Activity	Scaffold	Original microorganism producing the scaffold	Year of discovery
Streptomycin	AB	Aminoglycoside	<i>Streptomyces griseus</i>	1944
Chloramphenicol	AB	Phenylpropanoid	<i>Streptomyces venezuelae</i>	1948
Cholrtetracycline	AB	Tetracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	1948
Neomycin	AB	Aminoglycoside	<i>Streptomyces</i> sp.	1949
Oxytetracycline	AB	Tetracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>	1950
Nystatin	AB	Polyene	<i>Streptomyces noursei</i>	1950
Synercid	AB	Streptogramins	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	1953
Tetracycline	AB	Tetracycline	<i>Streptomyces viridofaciens</i>	1953
Virginiamycin	FA	Streptogramins	<i>Streptomyces virginiaensis</i>	1955
Vancomycin	AB	Glycopeptide	<i>Streptomyces orientalis</i>	1955

ตารางที่ 2.2(ต่อ) ตัวอย่างกลุ่มของสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรีย, รา และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตและปีที่ค้นพบ

Compound	Activity	Scaffold	Original microorganism producing the scaffold	Year of discovery
Novobiocin	AB	Coumarin	<i>Streptomyces spheroids</i>	1955
Cycloserine	AB	Amino acid analogue	<i>Streptomyces orchidaceus</i>	1955
Amphotericin B	AF	Polyene	<i>Streptomyces nodosus</i>	1955
Rifampin	AB	Rifamycin	<i>Streptomyces mediterranei</i>	1959
Kanamycin	AB	Aminocyclitol	<i>Streptomyces kanamycetus</i>	1960
Tylosin	FA	16-Membered macrolide	<i>Streptomyces fradiae</i>	1961
Avilamycin	FA	Orthosomycin	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	1961
Spectinomycin	AB	Aminocyclitol	<i>Streptomyces spectabilis</i>	1961
Lincomycin	AB	Lincomycin	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	1962
Everninomycin	AB	Orthosomyen	<i>Micromonospora carbonacea</i>	1964

**ตารางที่ 2.2(ต่อ)** ตัวอย่างกลุ่มของสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรีย, รา และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตและปีที่ค้นพบ

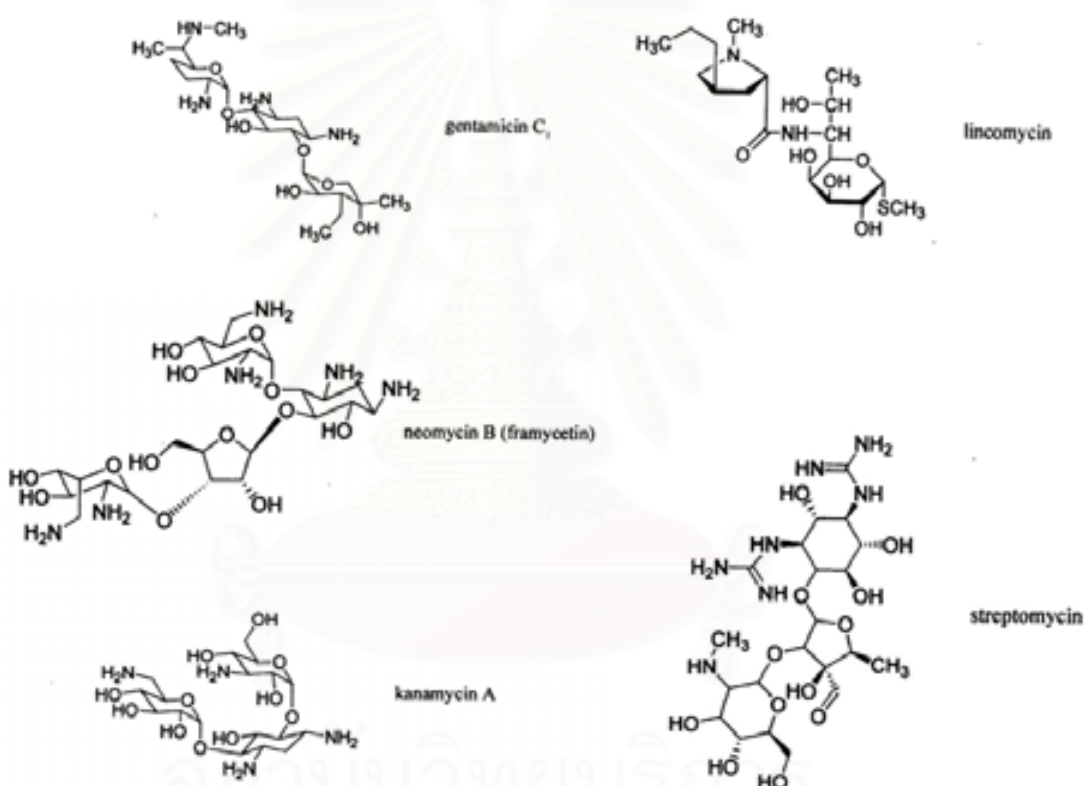
Compound	Activity	Scaffold	Original microorganism producing the scaffold	Year of discovery
Monensin	FA	Polyester	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	1967
Fosfomycin	AB	Phosphonic acid	<i>Streptomyces</i> sp.	1969
Cefoxitin	AB	$\beta$ -lactam (cephamycin)	<i>Nocardia lactamdurans</i>	1971
Clavulanic acid	AB	$\beta$ -lactam (clavam)	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	1975
Imipenem	AB	$\beta$ -lactam (carbapenem)	<i>Streptomyces cattleya</i>	1976

AB, Antibacterial; AF, antifungal; FA, food additive.

## 2.9.1 กลุ่มของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีต

### 1. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides

สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย amino sugar ที่เชื่อมกันแบบ glycoside linkage มีกลไกการออกฤทธิ์แบบ bactericide ยับยั้งการแปลรหัส (translation) ของ mRNA โดยจับกับไรโบโซมของแบคทีเรียเป็นผลให้การสังเคราะห์โปรตีนถูกยับยั้ง ได้แก่ streptomycin neomycin B kanamycin A gentamycin C<sub>1</sub> lincomycin amikacin netilmicin และ tobramycin ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides แสดงดังรูปที่ 2.14



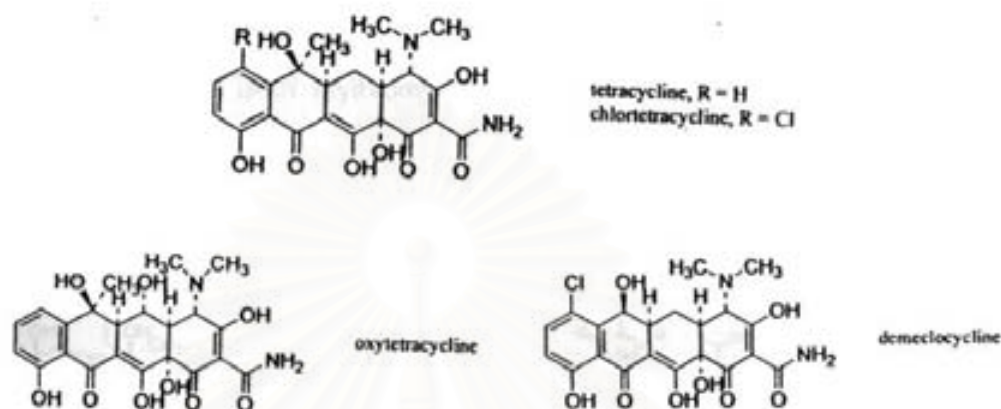
รูปที่ 2.14 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides (Sneider, 2005)

### 2. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline

สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย hydronaphthacene nucleus ที่มีวงต่อกัน 4 วง กลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriostatic กับจุลินทรีย์แบบ broad-spectrum ต้องใช้ความ



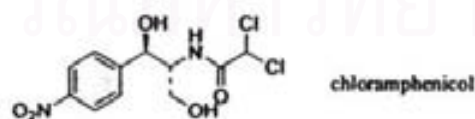
เข้มข้นสูงถึงเป็น bactericide ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยจับกับ 30S ไรโบโซมของแบคทีเรีย และรบกวนการเข้ามาจับของ rRNA ได้แก่ chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline และ demeclocycline ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline แสดงดังรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline (Sneider, 2005)

### 3. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Chloramphenicol

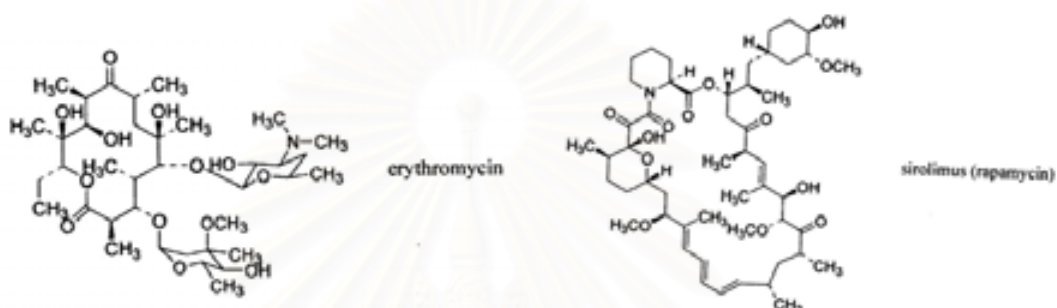
สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย วงอะโรมาติกอยู่ปลายด้านหนึ่งและปลายอีกด้านหนึ่งเป็น acyl side chain ส่วนตรงกลางสามารถขยายได้ กลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriostatic กับจุลินทรีย์แบบ broad-spectrum ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยจับกับ 50S ไรโบโซมของแบคทีเรีย และยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ peptidyl transferase ทำให้ไม่เกิดการต่อกันของสายเปปไทด์ ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม chloramphenicol แสดงดังรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม chloramphenicol (Sneider, 2005)

#### 4. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide

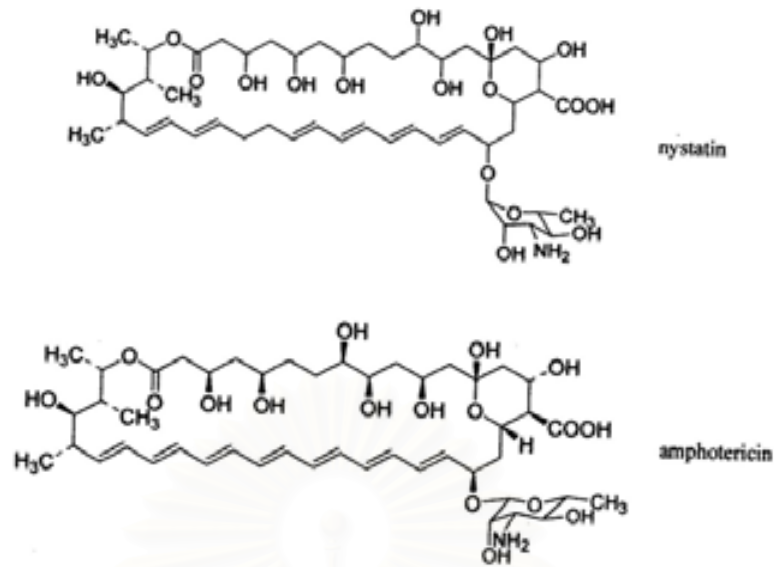
สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ประกอบด้วยอะตอมมากกว่า 20 อะตอมขึ้นไป โดยมี macrocyclic lactone ring เป็นองค์ประกอบ กลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriostatic กับจุลินทรีย์ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยจับกับ 50S ไรโบโซมของแบคทีเรีย ได้แก่ erythromycin rapamycin tacrolimus และ abamectin ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide แสดงดังรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide (Sneader, 2005)

#### 5. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Polyene

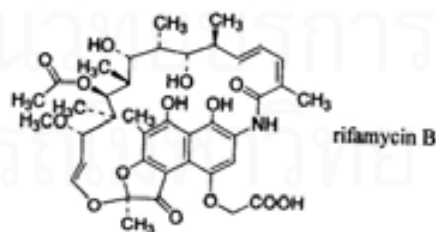
สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้เป็นสารประกอบขนาดใหญ่ ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำคือส่วน hydroxylate และส่วนที่เป็น lipophilic (Scholar และ Pratt, 2000) กลไกการออกฤทธิ์มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจับกับ ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย คุณสมบัติ selective permeability เสียไปทำให้เซลล์สูญเสียประจุ ได้แก่ nystatin และ amphotericin ทั้งสองชนิดมีขอบเขตการยับยั้งเหมือนกันคือยับยั้งการเจริญของยีสต์และราต่าง ๆ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene แสดงดังรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene (Sneader, 2005)

#### 6. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Rifamycin

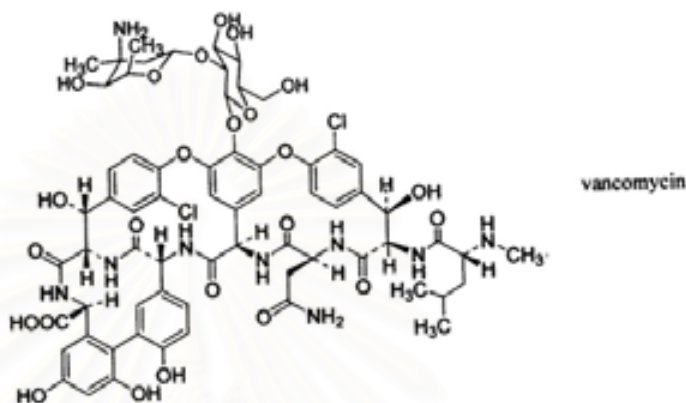
ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โดยจับกับเอ็นไซม์ DNA-dependent RNA polymerase เป็นเหตุให้สาย RNA ที่ระบุรหัสโปรตีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนไม่ถูกสร้างขึ้น ทำให้สังเคราะห์โปรตีนไม่ได้ ได้แก่ rifamycin B และ rifamycin SV สารปฏิชีวนะทั้งสองชนิดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้ง *Mycobacterium tuberculosis* *M leprae* และยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้บางชนิด ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin แสดงดังรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.19 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin (Sneader, 2005)

## 7. สารปฏิชีวนะ Vancomycin

ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยขัดขวางการจับกันของ muramyl pentapeptides ยับยั้งแกรมบวก และ Staphelococci ที่ดื้อยา ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะ แสดงดังรูปที่ 2.20 (Sneader, 2005)



รูปที่ 2.20 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะ vancomycin (Sneader, 2005)

### 2.9.2 รายงานที่เกี่ยวกับสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีต

การค้นพบสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีตเริ่มขึ้นในปี 1940 โดย Waksman และ Woodruff ซึ่งค้นพบ Actinomycin การค้นคว้ายังคงดำเนินต่อไปด้วยเหตุผลที่ว่า จุลินทรีย์ก่อโรค มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะมากขึ้น เกิดโรคชนิดใหม่มากขึ้นเช่น AIDS โรคจาก *E.coli* O157:H7 เป็นต้น รวมทั้งโรคในพืชชนิดต่างๆ

สารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอคติโนมัยซีตสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย(Petr Karlovsky, 2008) โดยสามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภทคือ

1. สารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้ง (antagonistic agents) ประกอบด้วย สารยับยั้งแบคทีเรีย สารยับยั้งรา สารยับยั้งโปรโตซัว และสารยับยั้งไวรัส
2. สารออกฤทธิ์ในทางยา (pharmacological agents) ประกอบด้วย สารยับยั้งเนื้องอก สารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน(immunomodulator) สารที่ออกฤทธิ์ทางประสาท (neurological agents) และสารยับยั้งเอนไซม์
3. สารออกฤทธิ์ทางด้านชีววิทยาทางการเกษตร ประกอบด้วย สารฆ่าแมลงและศัตรูพืช สารฆ่าวัชพืช



4. สารประกอบที่มีฤทธิ์ในการควบคุม เช่น growth factor siderophores หรือ morphogenic agents

Zitouni และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษากายการแยก กิจกรรมทางชีวภาพ และชี้บ่งชนิดของ สารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีตจันัส *Nocardopsis* และ *Saccharothrix* จาก Saharian soils ในอัลจีเรีย แยกได้ 86 ชนิดตามลักษณะทางสรีรวิทยาบน Humic-vitamin B agar medium และผลิตสารปฏิชีวนะบางชนิด พบว่าสารปฏิชีวนะมีความจำเพาะกับบาง phenotype จาก ลักษณะทางสรีรวิทยาและ chemotaxonomy พบว่ามี 54 ชนิดอยู่ในจันัส *Nocardiopsis* และ 32 ชนิดอยู่ในจันัส *Saccharothrix* และจันัส *Saccharothrix* สร้างสารปฏิชีวนะต้านกับแบคทีเรีย ยีสต์และราได้ดีกว่า ทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรียและราใน อาหาร complex medium ISP2 และ synthetic medium (SM) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสหรือแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอน และ แอมโมเนียมหรือไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน SM medium ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต (0.2%) แป้ง (0.5%) ยีสต์สกัด(0.3%) ใช้ในการทดสอบการผลิตสารปฏิชีวนะ สารปฏิชีวนะที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์โดย G25-80 Sephadex column และ reverse phase HPLC ได้สารบริสุทธิ์สองชนิดคือ ZA01 และ ZA02 ซึ่งใช้หลักการในการชี้บ่ง จากการวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกันของ chemical tests UV visible IR spectra และ Mass spectrometry สารสองชนิดนี้มีความใกล้เคียงกับ nucleotidic หรือ nucleosidic antibiotics มี โครงสร้างเป็นสายของน้ำตาล 3 หน่วยต่อกับอะโรมาติกที่มี phosphate residue

Kitouni และคณะ (2005) ได้ศึกษากายการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีตที่มีความสามารถในการ สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ จากตัวอย่างดิน น้ำและเปลือกของต้นไม้ในเขตตะวันออกเฉียงเหนือ ของอัลจีเรีย พบว่าแยกได้ 25 สายพันธุ์ ทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างสารต้านจุลชีพโดย Agar cylinder method มี 14 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพพวกแบคทีเรียได้ มากกว่า 1 ชนิด และมี 2 สายพันธุ์ที่สร้างสารต้านจุลชีพต่อเชื้อรา จากการชี้บ่งด้วย Universal PCR พบว่า 90% ตรงกับจันัส *Streptomyces* และ 7% ตรงกับจันัส *Actinomadura*

Boudjella และคณะ (2005) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม glycopeptide ที่ผลิต จากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่คือ *Streptosporangia* Sg10 โดยปกติสกุล *Streptosporangia* ผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่ม glycopeptide คือ sibiromycin และ sinefungins แต่จากข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปีพบว่าสารปฏิชีวนะที่ *Streptosporangia* Sg10 สร้างขึ้นมีคุณสมบัติไม่ตรงกับ sibiromycin และ sinefungins สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีแต่มีฤทธิ์ น้อยกับแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา Fguira และคณะ (2004) พบแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ ใหม่ คือ *Streptomyces* sp. US80 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่ามีลำดับ

เบสใกล้เคียง (98%) กับ *Streptomyces roseoflavus* ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ กลุ่ม aminoglycoside คือ flavomycin แต่จากข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปีพบว่าสารปฏิชีวนะที่ *Streptomyces* sp. US80 สร้างขึ้นมีคุณสมบัติไม่ตรงกับ flavomycin ซึ่ง *Streptomyces* sp. US80 สร้างสารปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 ชนิด และจัดอยู่ในกลุ่ม macrolide สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และรา

Sujatha และคณะ (2004) ค้นพบ สารปฏิชีวนะกลุ่ม polyketide ที่ผลิตโดย *Streptomyces psammoticus* BT-408 ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา และยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา methicillin

Singh และคณะ (2003) มีรายงานการพบสารปฏิชีวนะ Manno-peptimycins ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะไกลโคเปปไทด์แบบวง ผลิตโดยแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ *Streptomyces hygrosopicus* LL-AC98 สามารถยับยั้ง Staphylococci ที่ดื้อต่อยา Methicillin และ Enterococci ที่ดื้อยา Vancomycin

Mellouli และคณะ (2003) มีรายงานการพบแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่คือ *Streptomyces* sp. US24 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Streptomyces caelestis* (98%) ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ nindamycin และ celesticetin แต่จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีพบว่า สารปฏิชีวนะที่ ผลิตโดย *Streptomyces* sp. US24 มีคุณสมบัติไม่ตรงกับ nindamycin และ celesticetin สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

Singh และคณะ (2003) พบ Manno-peptimycins เป็นสารปฏิชีวนะไกลโคเปปไทด์แบบวง ที่ผลิตโดย *Streptomyces hygrosopicus* ออกฤทธิ์ยับยั้ง Staphylococci ที่ดื้อยา methicillin และ Enterococci ที่ดื้อยา vancomycin

Hoppmann และคณะ (2002) มีรายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่คือ Vancoresmycin ที่ผลิตโดย *Amycolatopsis* sp. ST 101170 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อยา Vancomycin แต่ไม่ออกฤทธิ์กับแบคทีเรียแกรมลบและรา

Ohta และคณะ (2001) มีรายงานการค้นพบ Micromonosporide A ซึ่งเป็น Macrolide ชนิดใหม่ ผลิตโดย *Micromonospora* sp. มีฤทธิ์ยับยั้งตัวอ่อนของปลาดาว (*Asterina pectinifera*) ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml

Schumacher และคณะ (2001) มีรายงานการค้นพบ Kahakamides A และ B เป็น Neosidomycin ชนิดใหม่ ผลิตโดย *Nocardio-opsis dassonvillei* ที่แยกจากดินตะกอนในแหล่งน้ำ

ต้น บนเกาะ Kauai รัฐฮาวาย พบว่า Kahakamides A มีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis* ส่วน Kahakamides B มีสารไม่เพียงพอในการทดสอบ

Ouhdouch และคณะ (2001) ได้ศึกษาการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีดในประเทศโมร็อกโกเพื่อหาประสิทธิภาพในการสร้างสารต้านเชื้อรา ให้ความสนใจในการคัดเลือกสารต้านราในรูปของ non-polyenic เพราะเป็นรูปแบบที่ไม่เป็นพิษต่อคนและสัตว์ แยกแอกติโนมัยซีดได้ 320 ชนิด โดยมีการเติม Actidione ลงในอาหารที่ใช้สำหรับการคัดเลือกด้วยซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญของราและสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตต่างๆในดินที่เป็นศัตรูกับแอกติโนมัยซีด มีการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะในอุณหภูมิและอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน พบว่าแอกติโนมัยซีดที่แยกได้ 32 ชนิดมีความสามารถในการต้านแบคทีเรีย ราและยีสต์ได้ดี Bennett's medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ และพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ใช้ในการคัดเลือกและอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ มีการทดสอบการผลิต non-polyenic antifungal metabolites โดยวิธีต่างๆเช่น antimicrobial activity spheroplast regeneration, ergosterol inhibition และ UV-visible spectrum characteristic พบว่ามี 10 ชนิดที่คัดเลือกได้อยู่ในจีนัส *Streptomyces* และถึงแม้ว่าจะจะเป็นจีนัสหรือสปีชีส์เดียวกัน แต่แอกติโนมัยซีดที่แยกได้นั้นสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ต่างชนิดกันโดยได้จากผลของ activity spectrum

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### อุปกรณ์สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) Memmert รุ่น BE600 บริษัท Jebsen and Jebsen
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น H1 บริษัท Lab Service Ltd, Part
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) Memmert รุ่น UE600 บริษัท Jebsen and Jessen, Germany
- ตู้อบแห้งภายใต้สุญญากาศ (vacuum oven) Hotpack รุ่น บริษัท Hotpack Corporation, USA.
- เครื่องชั่งน้ำหนัก (digital scale) Mettler Toledo
- กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ไมโครสโคป (compound microscope) Olympus รุ่น BX51 บริษัท Olympus optical Co.,Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ60 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) Olympus รุ่น CK2 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) รุ่น JEM-T220 บริษัท Jeol, Japan
- กล้องถ่ายภาพ Olympus บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- เครื่องเขย่า (shaker) New Brunswick Scientific บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc.Edison, USA
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) Mettler-Toledo รุ่น S20-k
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima, Japan
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด  $0.0025 \text{ mm}^2$  ยี่ห้อ Loptik Labor บริษัท Boeco



- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycle) Takara
- ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) รุ่น Mupid-ex บริษัท Advance
- เครื่องสำหรับถ่ายภาพ Gel Documentation
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-6010 บริษัท Hsingtai
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น stratagene บริษัท Profuge
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
- เครื่อง UV-Transilluminator
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 บริษัท Bio-tek instrument
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 °C รุ่น ULT 1786 บริษัท FORMA Scientific, USA
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 °C บริษัท SANYO Electric, Japan
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
- ไมโครปิเปต (automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2µl), P10 (0.5-10µl), P20 (2-20µl), P100 (20-100µl), P1000 (0.2-1ml) บริษัท Gilsson France
- ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 1-200 µl และ 1 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครทิวบ์ (microtubes) ขนาด 1.5 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 0.2 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร บริษัท Corning Incorporated, USA
- กระดาษกรอง (cellulose acetate membrane filter) Pore size 0.45 µm บริษัท Sartorius, Germany
- ปิเปตต์แก้ว (seropipatte) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

### 3.2 สารเคมี

- *L*-อะราบิโนส (*L*-arabinose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- เดกซ์แทรน (dextran) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- *D*-ฟรุคโตส (*D*-fructose) บริษัท Merck. Germany
- *D*-กาแลคโตส (*D*-galactose) บริษัท Merck. Germany
- มีโซ-อินโนสิทอล (meso-inositol) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- *D*-แลคโตส (*D*-lactose) บริษัท Merck. Germany
- *D*-แมนนิทอล (*D*-mannitol) บริษัท Difco Laboratory
- *D*-แมนโนส (*D*-mamnose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- *L*-แรมโนส (*L*-rhamnose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ซูโครส (sucrose) บริษัท Merck, Germany
- ทรีฮาโลส (threhalose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไซโลส (xylose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) บริษัท Merck, Germany
- โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) บริษัท Merck, Germany
- *L*-แอสปาราจีน (*L*-asparagine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- *L*-โพรลีน (*L*-proline) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- *L*-อาร์จินีน (*L*-arginine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- *L*-ฮิสทีดีน (*L*-histidine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- *L*-เมทไธโอนีน (*L*-methionine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- โพแทสเซียม ไนเตรท (potassium nitrate) บริษัท Merck, Germany
- *L*-ฟีนิลอะลานีน (*L*-phenylalanine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- *L*-เซรีน (*L*-serine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- *L*-ธีโอนีน (*L*-theonine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- *L*-วาลีน (*L*-valine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- *L*-กลูตามีน (*L*-glutamine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- *B*-อะลานีน (*B*-alanine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- อะดีนีน (adenine)
- ไทโรซีน (tyrosine)
- ไซแลน (xylan)

- แซนทีน (xanthine)
- เคซีน (casein)
- เจลาติน (gelatin)
- แป้ง (starch)
- Bacto peptone
- Bacto tryptone
- Bacto soytone
- Beef extract
- Yeast extract
- Carboxymethylcellulose Sodium Salt บริษัท Fluka, Switzerland
- Alpha-cellulose fiber บริษัท Sigma Chemical, U.S.A
- Congo red บริษัท Merck, Germany
- Sodium Chloride (NaCl)
- Ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>)
- Magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>)
- Di-Potassium hydrogen phosphate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
- Potassium di-hydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Ammonium sulphate (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>)
- Ferrous sulphate (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)
- Zinc sulphate (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)
- Manganese chloride (MnCl<sub>2</sub>)
- Ammonium molybdate
- Copper sulphate (CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)
- Sodium caseinate
- Sodium Hydrogen Carbonate (NaHCO<sub>3</sub>)
- Glycerol
- Sodium potassium tartrate
- Sodium sulphate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Hydrochloric acid (HCl) บริษัท Merck. Germany
- Taq DNA polymerase บริษัท Fermentas

- 10x Tris boric acid disodium ethylenediamine tetracetic acid (10x TBE buffer)
- Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express
- Ethanol
- Cycloheximide
- Nystatin

### 3.3 ตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย 36 ตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดตาก ลำปาง นครสวรรค์ ปทุมธานี น่าน ระยอง พิษณุโลก สกลนคร เชียงราย นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ตัวอย่างละประมาณ 50-100 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกซิปลง บันทึกลงสถานที่เก็บ ลักษณะและสี หลังจากนั้นความแตกต่าง (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) ตากให้แห้ง บดให้ละเอียด ใส่ถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

### 3.4 การแยกแอกติโนมัยซีตจากตัวอย่างดิน

อบตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 60-65 °C นาน 2 ชั่วโมง เพื่อลดจำนวนแบคทีเรียบางประเภท ซึ่งตัวอย่างดิน 10 กรัม เจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 90 มิลลิลิตร ได้สารแขวนลอยดินระดับการเจือจางที่  $10^{-1}$  จากนั้นเพิ่มระดับการเจือจางเป็น  $10^{-2}$  -  $10^{-6}$  (serial ten fold dilution) ปิเปตสารแขวนลอยดิน 0.1 มิลลิลิตรที่ระดับการเจือจางเท่ากับ  $10^{-4}$  -  $10^{-6}$  เกลี่ย (spread) บนอาหาร Sodium Caseinate Agar (SCA) (ภาคผนวก หมายเลข 1) โดยเติม cycloheximide และ nystatin 50 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 7 – 14 วัน คัดเลือกแอกติโนมัยซีตที่โคโลนีมีลักษณะแตกต่างกัน ชีด(streak) ทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร Sodium Caseinate Agar (SCA) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวนึ่ง oat meal agar (OMA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) หรือ mannitol mungbean agar (MBA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ที่อุณหภูมิ 4 °C และเก็บสปอร์โดยทำเป็นสปอร์แขวนลอยในสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C



### 3.5 การเก็บรักษาแอกติโนมายซีต

ซีตแอกติโนมายซีตบนอาหารผิวเอียง oat meal agar หรือ mannitol mungbean agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 7-14 วัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ได้เป็นเวลา 1-2 เดือน สำหรับการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์บนอาหารมากพอ เติมน้ำละลาย 20% กลีเซอรอลปริมาตร 7 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร ใช้ลูป (loop) ขูดสปอร์ให้หลุดออก แล้วกรองสปอร์แขวนลอยด้วยสำลีปลอดเชื้อ ปิเปตต์สารแขวนลอยสปอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ (micro tube) เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C

### 3.6 การทดสอบการสร้างเซลล์เลสของแอกติโนมายซีต

โดยวัดอัตราส่วนขนาดของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ตามวิธีของ Hankin และ Anagonostakis (1977) นำแอกติโนมายซีตจาก Mungbean slant นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mungbean agar แล้วนำชิ้นวุ้นแอกติโนมายซีตขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 1 สัปดาห์ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี วัดขนาดของบริเวณใส ด้วยการย้อมสีคองโก เรด ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ลงบนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง หลังจากนั้นเทสารละลายไฮเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตรตามลงไป ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง จะเห็นบริเวณใส (Clear zone หรือ CMC hydrolysis zone) หาอัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่าอัตราส่วนขนาดของบริเวณใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ แสดงว่ามีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

### 3.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแอกติวิตีของเซลล์เลสของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2

เตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum) โดยนำแอกติโนมายซีตที่ผ่านการคัดเลือกขั้นแรกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง CMC agar บ่มที่ 30 °C เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอกติโนมายซีตที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง CMC agar ใช้ needle นำชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ 3 ชิ้นถ่ายลงใน erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5 %CMC broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) ปริมาตร

50 มิลลิลิตร และมี สปริงคอยล์ (spring coil) เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับเซลล์ เซย่าด้วย rotary shaker 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

ใส่กล้าเชื้อที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 มิลลิลิตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 0.5 %CMC สำหรับวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (CMCase) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น  $\alpha$ -cellulose (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) สำหรับวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ย่อย  $\alpha$ -cellulose ( $\alpha$ -cellulase activity) บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเซย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ไว้ใช้ในการวัดแอกติวิตีของเซลลูเลสและนำเซลล์ที่ได้มาหาล้างน้ำหนักเซลล์แห้งต่อไป

เตรียม crude enzyme โดยเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15-20 นาที เก็บสารละลายใสตอนบนประมาณ 10-15 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วย crude enzyme ไว้ใช้ในการวัดแอกติวิตีของเซลลูเลส โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1994; Somogyi, 1952)

วัดแอกติวิตีของเซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (CMCase activity) โดยผสมและบ่มสารละลายของ crude enzyme 0.25 มิลลิลิตร กับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย 1% CMC ใน 0.2 M acetate buffer pH 5.4 แล้วเติม 1.4 มิลลิลิตร ของ 0.2 M acetate buffer pH 5.4 บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Somogyi-Nelson

วัดแอกติวิตีของเซลลูเลสที่ย่อย  $\alpha$ -cellulose ( $\alpha$ -cellulase activity) โดยผสมและบ่มสารละลายของ crude enzyme 0.25 มิลลิลิตร กับ 0.4 มิลลิลิตรของสารละลาย 1%  $\alpha$ -cellulose ใน 0.2 M acetate buffer pH 5.4 แล้วเติม 1.4 มิลลิลิตร ของ 0.2 M acetate buffer pH 5.4 บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที กรองเอา  $\alpha$ -cellulose ออก วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Somogyi-Nelson

### 3.8 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งไนโตรเจนกับแอกติวิตีของเซลลูเลสของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2

เตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum) โดยนำแอกติโนมัยซีตที่ผ่านการคัดเลือกชั้นแรกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง CMC agar บ่มที่ 30 °C เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอกติโนมัยซีตที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง CMC agar ใช้ needle นำชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ 3 ชิ้นถ่ายลงใน erlenmayer flask ขนาด 250

มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5 %CMC broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมี ขดลวด (spring coil) เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับเซลล์ เช้าด้วย rotary shaker 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

ใส่กล้าเชื้อที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 มิลลิลิตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 0.5 %CMC สำหรับวัดแอกติวิตีของเซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (CMCase) มีแหล่งไนโตรเจนเป็น 0.04% $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ 0.07% $\text{KNO}_3$  บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ไว้ใช้ในการวัดแอกติวิตีของเซลลูเลสและนำเซลล์ที่ได้มานาน้ำหนักเซลล์แห้งต่อไป

เตรียม crude enzyme โดยเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15-20 นาที เก็บสารละลายใสตอนบนประมาณ 10-15 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วย crude enzyme ไว้ใช้ในการวัดแอกติวิตีของเซลลูเลส โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1994; Somogyi, 1952)

วัดแอกติวิตีของเซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (CMCase activity) โดยผสมและบ่มสารละลายของ crude enzyme 0.25 มิลลิลิตร กับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย 1% CMC ใน 0.2 M acetate buffer pH 5.4 แล้วเติม 1.4 มิลลิลิตร ของ 0.2 M acetate buffer pH 5.4 บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Somogyi-Nelson

### 3.9 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับแอกติวิตีของเซลลูเลสของแอกติโนมัยซิดสายพันธุ์ NKP3-2

เตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum) โดยนำแอกติโนมัยซิดที่ผ่านการคัดเลือกชั้นแรกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง CMC agar บ่มที่ 30 °C เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอกติโนมัยซิดที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง CMC agar ใช้ needle นำชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ 3 ชิ้นถ่ายลงใน erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5 %CMC broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมี ขดลวด (spring coil) เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับเซลล์ เช้าด้วย rotary shaker 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

ใส่กล้าเชื้อที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 มิลลิลิตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 0.5 %CMC สำหรับวัดแอกติวิตีของเซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (CMCase) โดยมีค่า



pH 4, 5, 6, 7, 8, และ 9 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ไว้ใช้ในการวัดแอกติวิตีของเซลลูเลสและนำเซลล์ที่ได้มาหาล้างเซลล์แห้งต่อไป

เตรียม crude enzyme โดยเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15-20 นาที เก็บสารละลายใสตอนบนประมาณ 10-15 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วย crude enzyme ไว้ใช้ในการวัดแอกติวิตีของเซลลูเลส โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1994; Somogyi, 1952)

วัดแอกติวิตีของเซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (CMCase activity) โดยผสมและบ่มสารละลายของ crude enzyme 0.25 มิลลิลิตร กับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย 1% CMC ใน 0.2 M acetate buffer pH 5.4 แล้วเติม 1.4 มิลลิลิตร ของ 0.2 M acetate buffer pH 5.4 บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Somogyi-Nelson

### 3.10 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับแอกติวิตีของเซลลูเลสของแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ NKP3-2

เตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum) โดยนำแอกติโนมัยซีดที่ผ่านการคัดเลือกชั้นแรกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง CMC agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอกติโนมัยซีดที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง CMC agar ใช้ needle นำชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ 3 ชิ้นถ่ายลงใน erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5 %CMC broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 8 ) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมี ขดลวด (spring coil) เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับเซลล์ เขย่าด้วย rotary shaker 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

ใส่กล้าเชื้อที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 50 มิลลิลิตรที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 0.5 %CMC สำหรับวัดแอกติวิตีของเซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (CMCase) บ่มที่อุณหภูมิ 30, 45, และ 55 °C ตามลำดับ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างของสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ไว้ใช้ในการวัดแอกติวิตีของเซลลูเลสและนำเซลล์ที่ได้มาหาล้างเซลล์แห้งต่อไป

เตรียม crude enzyme โดยเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็น



เวลา 15-20 นาที เก็บสารละลายไตตอนบนประมาณ 10-15 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วย crude enzyme ไว้ใช้ในการวัดแอกติวิตีของเซลลูเลส โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1994; Somogyi, 1952)

วัดแอกติวิตีของเซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (CMCase activity) โดยผสมและบ่มสารละลายของ crude enzyme 0.25 มิลลิลิตร กับ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลาย 1% CMC ใน 0.2 M acetate buffer pH 5.4 แล้วเติม 1.4 มิลลิลิตร ของ 0.2 M acetate buffer pH 5.4 บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธี Somogyi-Nelson

### 3.11 ทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะกับราโรคพืช

ราโรคพืชที่ใช้ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ (test organisms)

*Pythium aphanidermatum* DOAC 1662

*Phytophthora parasitica* DOAC 0005

*Collectotrichum capsici* DOAC 1196

*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DOAC 0874

*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* DOAC 0893

*Alternaria porri* DOAC 1756

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคพืช โดยวิธี Dual Culture (Aghighi S., และคณะ 2004) โดยใช้น้ำขึ้นฉั้วของราทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 จากนั้นนำขึ้นฉั้วของแอกติโนมัยซีตขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางในระนาบเดียวกันให้มีระยะห่าง 3 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 4 วัน วัดระยะทางที่เส้นใยของราทดสอบถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีต ( $\Delta\gamma$ ) โดยนำรัศมีการเจริญเติบโตของราควบคุม ( $\gamma_0$ ) ลบด้วยรัศมีที่เส้นใยของราทดสอบเจริญในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีต( $\gamma$ ) ดังสมการ  $\Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma$

### 3.12 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10

ศึกษาการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3 19-2, NV1 12-6 และ LK3 11-10 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างรงควัตถุเมลานิน การทดสอบทางชีวเคมี การย่อยสลายสาร ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความสามารถในการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ตามวิธีที่รายงานโดย (Williams และคณะ, 1989)

3.12.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ใช้เทคนิค slide culture (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) และ sodium caseinate yeast extract agar (SCYA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เพื่อศึกษาลักษณะของสายใยอากาศ สายใยอาหาร และจำนวนวันที่มีการสร้างสปอร์ จากนั้นนำไปศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด บันทึกลักษณะการแตกออกของเส้นใยอาหาร ลักษณะของสายสปอร์ การเรียงตัวของสปอร์ จำนวนสปอร์ ลักษณะพื้นผิวของสปอร์

3.12.2 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP (International Streptomyces Project) (ภาคผนวก ก หมายเลข 10-15) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่

ISP1-TYEA	Trypton-yeast extract agar
ISP2-YMEA	Yeast-malt extract agar
ISP3-OAA	Oat meal agar
ISP4-ISSA	Inorganic salts starch agar
ISP5-GAA	Glycerol asparagines agar
ISP6-PYEA	Peptone yeast extract iron agar

ซีตแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP1-6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน บันทึกการเจริญ สีของสายใยอาหาร สายใยอากาศ การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำและการสร้างสปอร์

### 3.12.3 ทดสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน

เลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 บนอาหาร peptone yeast extract iron agar (ISP6) (ภาคผนวก ก หมายเลข 15) และ tyrosine agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 16) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 โดยจะเกิดสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 3.12.4 ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท

แทง (stab) แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrate agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 17) ในหลอดอาหารขนาด 16x150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ โดยหยดสารละลายเอ (ละลาย sulfanilic acid 0.8 กรัม ใน 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร) และสารละลายบี (ละลาย alphanaphthylamine 0.5 กรัม ใน 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลองซึ่งจะเกิดสีแดง แต่ถ้าวางทดสอบไม่เกิดสีแดงอันเนื่องมาจากไนไตรท์ถูกสลายต่อไปเป็นแอมโมเนีย และก๊าซไนโตรเจน ต้องทดสอบขั้นที่สองโดยเติมผงสังกะสีลงไป ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ (Shirling และ Gottlieb, 1966)

### 3.12.5 ทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

ขีด (streak) แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 บนผิวหน้าอาหารวุ้นเลี้ยง peptone yeast extract iron agar (ISP6) (ภาคผนวก ก หมายเลข 15) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง สังเกตอาหารจะมีสีน้ำเงินดำ (bluish-black color) ควรสังเกตสีของอาหารก่อนที่เชื้อจะสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ลงไป ในอาหาร (Tresner และ Danga, 1958)

### 3.12.6 การศึกษาสมบัติการย่อยสลายสาร (degradation activity)

โดยขีดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified bennett agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 18) ที่แปรผัน 0.5% อะดีนีน (adenine) 0.5% ไทโรซีน (tyrosine) 0.4% ซิลแลน (xylan) 0.4% แซนทีน (xanthine) 0.1% เคซีน (casein) 0.4% เจลาติน (gelatin) และ 0.1% แป้ง (starch) ตรวจสอบการย่อยสลายโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงความใสบริเวณรอบหรือใต้โคโลนีในอาหารวุ้น ยกเว้น การย่อยสลายเจลาตินและแป้ง ตรวจสอบโดยสังเกตจากวงใสหลังจากเททับด้วยสารละลาย acidified HgCl<sub>2</sub> และ Iodine ตามลำดับ

### 3.12.7 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

โดยซัดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified bennett agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 18) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 45 °C สังเกตการเจริญหลังจากวันที่ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 10 °C สังเกตการเจริญหลังจาก 2 สัปดาห์

### 3.12.8 การตรวจสอบการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ

โดยซัดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified bennett agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 18) ที่มี pH เท่ากับ 4 4.5 5 5.5 6 8 8.5 และ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C สังเกตการเจริญหลังจาก 14 วัน

### 3.12.9 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

ซัดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 18) ที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ 0.1%L-arginine 0.1%L-histidine 0.1%L-methionine 0.1%potassium nitrate 0.1%L-serine 0.1%L-theonine 0.1%L-valine 0.1%L-glutamine และ 0.1%B-alanine บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15 วัน ตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนโดยเทียบการเจริญกับชุดควบคุมคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมบวกคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar ที่ประกอบด้วย 0.1% L-Asparagine หรือ 0.1%L-proline

### 3.12.10 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

ซัดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 20) ที่แปรผันสารประกอบคาร์บอน ได้แก่ 1.0%L-arabinose 1.0%dextran 1.0%D-fructose 1.0%D-galactose 1.0%meso-inositol 1.0%D-lactose 1.0%D-mannitol 1.0%D-manose 1.0%L-rhamnose 1.0%sucrose 1.0%threhalose 1.0%xylose 1.0%sodium acetate และ 1.0%sodium citrate ตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนโดยเปรียบเทียบการเจริญกับอาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน และอาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar ที่ประกอบด้วย 1.0%glucose บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15 วัน



### 3.13 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

3.13.1 การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10

เลี้ยงแอกติโนมัยซีตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYMB เป็นเวลา 3 วัน ปั่นเหวี่ยงเก็บเส้นใยด้วยความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ปั่นเหวี่ยงเก็บเส้นใยที่สภาวะเดิม นำเส้นใยประมาณ 30 กรัม ไปบดด้วยโกร่งบดยา เพื่อให้เซลล์เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน เติม washing buffer (0.1M Tris-HCl pH8, 2-mercaptoethanol 2%, polyvinylpyrrolidone 1%, และ ascorbic acid 0.05 M) ผสมกับตัวอย่างที่บดในโกร่ง จากนั้นดูดใส่ในหลอด microtube ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วเทส่วนน้ำทิ้ง ทำซ้ำประมาณ 2 - 3 ครั้ง จนน้ำใส นำตะกอนที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วย Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Zhou และคณะ, 1999) โดยเติม 2X CTAB lysis buffer (CTAB 2%, Tris-HCl (pH8) 0.1M, EDTA (pH8) 20 mM, NaCl 1.4 M และ 2-mercaptoethanol 0.5%) บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายผสม chloroform-isoamyl alcohol (24:1,v/v) ปริมาตรเท่าตัวของ CTAB buffer นำไปปั่นตกตะกอนที่ 1,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนมาเติมสารละลายผสม chloroform-isoamyl alcohol (24:1,v/v) ปั่นตกตะกอนอีกครั้ง เก็บน้ำใสส่วนบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol เก็บรักษาไว้ที่ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ระบายของเหลวภายในหลอดให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (Tris-HCl (pH8) 10 mM และ EDTA 1 mM) 100 ไมโครลิตร เติม ribonuclease solution (RNase) 10 mg/ml 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ ตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งโดยเติม PEG solution (20%polyethylene glycol ใน 2.5 M NaCl) 60 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ 0 °C เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปั่นตกตะกอน ระบายจนแห้ง ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

3.13.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR)

ออกแบบไพรเมอร์ (primer) อ้างอิงข้อมูลจาก Rintala และคณะ (2001) และ Lanoot และคณะ (2005) เพื่อใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ไพรเมอร์ดังกล่าวคือ

Forward primer PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

Reward primer PH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')

Reward primer StrepF (5'-ACGTGTGCAGCCCAAGACA-3')

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้โครโมโซมมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10 ซึ่งสกัดด้วยวิธีของ Zhou และคณะ (1999) ตามวิธีในข้อ 3.13.1 เป็นแม่แบบ (template) ในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ประกอบด้วยสารผสม dNTP forward primer reward primer เอนไซม์ Tag DNA polymerase PCR บัฟเฟอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** แสดงส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่าง ๆ ในสารละลาย PCR 20 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรสเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ

รีเอเจนต์	ความเข้มข้นสุดท้าย
สารผสม dNTP (dNTP mixture)	0.2 mM
Primer 1 (forward)	0.5 $\mu$ M
Primer 2 (reverse)	0.5 $\mu$ M
แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) 25 mM	1.5 mM
แม่แบบ (DNA template)	5 ng
เอนไซม์ Tag DNA polymerase	0.5 U
1X PCR บัฟเฟอร์	-

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสประกอบด้วย 2 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทั้งหมด 38 รอบปฏิกิริยา ประกอบด้วย ขั้นตอน Denature ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 9 นาที ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 นาที และ ขั้นตอน Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 2 เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทั้งหมด 1 รอบปฏิบัติการ ประกอบด้วย ขั้น Denature ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที ขั้น Annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 นาที และ ขั้น Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นหยุดปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (PCR product) ที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

### 3.13.3 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบยีนที่มีขนาด 1500 เบส และ 1000 เบส โดยเตรียมอะกาโรสเจล 1.5% ซึ่งหลอมในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัว (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้แข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) ในอัตราส่วน 5:2 หยดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลแชนเบอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบส แพร์ ดีเอ็นเอแลดเดอร์ + 1.5 กิโลเบสแพร์

### 3.13.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

PCR product ที่ได้จากการใช้ primer 2 คู่ ได้แก่ PA กับ PH และ PA กับ StrepF ส่งวิเคราะห์ที่บริษัท วอร์ด เมติก จำกัด ในส่วนของ First BASE Laboratories, Selangor Darul Ehsan, ประเทศมาเลเซีย เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสใน GenBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/beta/> นำเอาข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสใน GenBank DNA database มาจัดเรียงลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม ClustalX และทำการสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.08 b

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ลักษณะของตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย จำนวน 36 ตัวอย่าง และบันทึก  
ลักษณะดิน สี และวัด pH ของตัวอย่างดิน ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มา pH และลักษณะของตัวอย่างดิน

ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะตัวอย่าง	pH
TM1	ดินใต้ต้นมะขาม บ้านแม่ปะ อ.แม่สอด จ.ตาก	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาล	8.18
TM2	ดินใต้ต้นขงโค บ้านแม่ปะ อ.แม่สอด จ.ตาก	ดินร่วนเนื้อละเอียด สีน้ำตาลอ่อน	7.83
TP1	ดินใต้ต้นองุ่น ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก	ดินร่วนปนทรายและแกลบ สีดำน้ำตาล	7.75
LH1	ดินใต้ต้นตะแบก อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง	ดินร่วนชื้น สีน้ำตาลดำ	9.09
LK1	ดินใต้ต้นคูณ อ.เกาะคา จ.ลำปาง	ดินร่วนชื้น สีน้ำตาลอ่อน	8.22
LK2	ดินใต้ต้นสะเดา อ.เกาะคา จ.ลำปาง	ดินร่วน สีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง	7.87
LK3	ดินใต้ต้นจามจุรี อ.เกาะคา จ.ลำปาง	ดินร่วน สีน้ำตาลแดง	8.72
NK1	ดินใต้ต้นยาง ต.มหาโพธิ์เหนือ อ.เก้าเลี้ยว จ.นครสวรรค์	ดินร่วน สีน้ำตาลอ่อน	7.61
NK2	ดินใต้ต้นมะม่วง ต.หาดเสลา อ.เก้าเลี้ยว จ.นครสวรรค์	ดินร่วน สีน้ำตาลอมเหลือง	8.22
NK3	ดินใต้ต้นมะลิ ต.แหลมยาง อ.เก้าเลี้ยว จ.นครสวรรค์	ดินร่วนชื้น เนื้อละเอียด สีดำ	8.49
NKP1	ดินใต้ต้นไผ่ ต.หนองปลิง อ.เมือง จ.นครสวรรค์	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม	7.19
NKP2	ดินใต้ต้นมะม่วง ริมแม่น้ำเจ้าพระยา อ.เมือง จ.นครสวรรค์	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม	7.13
NKP3	ดินในนาข้าว ต.ศาลาแดง อ.โกรกพระ จ.นครสวรรค์	ดินร่วนปนเหนียว สีน้ำตาลอ่อนปน ฟางข้าว	6.67
PL1	ดินในนาข้าว ต.คลองพระอุดม อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี	ดินเหนียวสีดำ ชื้น	7.22

ตารางที่ 4.1(ต่อ) แสดงแหล่งที่มา pH และลักษณะของตัวอย่างดิน

ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะตัวอย่าง	pH
NV1	ดินกองพีชไต้ต้นไผ่ อ.เวียงสา จ.น่าน	ดินร่วน สีน้ำตาลดำ ชื้น	7.80
NV2	ดินไต้ต้นไผ่ อ.เวียงสา จ.น่าน	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม	7.35
NV3	ดินไต้ต้นไผ่ อ.เวียงสา จ.น่าน	ดินร่วนปนรากไผ่ สีน้ำตาลอ่อน	6.98
NV4	ดินไต้ต้นสัก อ.เวียงสา จ.น่าน	ดินร่วน สีน้ำตาลดำ	7.18
NT1	ดินบริเวณเขานัน จ.นครศรีธรรมราช	ดินร่วนชื้น สีดำ	7.37
RK1	ปุ๋ยหมัก อ.เขาชะเมา จ.ระยอง	ดินเนื้อหยาบ สีน้ำตาลดำ	7.95
PB1	ปุ๋ยหมักเปลือกกล้วยน้ำว้า อ.บางกระพุ่ม จ.พิษณุโลก	ดินร่วน จับตัวเป็นก้อนเล็กๆ สีดำน้ำตาล	9.25
PT1	ปุ๋ยหมักขึ้นกกระทา ขี้วัว อ.ท่าตาล จ.พิษณุโลก	ดินร่วน เบา ปนขนนก สีน้ำตาลอมเทาขาว	7.18
PP1	ปุ๋ยกากชานอ้อย อ.ไผ่ล้อม จ.พิษณุโลก	ดินร่วน เนื้อละเอียด สีน้ำตาลอ่อน	7.35
CHR1	ดิน Balclay อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย	ดินร่วนปนเหนียว สีน้ำตาลดำ	6.93
SK1	ดินไต้ต้นสัก อ.โคกศรีสุพรรณ จ.สกลนคร	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม	7.22
SK2	ดินไต้ต้นตะขบ อ.เมือง จ.สกลนคร	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาลดำ	7.32
SK3	ดินกอไผ่ อ.โคกศรีสุพรรณ จ.สกลนคร	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม	7.45
RY1	ดินชายทะเล อ.เมือง จ.ระยอง	ดินทราย สีน้ำตาลอ่อน	7.12

ตารางที่ 4.1(ต่อ) แสดงแหล่งที่มา pH และลักษณะของตัวอย่างดิน

ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะตัวอย่าง	pH
NS1	ดินเขตป่าชุมชน กม.9 สันติสุข-ห้วยหลักลาย อ.สันติสุข จ.น่าน	ดินเนื้อละเอียด จับตัวเป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาลม่วง	6.63
NPP1	ดินเขตป่าชุมชน บ้านห้วยคำ ต.ฝายแก้ว กิ่งอ.ภูเพียง จ.น่าน	ดินร่วนละเอียด สีน้ำตาลเหลือง	6.78
NC1	ดินจอมปลวก บริเวณป่าจุฬา จ.น่าน	ดินร่วน สีน้ำตาล	6.68
NP1	ดินบริเวณศาลเจ้าหลวงภูคา ดอยภูคา อ.ป่า จ.น่าน	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม	7.31
NMJ1	ดินบริเวณโรงเรียนแม่จริม อ.แม่จริม จ.น่าน	ดินลูกรัง สีน้ำตาลเหลือง	7.26
NMJ2	ดินบริเวณบ้านนาทะนุง อ.นาหมื่น จ.น่าน	ดินร่วน สีน้ำตาลดำ	7.34
NST1	ดินบริเวณ อ.ฉวาง จ.นครศรีธรรมราช	ดินร่วน ชั้น สีน้ำตาลอ่อน	7.89
SRT1	ดินบริเวณ อ.ชัยบุรี จ.สุราษฎร์ธานี	ดินร่วน ชั้น สีน้ำตาลปนดำ	7.75

## 4.2 การแยกแอกติโนมัยซีตจากตัวอย่างดิน

จากการแยกแอกติโนมัยซีตจากตัวอย่างดิน 36 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ sodium caseinate agar ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.4 พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยซีตได้จำนวน 115 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

**ตารางที่ 4.2** แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 36 ตัวอย่าง

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่แยกได้	รวม
TM1	TM1-1, TM1-2, TM1-3	3
TM2	TM2-1, TM2-2, TM3-3, TM3-4, TM3-5	5
TP1	TP1-1, TP1-2, TP1-3	3
LH1	LH1-1, LH1-2	2
LK1	LK1-1, LK1-2, LK1-3	3
LK2	LK2-1	1
LK3	LK3-1, LK3-2, LK3-3, LK3-4, LK3-5, LK3-6, LK3-7, LK3-8, LK3-9, LK3-10	10
NK1	NK1-1, NK1-2, NK1-3, NK1-4	4
NK2	NK2-1, NK2-2, NK2-3, NK2-4	4
NK3	NK3-1, NK3-2, NK3-3	3
NKP1	NKP1-1, NKP1-2, NKP1-3, NKP1-4, NKP1-5, NKP1-6	6
NKP2	NKP2-1, NKP2-2, NKP2-3, NKP2-4	4
NKP3	NKP3-1, NKP3-2, NKP3-3, NKP3-4, NKP3-5, NKP3-6, NKP3- 7, NKP3-8, NKP3-9, NKP3-10, NKP3-11	11
PL1	PL1-1, PL1-2, PL1-3, PL1-4, PL1-5	5
NV1	NV1-1, NV1-2, NV1-3, NV1-4	4
NV2	NV2-1, NV2-2, NV2-3, NV2-4, NV2-5	5
NV3	NV3-1, NV3-2, NV3-3	3
NV4	NV4-1, NV4-2, NV4-3, NV4-4	4



ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 36 ตัวอย่าง

ตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่แยกได้	รวม
NT1	NT1-1, NT1-2	2
RK1	RK1-1, RK1-2, RK1-3, RK1-4	4
PB1	PB1-1	1
PT1	PT1-1, PT1-2, PT1-3	3
PP1	PP1-1, PP1-2, PP1-3, PP1-4, PP1-5	5
CHR1	CHR1-1, CHR1-2	2
SK1	SK1-1, SK1-2	2
SK2	SK2-1	1
SK3	SK3-1, SK3-2, SK3-3, SK3-4	4
RY1	RY1-1	1
NS1	NS1-1	1
NPP1	NPP1-1	1
NC1	NC1-1	1
NP1	NP1-1	1
NMJ1	NMJ1-1	1
NMJ2	NMJ2-1	1
NST1	NST1-1, NST1-2	2
SRT1	SRT1-1, SRT1-2	2

#### 4.3 การทดสอบการสร้างเซลล์ของแอกติโนมัยซีต

จากการแอกติโนมัยซีตจากตัวอย่างดิน 36 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ sodium caseinate agar ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.4 พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยซีตได้จำนวน 115 สายพันธุ์ และได้ทำการทดสอบการสร้างเซลล์เบื้องต้น โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ carboxymethylcellulose(CMC) agar โดยวัดความสามารถในการสร้าง C<sub>x</sub>-cellulase หรือ CMCase โดยหาอัตราส่วนขนาดของบริเวณที่ CMC ถูกย่อยสลาย(ภาพบริเวณใสรอบโคโลนี แสดงในรูปที่ 4.1) ต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Ratio of the size of CMC hydrolysis zone to colony diameter) ตามวิธีของ Hankin และ Anagonostakis (1977) ที่เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ พบแอกติโนมัยซีตที่สร้างเซลล์จำนวน 82 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ระดับของเซลล์ที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตที่แยกจากดินจำนวน 36 ตัวอย่าง

สายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่สร้างเซลล์	ระดับของการสร้างเซลล์	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่สร้างเซลล์	ระดับของการสร้างเซลล์
TM1-1	+++	NV2-3	+
TM1-2	++	NV2-4	++
TM1-3	++++	NV2-5	+++
TM2-1	+++	NV3-1	++
TM3-3	++	NV3-3	++
TP1-1	+	NV4-1	++
TP1-3	+	NV4-2	+++
LH1-1	++	NV4-3	+++
LH1-2	++	NV4-4	++
LK1-1	++	NT1-1	+
LK1-2	++	RK1-1	++
LK1-3	++	RK1-2	+
LK2-1	++	RK1-4	++
LK3-2	+++	PB1-1	+
LK3-3	++	PT1-1	+
LK3-4	++	PT1-2	++

ตารางที่ 4.3(ต่อ) ระดับของเซลล์เลสที่สร้างโดยแอกติโนไมยซีตที่แยกจากดินจำนวน 36 ตัวอย่าง

สายพันธุ์แอกติโนไมยซีตที่สร้างเซลล์เลส	ระดับของการสร้างเซลล์เลส	สายพันธุ์แอกติโนไมยซีตที่สร้างเซลล์เลส	ระดับของการสร้างเซลล์เลส
LK3-5	++	PP1-1	+++
LK3-7	++	PP1-2	+++
LK3-8	+	PP1-3	+
LK3-9	++	NV1-4	+++
LK3-10	++	NV2-1	+++
NK1-2	+	PP1-4	++++
NK2-1	++	PP1-5	+++
NK2-4	+++	CHR1-1	++
NKP1-1	+	CHR1-2	+
NKP1-2	+++	SK1-1	+
NKP1-3	+	SK1-2	+
NKP1-4	+	SK2-1	++
NKP1-5	++	SK3-1	++
NKP1-6	++	SK3-3	+
NKP2-1	++	NC1-1	++
NKP2-2	+	NP1-1	++
NKP2-3	++	NMJ1-1	++
NKP3-2	++++	NMJ2-1	++
NKP3-3	+	NS1-1	++
NKP3-4	+++	NPP1-1	++
NKP3-5	+	NST1-1	+
NKP3-10	++	NST1-2	+
PL1-1	+++	SRT1-1	+
PL1-3	++	SRT1-2	+
NV1-2	+		
NV1-3	+		

หมายเหตุ	++++	= อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใต้ต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี 4.1 – 4.5 เซนติเมตร
	+++	= อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใต้ต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี 3.1 – 4.0 เซนติเมตร
	++	= อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใต้ต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี 2.1 – 3.0 เซนติเมตร
	+	= อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใต้ต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี 1.0 – 2.0 เซนติเมตร
	-	= ไม่สร้างเซลล์เลส

ความสามารถในการสร้างเซลล์เลสของแอกติโนมัยซีดที่แยกได้ ระบุจัดเป็นกลุ่มไว้ใน ตารางที่ 4.4 และเปอร์เซ็นต์แสดงด้วยแผนภูมิวงกลมในรูปที่ 4.1

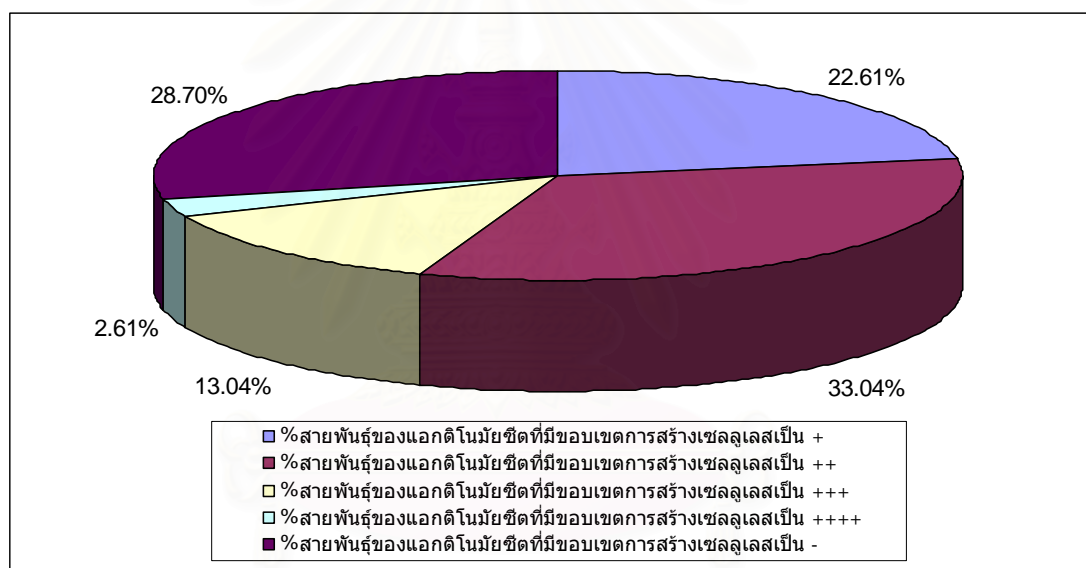
**ตารางที่ 4.4** จำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีดที่สร้างเซลล์เลสแต่ละกลุ่ม

ขอบเขตการสร้าง เซลล์เลส	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีด	รวม	%
++++	TM1-3, NKP3-2, PP1-4	3	2.61
+++	TM1-1, TM2-1, NV2-5, NV4-2, NV4-3, LK3-2 NK2-4, NKP1-2, NKP3-4, PL1-1, PP1-5, NV2-1 PP1-1, PP1-2, LK3-10	15	13.04
++	TM1-2, TM3-3, LH1-1, LK3-4, LK1-1, LK1-2 LK1-3, LK2-1, LK3-3, LH1-2, NV2-4, NV3-1 NV3-3, NV4-1, NV4-4, RK1-1, RK1-4, PT1-2 LK3-5, LK3-7, LK3-9, NK2-1, NKP1-5, NKP1-6 NKP2-3, NKP2-1, NKP3-10, PL1-3, NPP1-1, NS1-1 NMJ2-1, NMJ1-1, NP1-1, NC1-1, SK3-1, SK2-1 CHR1-1, NV1-4	38	33.04
+	TP1-1, TP1-3, PT1-1, NV2-3, RK1-2, NT1-1 PB1-1, LK3-8, NK1-2, NKP1-1, NKP1-3, NKP1-4 NKP2-2, NKP3-3, NV1-2, NV1-3, SRT1-2, SRT1-1 NST1-2, NST1-1, SK3-3, SK1-2, SK1-1, CHR1-2 PP1-3, NKP3-5	26	22.61



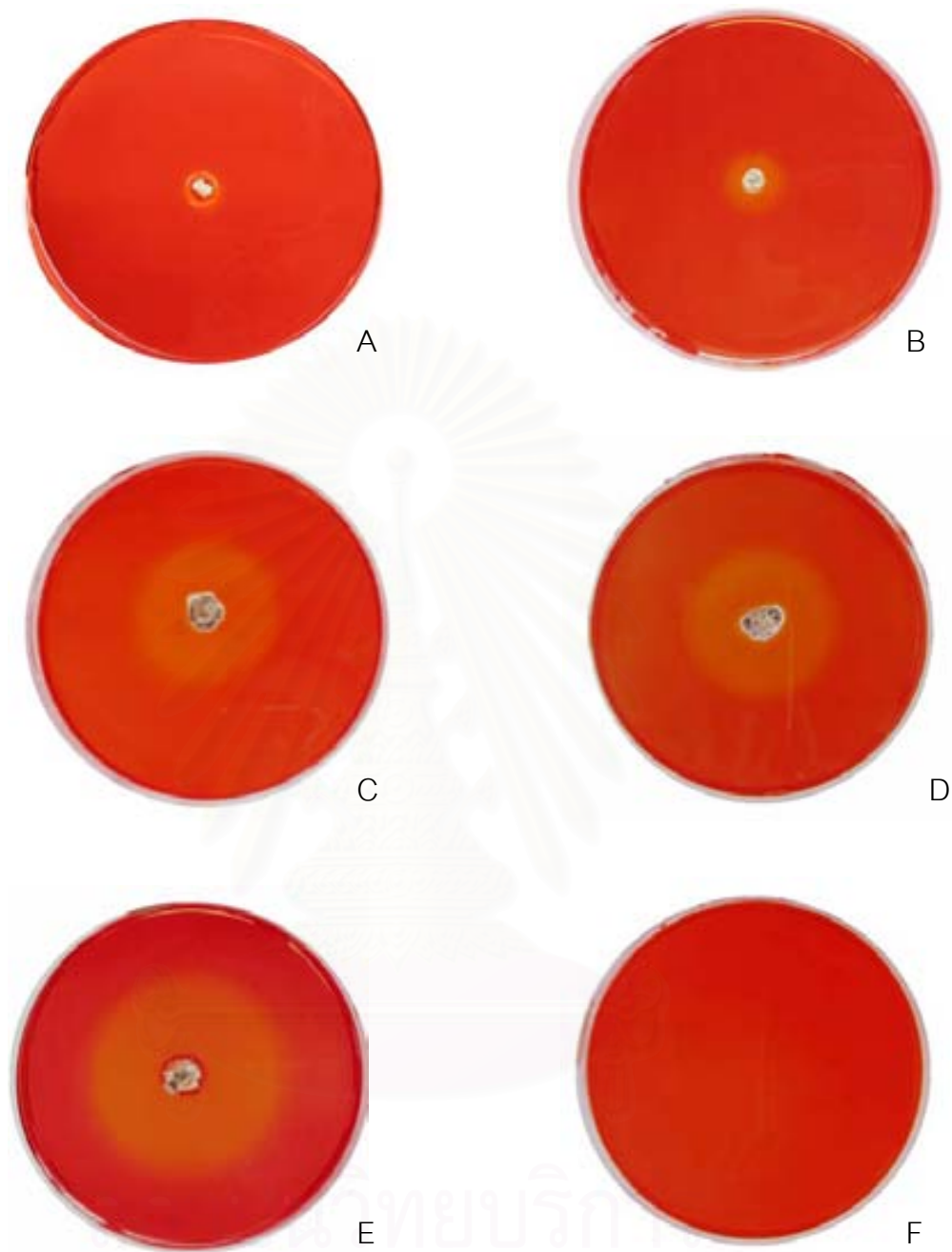
ตารางที่ 4.4 (ต่อ) จำนวนสายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีตที่สร้างเซลล์แต่ละกลุ่ม

ขอบเขตการสร้าง เซลล์	สายพันธุ์แอคติโนมัยซีต	รวม	%
-	TM2-2, TM3-4, TM3-5, TP1-2, LK3-1, LK3-6, NK1-1, NK1-3, NK1-4, NK2-2, NK2-3, NK3-1 NK3-2, NK3-3, NKP2-4, NKP3-1, NKP3-6, NKP3-7 NKP3-8, NKP3-9, NKP3-11, PL1-2, PL1-4, PL1-5 NV1-1, NV3-2, NV2-2, NT1-2, RK1-3, PT1-3 SK3-2, SK3-4, RY1-1	33	28.70



รูปที่ 4.1 แผนภูมิวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์การจัดกลุ่มการสร้างเซลล์ของแอคติโนมัยซีต

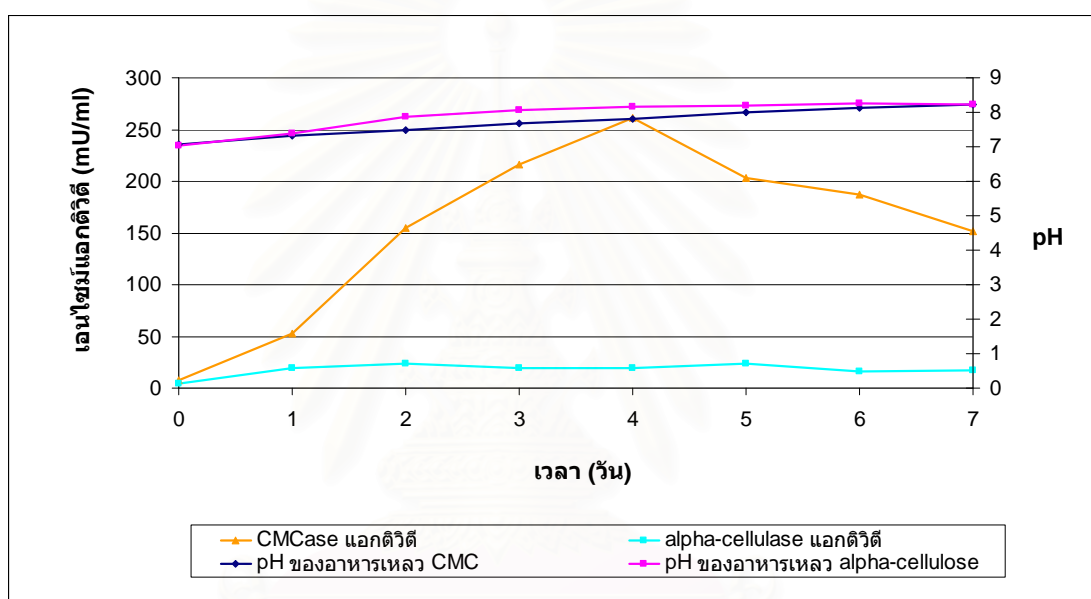
จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าจำนวนแอคติโนมัยซีตที่สามารถสร้างเซลล์มีจำนวน 71.30% และจำนวนแอคติโนมัยซีตที่ไม่สร้างเซลล์มีจำนวน 28.70% โดยทำการจัดอันดับจากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณไฮโดรไลซิสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Ratio of the size of CMC hydrolysis zone to colony diameter) โดยพบว่าแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในนาข้าว มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณไฮโดรไลซิสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่เวลา 7 วันมากที่สุดเท่ากับ 4.30 เซนติเมตร



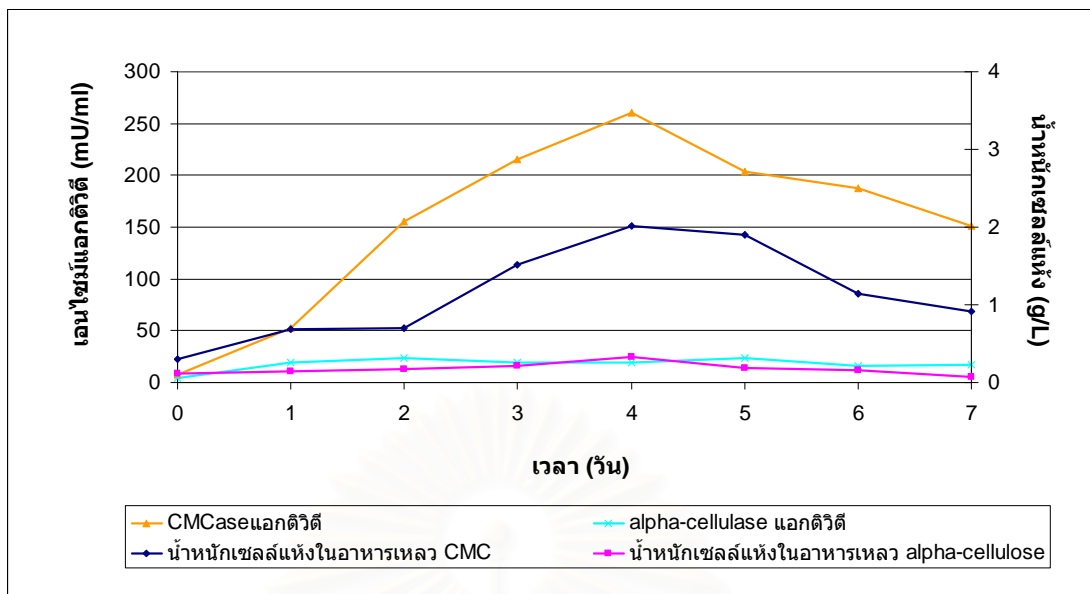
**รูปที่ 4.2** ภาพการสร้างเซลล์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 สังเกตจากบริเวณใสรอบโคโคโคนี้ เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CMC ในระยะเวลาต่างๆและเททับด้วยคองโก เรด A)ในวันที่ 1 B)ในวันที่ 3 C)ในวันที่ 5 D)ในวันที่ 7 E)ในวันที่ 14 และ F)ตัวควบคุม ตามลำดับ

#### 4.4 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนกับเซลล์แอกติวิตีของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2

นำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นแรก มาศึกษาการสร้างเซลล์ในอาหารเหลวที่ใช้ 0.5%CMC และ 0.5%alpha-cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนและ 0.1% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันเป็นเวลา 7 วัน และวัดแอกติวิตีของเซลล์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1994; Somogyi, 1952) ได้รับความสัมพันธ์ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4



รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลง CMCase และ alpha-cellulase และ pH ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.5 %CMC และ 0.5 %alpha-cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนในระยะเวลา 7 วัน



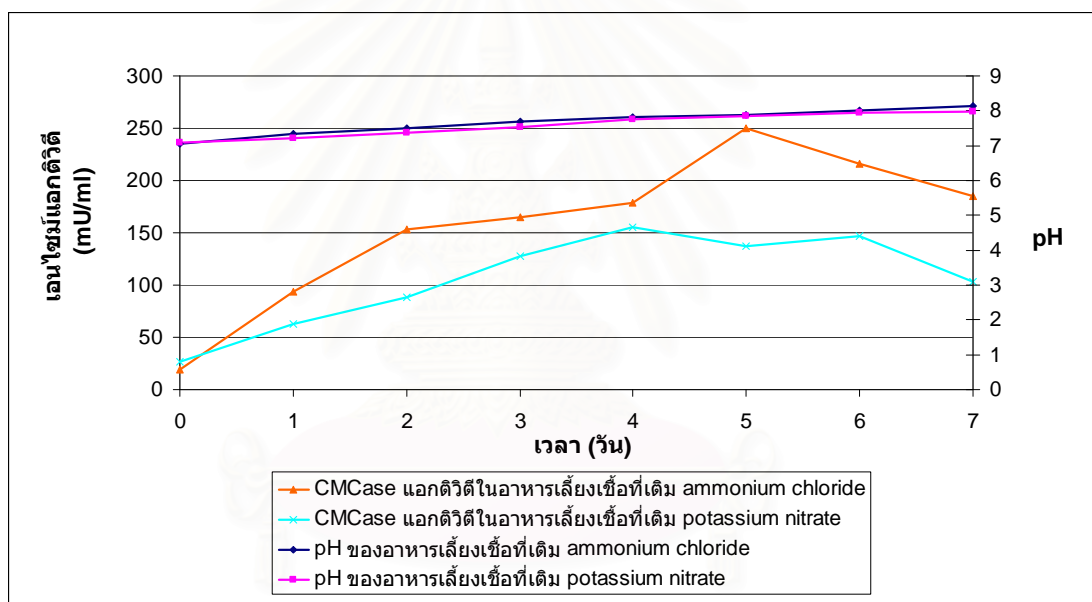
**รูปที่ 4.4** การเปลี่ยนแปลง CMCase และ alpha-cellulase และ น้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.5 % CMC และ 0.5 % alpha-cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนในระยะเวลา 7 วัน

จากรูปที่ 4.3 และ 4.4 ทำการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเหลวที่ใช้ CMC และ alpha-cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 สามารถใช้ CMC เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า alpha-cellulose ดังจะเห็นได้จากค่าของเซลล์แอกติวิตีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง โดยมีเซลล์แอกติวิตีเท่ากับ 260.86 mU/ml ขณะที่เซลล์แอกติวิตีของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อใช้ alpha-cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าค่อนข้างต่ำตลอดระยะเวลา 7 วัน และค่า pH มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยน้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น CMC มีค่าสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 2.01 g/l ในขณะที่เมื่อแหล่งคาร์บอนเป็น alpha-cellulose น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าค่อนข้างต่ำและมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 0.33 g/l

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

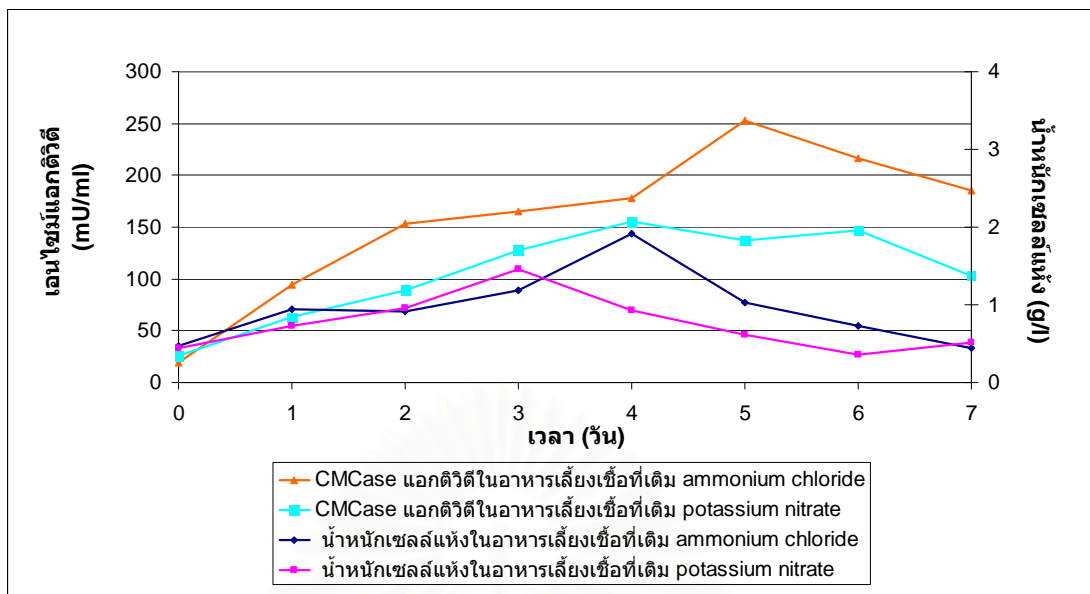
#### 4.5 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนกับเซลลูเลสแอกติวิตีของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2

นำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นแรก มาศึกษาการสร้างเซลลูเลสในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น  $0.04\% \text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $0.07\% \text{KNO}_3$  ซึ่งมีปริมาณเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) เท่ากับ เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ของ  $0.1\% \text{yeast extract}$  ในอาหารเหลว  $0.5\% \text{CMC}$  จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน และวัดแอกติวิตีของเซลลูเลส โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1994; Somogyi, 1952) ได้ความสัมพันธ์ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และ 4.6



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงเซลลูเลสแอกติวิตีและ pH ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม  $0.04\% \text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $0.07\% \text{KNO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจนในระยะเวลา 7 วัน



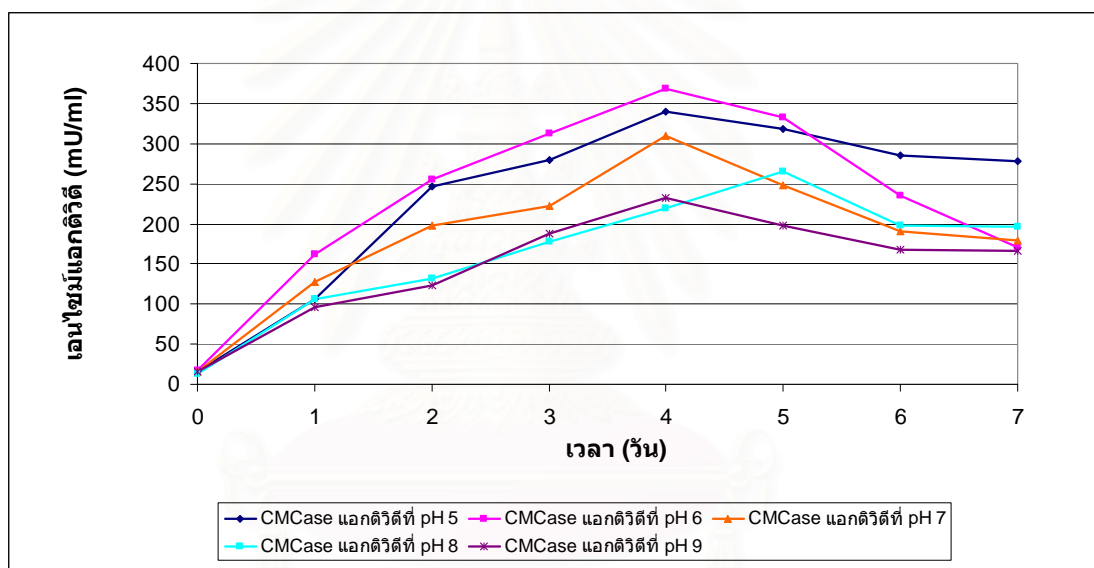


**รูปที่ 4.6** การเปลี่ยนแปลงเซลล์และแยกดีวีดีและน้ำหนักรเซลล์แห้งของแยกดีวีดีในผักโขมสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.04% $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ 0.07% $\text{KNO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจนในระยะเวลา 7 วัน

จากรูปที่ 4.5 และ 4.6 ทำการเลี้ยงเชื้อแยกดีวีดีในผักโขมสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $\text{KNO}_3$  พบว่าแยกดีวีดีในผักโขมสายพันธุ์ NKP3-2 สามารถใช้  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่า  $\text{KNO}_3$  ดังจะเห็นได้จากค่าของเซลล์และแยกดีวีดีที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง โดยมีเซลล์และแยกดีวีดีเท่ากับ 249.75 mU/ml โดยค่า pH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลา 7 วัน ขณะที่เซลล์และแยกดีวีดีของแยกดีวีดีในผักโขมสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อใช้  $\text{KNO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่าต่ำกว่าและค่อนข้างคงตัวในวันที่ 4, 5 และ 6 ในวันที่ 4 มีค่าเซลล์และแยกดีวีดีสูงสุดเท่ากับ 155.79 mU/ml โดยน้ำหนักรเซลล์แห้งของแยกดีวีดีในผักโขมสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น  $\text{NH}_4\text{Cl}$  มีค่าสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 1.91 g/l ในขณะที่เมื่อแหล่งไนโตรเจนเป็น  $\text{KNO}_3$  น้ำหนักรเซลล์แห้งมีค่าต่ำกว่าและมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 1.46 g/l

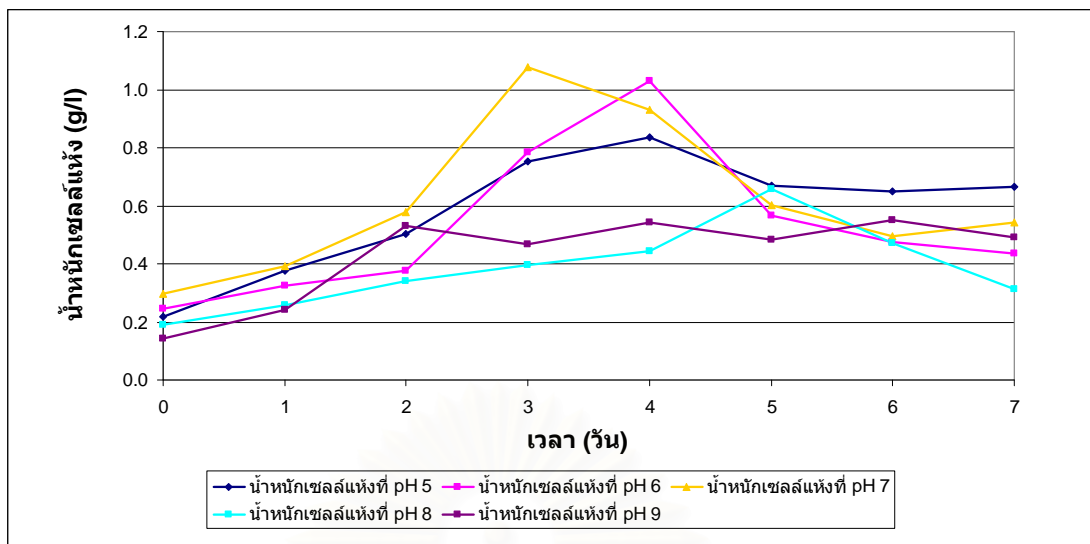
#### 4.6 การศึกษาผลของ pH กับเซลลูเลสแอกติวิตีของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2

นำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นแรก มาศึกษาการสร้างเซลลูเลสในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 0.5%CMCและแหล่งไนโตรเจนเป็น 0.1% yeast extract โดยมี pH เท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน และวัดแอกติวิตีของเซลลูเลส โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1994; Somogyi, 1952) ได้รับความสัมพันธ์ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8



รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงเซลลูเลสแอกติวิตีของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน

จากรูปที่ 4.6.1 พบว่าการสร้างเซลลูเลสในอาหารเหลวที่มี pH เท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเซลลูเลสแอกติวิตีมีค่าสูงสุด เท่ากับ 340.07 368.56 310.36 265.51 และ 232.17 mU/ml ในอาหารเหลวที่มีค่า pH เท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ โดยในอาหารเหลวที่มี pH เท่ากับ 6 เซลลูเลสแอกติวิตีมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 โดยมีค่าเท่ากับ 368.56 mU/ml

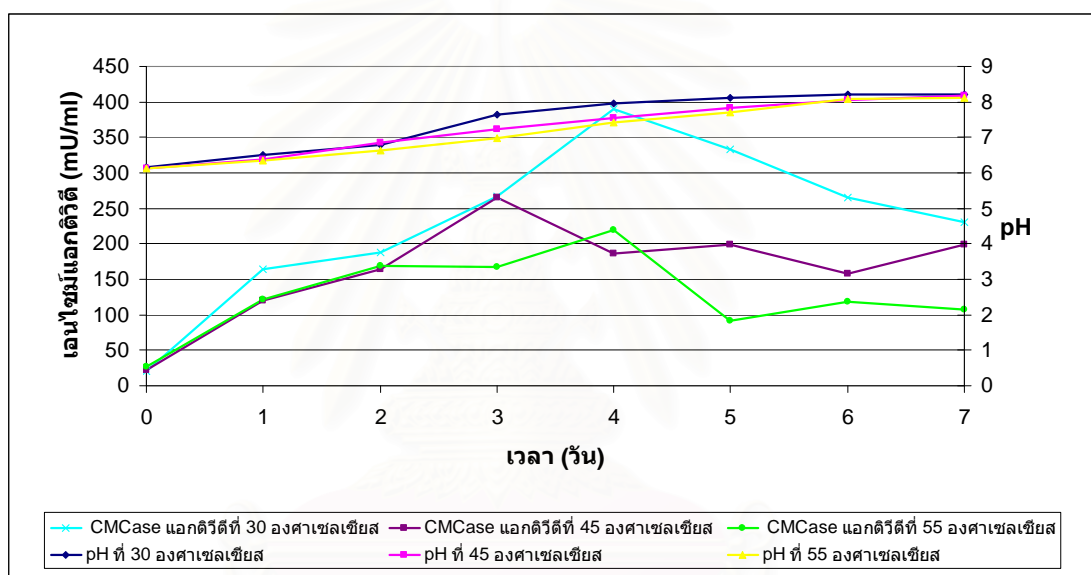


**รูปที่ 4.8** การเปลี่ยนแปลงน้ำน้กเซลล์แห้งของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน

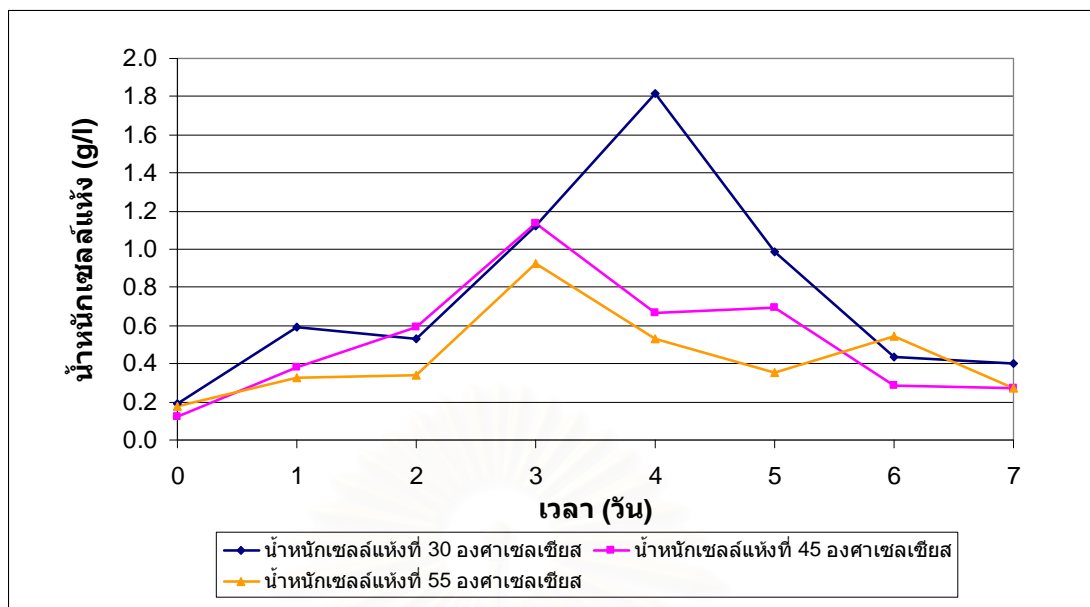
น้ำน้กเซลล์แห้งของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเหลวที่มี pH เท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 มีความแตกต่างกัน โดยในอาหารเหลวที่ pH 5 น้ำน้กเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 0.84 g/l อาหารเหลวที่ pH 6 น้ำน้กเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 1.03 g/l อาหารเหลวที่ pH 7 น้ำน้กเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 1.08 g/l อาหารเหลวที่ pH 8 น้ำน้กเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 0.66 g/l อาหารเหลวที่ pH 9 น้ำน้กเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 0.54 g/l จะเห็นได้ว่าในอาหารเหลวที่ pH 7 มีน้ำน้กเซลล์แห้งของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 สูงสุด รองลงมาคืออาหารเหลวที่ pH 6, 5, 8 และ 9 ตามลำดับ

#### 4.7 การศึกษาผลของอุณหภูมิกับเซลลูเลสแอกติวิตีของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2

นำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นแรก มาศึกษาการสร้างเซลลูเลสในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 0.5% CMC และแหล่งไนโตรเจนเป็น 0.1% yeast extract มี pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 45 และ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน และวัดแอกติวิตีของเซลลูเลส โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Somogyi-Nelson (Nelson, 1994; Somogyi, 1952) ได้ความสัมพันธ์ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงเซลลูเลสแอกติวิตีและ pH ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญที่อุณหภูมิ 30 45 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญที่ อุณหภูมิ 30 45 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในระยะเวลา 7 วัน

จากรูปที่ 4.9 และ 4.10 พบว่าการสร้างเซลล์ลูเลสในอาหารเหลวของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 45 และ 55 องศาเซลเซียส มีเซลล์ลูเลสแอกติวิตีสูงสุด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในวันที่ 4 โดยมีค่าเท่ากับ 390.38 mU/ml รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส โดยมีเซลล์ลูเลสแอกติวิตีเท่ากับ 264.90 และ 220.04 mU/ml ในวันที่ 3 และ 4 ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิเท่ากับ 30, 45 และ 55 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในวันที่ 4 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.82 g/l รองลงมาคือ ในวันที่ 3 ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.14 และ 0.93 g/l ตามลำดับ



#### 4.8 การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีตกับราที่ก่อให้เกิดโรคพืช

นำแอกติโนมัยซีตที่แยกได้ทั้งหมด 115 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ ด้วยวิธี Dual-culture (Aghighi S. *et al.*,2004) กับราที่ก่อโรคในพืชจำนวน 6 ชนิด ได้แก่

1. *Pythium aphanidermatum* DOAC 1662
2. *Phytophthora parasitica* DOAC 0005
3. *Collectotrichum capsici* DOAC 1196
4. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DOAC 0874
5. *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* DOAC 0893
6. *Alternaria porri* DOAC 1756

พบว่าแอกติโนมัยซีตแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีต	ระดับการยับยั้งการเจริญของราทดสอบ					
	<i>Pythium aphanidermatum</i> DOAC 1662	<i>Phytophthora parasitica</i> DOAC 0005	<i>Collectotrichum capsici</i> DOAC 1196	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> DOAC 0874	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> DOAC 0893	<i>Alternaria porri</i> DOAC 1756
TM1-1	++	-	+	-	-	++
TM1-2	+++	-	-	-	+	-
TM1-3	-	-	-	-	-	-
TM2-1	-	-	++	-	-	-
TM2-2	+	-	+	-	+	-
TM3-3	-	-	-	-	-	-
TM3-4	+	+	+	-	-	++

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีต	ระดับการยับยั้งการเจริญของราทดสอบ					
	<i>Pythium aphanidermatum</i> DOAC 1662	<i>Phytophthora parasitica</i> DOAC 0005	<i>Collectotrichum capsici</i> DOAC 1196	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> DOAC 0874	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> DOAC 0893	<i>Alternaria porri</i> DOAC 1756
TM3-5	++	+	+++	-	-	+
TP1-1	-	-	-	-	-	-
TP1-2	+++	++	+	-	+	++
TP1-3	-	-	-	-	-	-
LH1-1	-	-	-	-	-	-
LH1-2	++	-	++	++	-	+
LK1-1	+	+	+	-	-	+
LK1-2	-	-	-	-	-	-
LK1-3	-	+	+	-	-	+
LK2-1	-	-	-	-	-	-
LK3-1	++	+	+	+	+	+
LK3-2	-	-	-	-	-	-
LK3-3	+++	+	+	++	+++	++
LK3-4	-	-	-	-	-	-
LK3-5	+	-	-	-	-	-
LK3-6	-	-	+	++	-	+
LK3-7	-	-	-	-	-	-
LK3-8	+	-	+	++	++	+
LK3-9	++	+	+	-	-	+
LK3-10	++++	++	+++	+++	+++	++
NK1-1	+++	+	+	-	-	+
NK1-2	-	-	-	-	-	-
NK1-3	++	-	+	+	+	+

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีต	ระดับการยับยั้งการเจริญของราทดสอบ					
	<i>Pythium aphanidermatum</i> DOAC 1662	<i>Phytophthora parasitica</i> DOAC 0005	<i>Collectotrichum capsici</i> DOAC 1196	<i>Fusarium oxysporum f.sp.</i> <i>lycopersici</i> DOAC 0874	<i>Fusarium oxysporum f.sp.</i> <i>cubense</i> DOAC 0893	<i>Alternaria porri</i> DOAC 1756
NK1-4	++	+	+	++	++	+
NK2-1	+	-	++	+	-	+
NK2-2	-	-	-	-	-	-
NK2-3	++	-	+	-	-	++
NK2-4	-	-	-	-	-	-
NK3-1	-	-	-	-	-	-
NK3-2	-	-	-	-	-	-
NK3-3	+	-	+	+	+	+
NKP1-1	++	++	++	+	+	+
NKP1-2	-	-	-	-	-	-
NKP1-3	+++	+	+	-	-	++
NKP1-4	-	-	-	-	-	-
NKP1-5	++	+	+	-	-	+
NKP1-6	+++	-	+++	-	-	+
NKP2-1	+	++	+	++	++	+
NKP2-2	-	-	-	-	-	-
NKP2-3	-	-	+	-	+	+
NKP2-4	+	-	-	-	-	-
NKP3-1	+	-	+	-	-	+
NKP3-2	++++	+++	++	++	++	+
NKP3-3	+	++	+	-	-	+
NKP3-4	++	-	+	+	+	++
NKP3-5	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีต	ระดับการยับยั้งการเจริญของราทดสอบ					
	<i>Pythium aphanidermatum</i> DOAC 1662	<i>Phytophthora parasitica</i> DOAC 0005	<i>Collectotrichum capsici</i> DOAC 1196	<i>Fusarium oxysporum f.sp.</i> <i>lycopersici</i> DOAC 0874	<i>Fusarium oxysporum f.sp.</i> <i>cubense</i> DOAC 0893	<i>Alternaria porri</i> DOAC 1756
NKP3-6	++	+	++	-	-	+
NKP3-7	+++	-	+	++	++	+
NKP3-8	-	-	-	-	-	-
NKP3-9	-	-	-	-	-	-
NKP3-10	++	+	+	+	-	+
NKP3-11	-	++	+	+	+	+
PL1-1	+++	-	++	-	-	+
PL1-2	-	-	-	-	-	-
PL1-3	+	++	+	++	+	-
PL1-4	-	-	+	++	++	+
PL1-5	-	-	-	-	-	-
NV1-1	-	+	+	+	+	++
NV1-2	-	-	-	-	-	-
NV1-3	++	+	++	-	+	+
NV1-4	++++	++	++	+++	+++	+
NV2-1	+	-	+	+	-	+
NV2-2	-	-	-	-	-	-
NV2-3	-	-	-	-	-	-
NV2-4	+++	-	++	++	+	+
NV2-5	++	-	++	-	-	++
NV3-1	+	-	+	-	+	+
NV3-2	-	-	-	-	-	-
NV3-3	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีต	ระดับการยับยั้งการเจริญของราทดสอบ					
	<i>Pythium aphanidermatum</i> DOAC 1662	<i>Phytophthora parasitica</i> DOAC 0005	<i>Collectotrichum capsici</i> DOAC 1196	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> DOAC 0874	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> DOAC 0893	<i>Alternaria porri</i> DOAC 1756
NV4-1	-	-	+	-	+	+
NV4-2	-	-	-	-	-	-
NV4-3	-	-	+	++	++	+
NV4-4	+	+	+	+	+	+
NT1-1	-	-	-	-	-	-
NT1-2	++	-	+	-	-	+
RK1-1	-	-	-	-	-	-
RK1-2	-	-	-	-	-	-
RK1-3	++	-	+	-	-	+
RK1-4	++	+++	-	-	-	-
PB1-1	-	-	-	-	-	-
PT1-1	-	-	-	-	-	-
PT1-2	+++	++	+	-	-	++
PT1-3	-	-	++	-	-	+
PP1-1	-	-	-	-	-	-
PP1-2	-	+	+	+	-	+
PP1-3	-	+	++	-	+	+
PP1-4	-	-	-	-	-	-
PP1-5	+++	+	+	-	+	++
CHR1-1	++	-	++	-	-	-
CHR1-2	+	+	++	+	+	+
SK1-1	-	-	-	-	-	-
SK1-2	++	+	+	++	+	+



ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีต	ระดับการยับยั้งการเจริญของราทดสอบ					
	<i>Pythium aphanidermatum</i> DOAC 1662	<i>Phytophthora parasitica</i> DOAC 0005	<i>Collectotrichum capsici</i> DOAC 1196	<i>Fusarium oxysporum f.sp.</i> <i>lycopersici</i> DOAC 0874	<i>Fusarium oxysporum f.sp.</i> <i>cubense</i> DOAC 0893	<i>Alternaria porri</i> DOAC 1756
SK2-1	++	+	++	-	+	+
SK3-1	+	-	++	-	-	+
SK3-2	-	-	-	-	-	-
SK3-3	+++	+++	+	-	-	++
SK3-4	+	-	+	+	+	+
RY1-1	++	-	-	-	+	-
NS1-1	+	++	+	+	-	+
NPP1-1	-	-	+	-	++	+
NC1-1	+	+	+	+	-	+
NP1-1	+	-	+	-	++	+
NMJ1-1	+	++	+	-	-	+
NMJ2-1	+	-	+	-	-	+
NST1-1	-	+	+	-	+	+
NST1-2	++	-	+	+	+	+
SRT1-1	++	+	+	+	+	+
SRT1-2	+	+	+	-	-	+

หมายเหตุ

++++ = ระยะทางที่เส้นใยของราถูกยับยั้ง ( $\Delta\gamma$ ) เฉลี่ย มากกว่า 20 มิลลิเมตร

+++ = ระยะทางที่เส้นใยของราถูกยับยั้ง ( $\Delta\gamma$ ) เฉลี่ย 10.1-20 มิลลิเมตร

++ = ระยะทางที่เส้นใยของราถูกยับยั้ง ( $\Delta\gamma$ ) เฉลี่ย 5.1-10 มิลลิเมตร

+ = ระยะทางที่เส้นใยของราถูกยับยั้ง ( $\Delta\gamma$ ) เฉลี่ย 2-5 มิลลิเมตร

- = ราไม่ถูกยับยั้ง

$\Delta\gamma$  = ระยะทางที่เส้นใยของรากถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนไมซีต (มิลลิเมตร)

$\gamma$  = ระยะทางที่เส้นใยเจริญในระนาบเดียวกับแอกติโนไมซีต (มิลลิเมตร)

$\gamma_0$  = รัศมีการเจริญเติบโตของรากควบคุม (มิลลิเมตร)

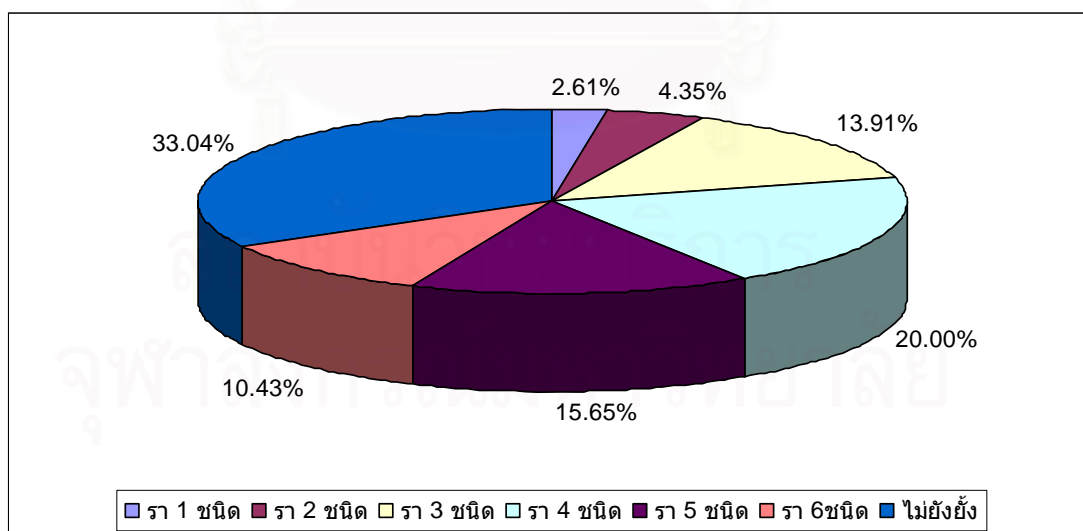
ตารางที่ 4.6 แสดงจำนวนสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่ม และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แสดงดังแผนภูมิวงกลมรูป ที่ 4.11

ตารางที่ 4.6 จัดกลุ่มจำนวนชนิดราโรคพืชที่ถูกยับยั้งโดยแอกติโนไมซีตที่แยกได้

จำนวนชนิดราโรคพืชที่ถูกยับยั้ง	สายพันธุ์แอกติโนไมซีต	รวม	%
รา 1 ชนิด	TM2-1, LK3-5, NKP2-4	3	2.61
รา 2 ชนิด	TM1-2, RK1-4, PT1-3, CHR1-1, RY1-1	5	4.35
รา 3 ชนิด	TM1-1, TM2-2, LK1-3, LK3-6, NK2-3, NKP1-6, NKP2-3 NKP3-1, PL1-1, NV2-5, NV4-1, NT1-2, RK1-3, SK3-1 NPP1-1, NMJ2-1	16	13.91
รา 4 ชนิด	TM3-4, TM3-5, LH1-2, LK1-1, LK3-9, NK1-1, NK2-1 NKP1-3, NKP1-5, NKP3-3, NKP3-6, PL1-4, NV2-1 NV3-1, NV4-3, PT1-2, PP1-2, PP1-3, SK3-3, NP1-1 NMJ1-1, NST1-1, SRT1-2	23	20.00
รา 5 ชนิด	TP1-2, LK3-8, NK1-3, NK3-3, NKP3-4, NKP3-7, NKP3-10 NKP3-11, PL1-3, NV1-1, NV1-3, NV2-4, PP1-5, SK2-1 SK3-4, NS1-1, NST1-2	18	15.65

ตารางที่ 4.6(ต่อ) จัดกลุ่มจำนวนชนิดราโรคพืชที่ถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีตที่แยกได้

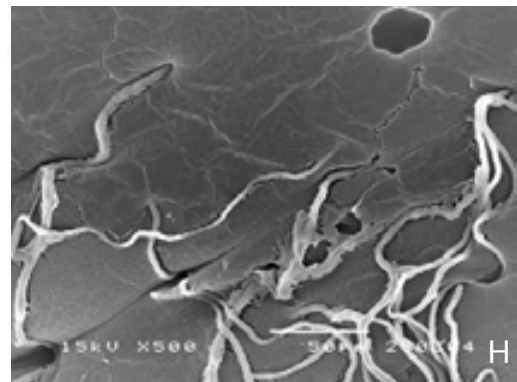
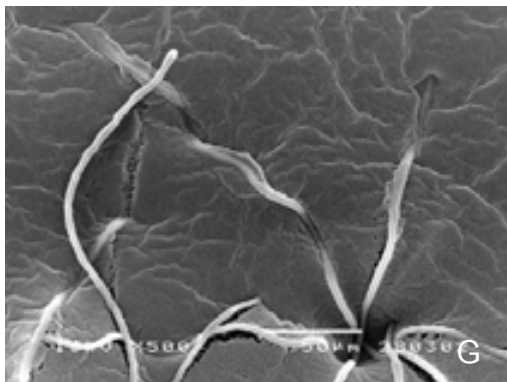
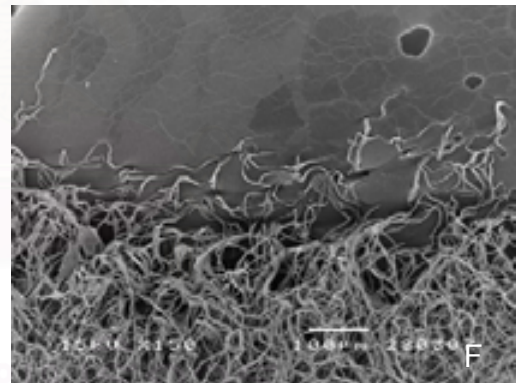
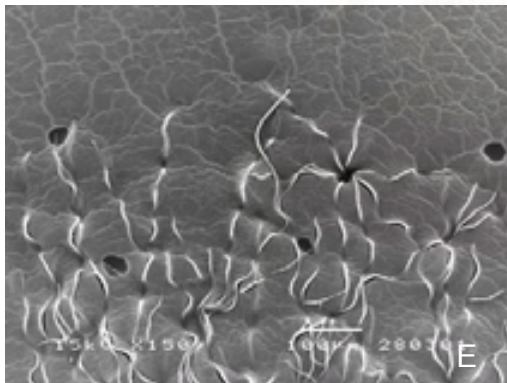
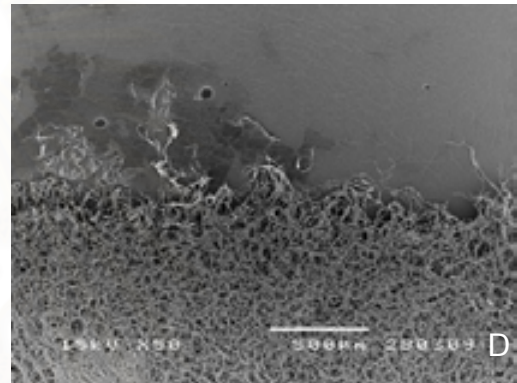
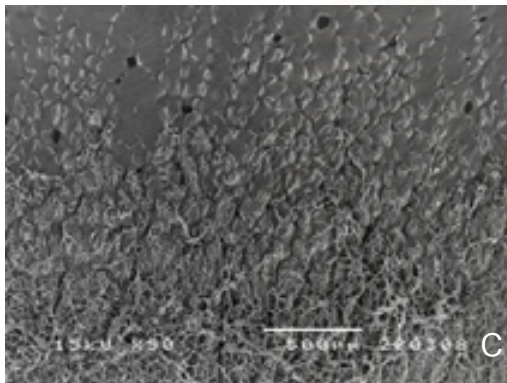
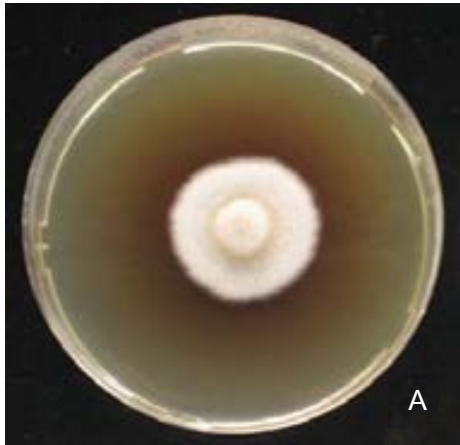
จำนวนชนิดราโรคพืชที่ถูกยับยั้ง	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต	รวม	%
รา 6 ชนิด	LK3-1, LK3-3, LK3-10, NK1-4, NKP1-1, NKP2-1, NKP3-2 NV1-4, NV4-4, CHR1-2, SK1-2, SRT1-1	12	10.43
ไม่ยับยั้งจากทดสอบ	TM1-3, TM3-3, TP1-1, TP1-3, LH1-1, LK1-2, LK2-1, LK3-2, LK3-4, LK3-7, NK1-2, NK2-2, NK2-4, NK3-1 NK3-2, NKP1-2, NKP1-4, NKP2-2, NKP3-5, NKP3-8 NKP3-9, PL1-2, PL1-5, NV1-2, NV2-2, NV2-3, NV3-2 NV3-3, NV4-2, NT1-1, RK1-1, RK1-2, PB1-1, PT1-1 PP1-1, PP1-4, SK1-1, SK3-2	38	33.04



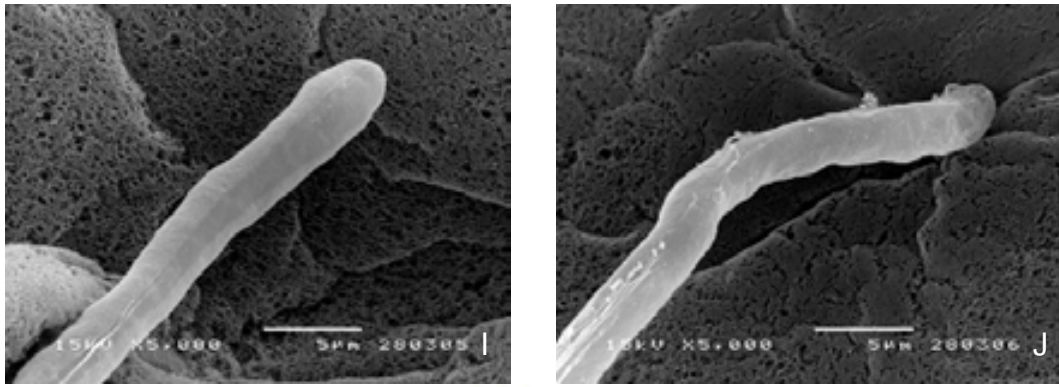
รูปที่ 4.11 แผนภูมิวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์ของแอกติโนมัยซีตต่อจำนวนชนิดการยับยั้งราโรคพืช

จากรูปที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าแอกติโนมัยซีดที่แยกได้สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืช 66.96% ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืช 33.04% นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ของแอกติโนมัยซีดที่สามารถยับยั้งราได้ชนิดเดียวมีจำนวน 2.61% ยับยั้งราได้ 2 ชนิดมีจำนวน 4.35% ยับยั้งราได้ 3 ชนิดมีจำนวน 13.91% ยับยั้งราได้ 4 ชนิดมีจำนวน 20.00% ยับยั้งราได้ 5 ชนิดมีจำนวน 15.65% ยับยั้งราได้ 6 ชนิดมีจำนวน 10.43% ทั้งนี้ในจำนวนแอกติโนมัยซีดที่สร้างสารปฏิชีวนะทั้งหมด แอกติโนมัยซีดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งราโรคพืชได้ 4 ชนิด ซึ่งชนิดของราทดสอบที่ถูกยับยั้งมีความแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์แอกติโนมัยซีด

จากการคัดเลือกแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะพบว่าสายพันธุ์ LK3-10 มีความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิด (Broad spectrum) ทั้งยังมีความสามารถในการยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ในระดับสูงสุด และเพื่อแสดงผลกระทบและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของราทดสอบด้วยสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ LK3-10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ได้ไว้ในรูปที่ 4.12-4.17 โดยจะเห็นได้ว่า บริเวณปลายของเส้นใยที่ถูกยับยั้งส่วนใหญ่จะมีลักษณะทางสรีรวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เช่น ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีด จะมีโครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์ เส้นใยมีการหดสั้นลง ขนาดเล็กลง หยักและเจริญได้น้อย เส้นใยมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน มีการกระจายตัวแบบหลวมๆ ลักษณะผนังเส้นใยมีการเปลี่ยนแปลง เป็นต้น สายพันธุ์ NV1-4 มีความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิดได้ดีรองลงมา และสายพันธุ์ NKP3-2 มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราโรคพืชได้ในระดับดี ดังรูปที่ 4.18 และแสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีดที่คัดเลือกทั้งสามชนิด ดังรูปที่ 4.19-4.24

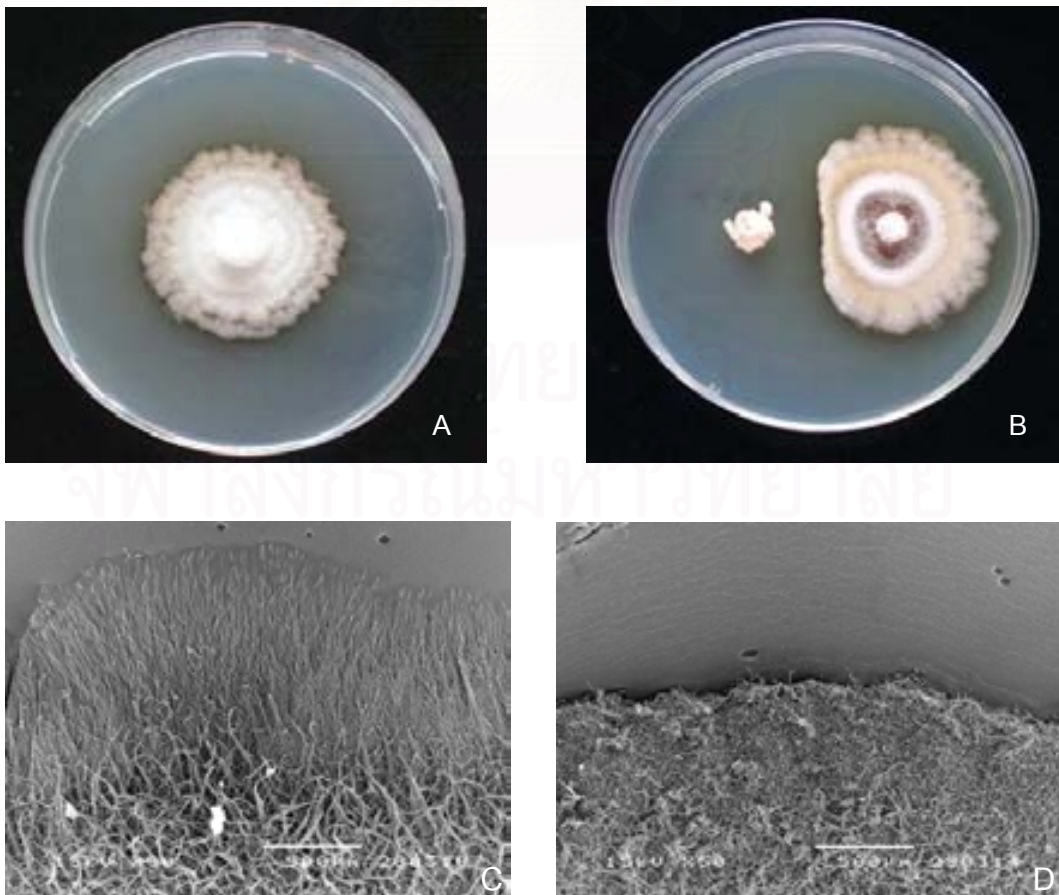


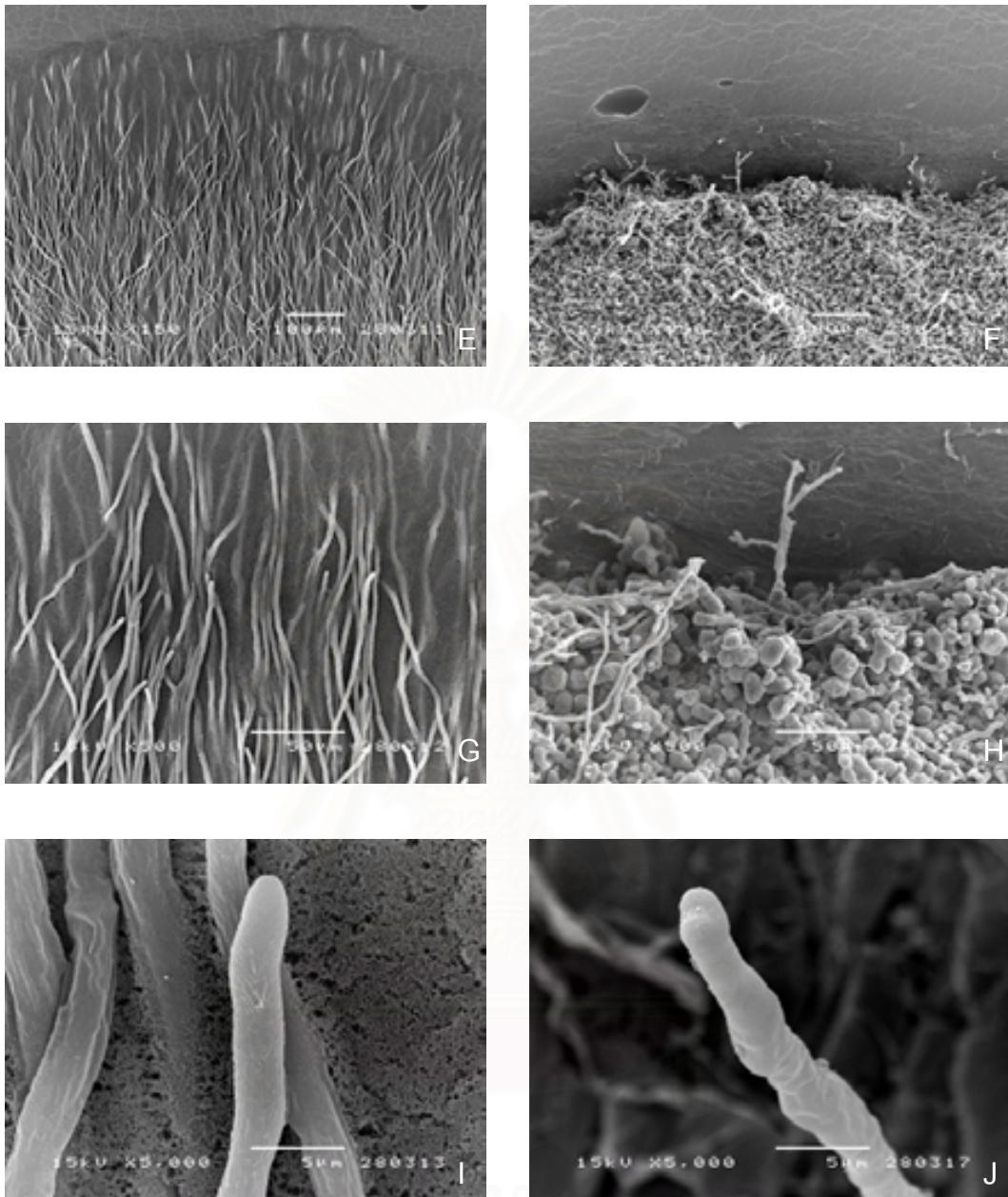




**รูปที่ 4.12** แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ *Alternaria porri* DOAC 1756 (จากการสร้างโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10) A) ในจานเลี้ยงเชื้อ C) กำลังขยาย 50x E) กำลังขยาย 150x G) กำลังขยาย 500x และ I) กำลังขยาย 5000x ในชุดควบคุม B) ในจานเลี้ยงเชื้อ D) กำลังขยาย 50x F) กำลังขยาย 150x H) กำลังขยาย 500x และ J) กำลังขยาย 5000x ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีต

จากรูปที่ 4.12 จะเห็นได้ว่า ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีตเส้นใยของรา *Alternaria porri* มีโครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์ มีการหดตัว หดสั้นและหงิกงอ ขณะที่ชุดควบคุมเส้นใยมีโครงสร้างที่สมบูรณ์ มีการกระจายตัว ยืดยาวแผ่ออกไปได้

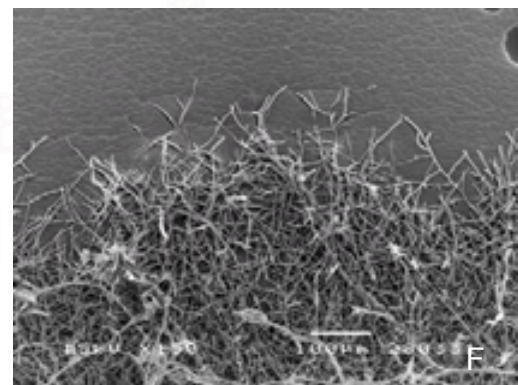
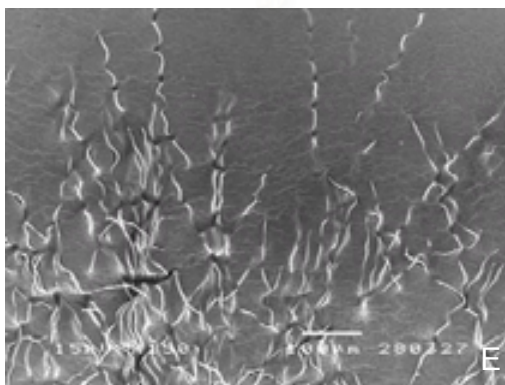
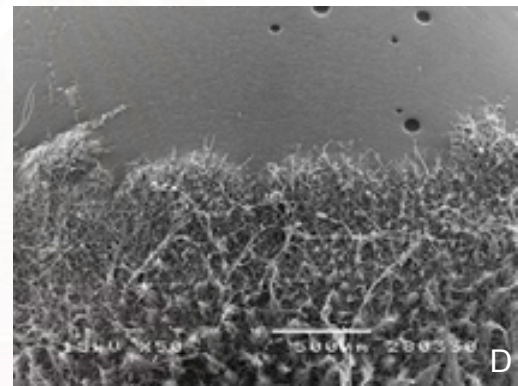
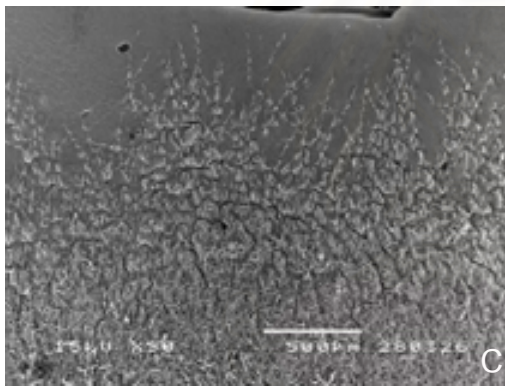
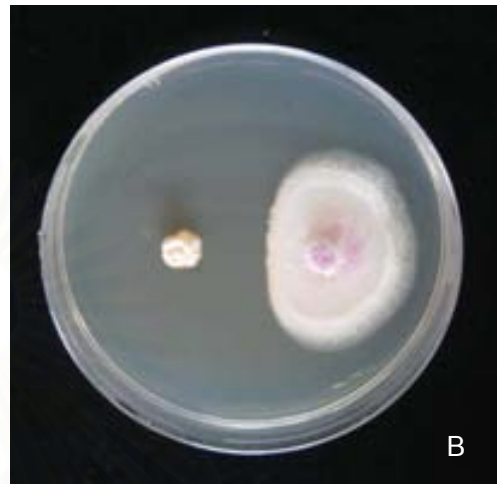
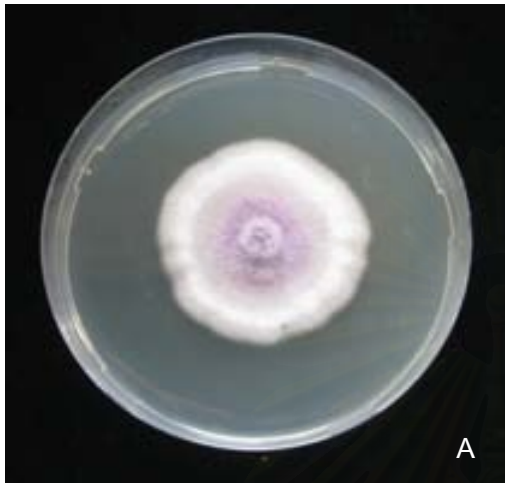




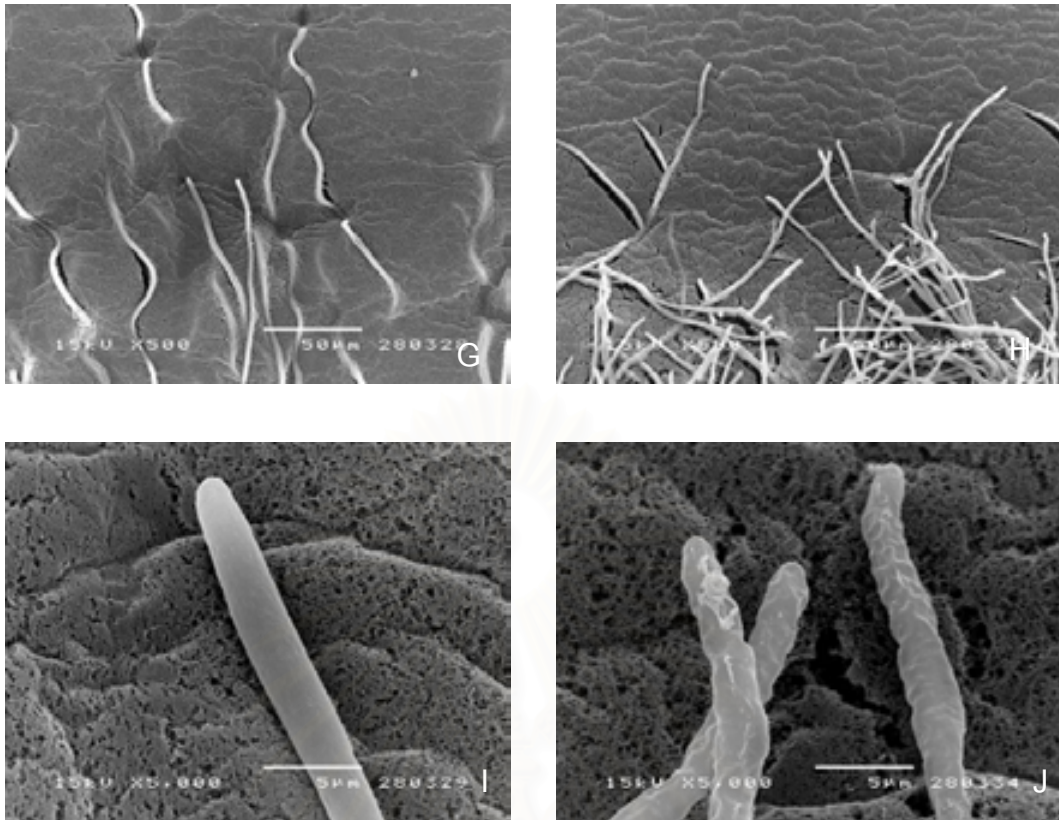
**รูปที่ 4.13** แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ *Collectotrichum capsici* DOAC 1196 (จากการสร้าง โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10) A) ในจานเลี้ยงเชื้อ C) กำลังขยาย 50x E) กำลังขยาย 150x G) กำลังขยาย 500x และ I) กำลังขยาย 5000x ในชุดควบคุม B) ในจานเลี้ยงเชื้อ D) กำลังขยาย 50x F) กำลังขยาย 150x H) กำลังขยาย 500x และ J) กำลังขยาย 5000x ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีต

จากรูปที่ 4.13 จะเห็นได้ว่า ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีตเส้นใยของรา *Collectotrichum capsici* มีโครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์ เส้นใยบริเวณปลายไม่สามารถเจริญแผ่

ออกไปได้ มีการหดตัว หดสั้น มีรอยหยัก มีการกระจุกตัวรวมกันอย่างหนาแน่น ขณะที่ชุดควบคุม  
เส้นใยมีโครงสร้างที่สมบูรณ์ มีการกระจายตัว ยืดยาวแผ่ออกไปได้



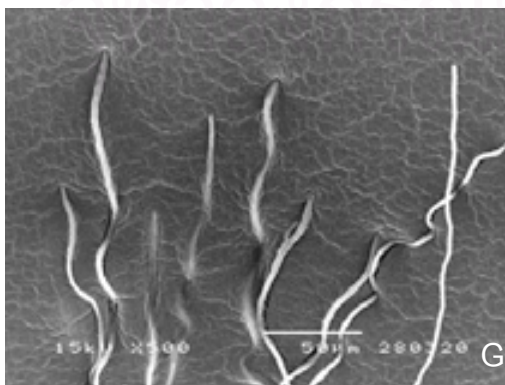
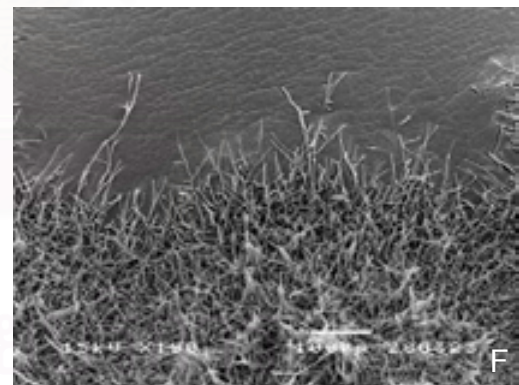
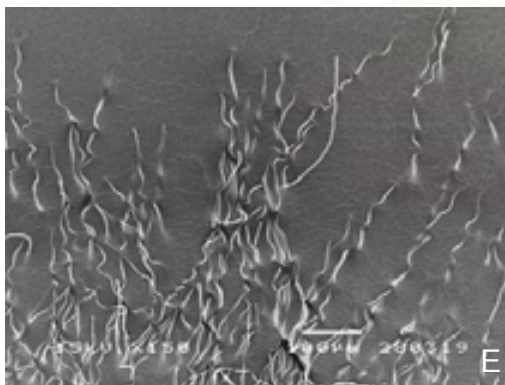
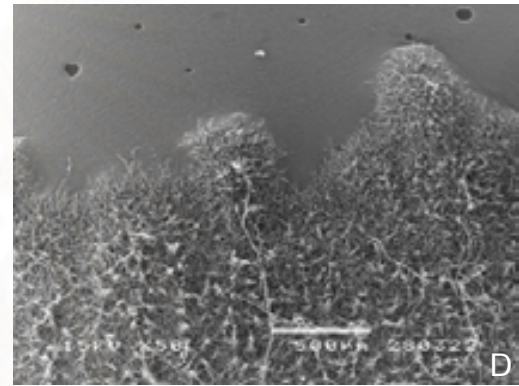
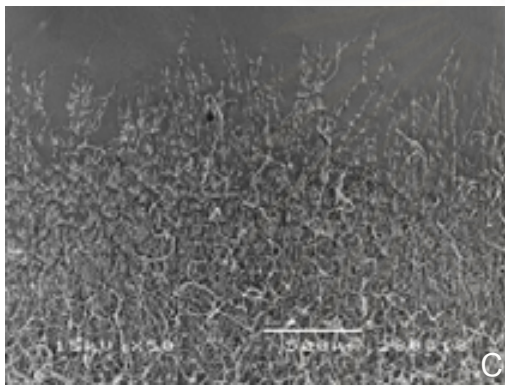
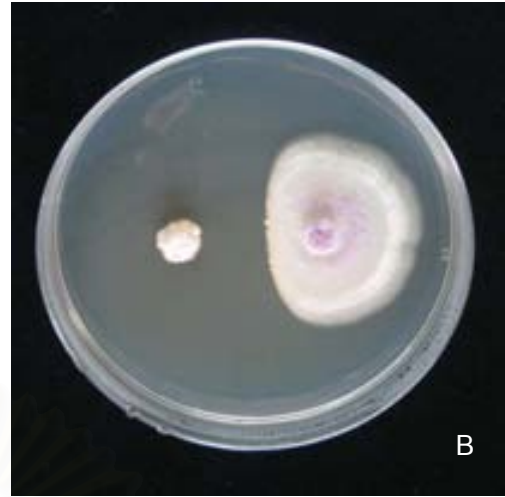
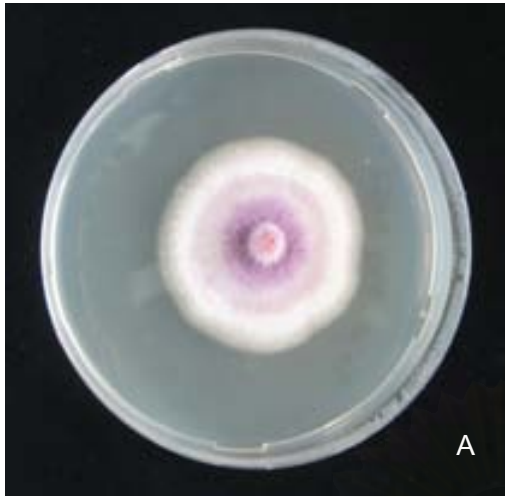




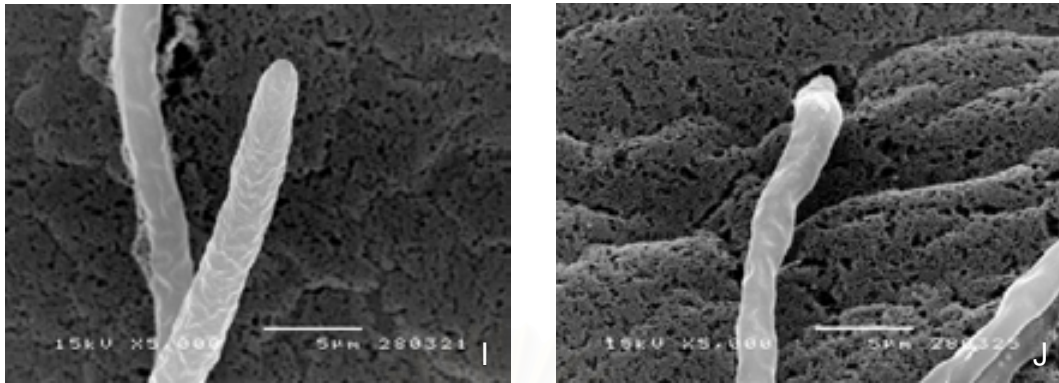
**รูปที่ 4.14** แสดงผลกระทบบของสารปฏิชีวนะต่อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DOAC 0874 (จากการสร้าง โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10) A)ในจานเลี้ยงเชื้อ C)กำลังขยาย 50x E)กำลังขยาย 150x G)กำลังขยาย 500x และ I)กำลังขยาย 5000x ในชุดควบคุม B)ในจานเลี้ยงเชื้อ D)กำลังขยาย 50x F)กำลังขยาย 150x H)กำลังขยาย 500x และ J)กำลังขยาย 5000x ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีต

จากรูปที่ 4.14 จะเห็นได้ว่า ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีตเส้นใยของรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DOAC 0874 มีโครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์ มีการหดตัว หดสั้น มีรอยขรุขระ ขณะที่ชุดควบคุมเส้นใยมีโครงสร้างที่สมบูรณ์ มีการกระจายตัว เจริญประสานกันยืดยาวแผ่ออกไปได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

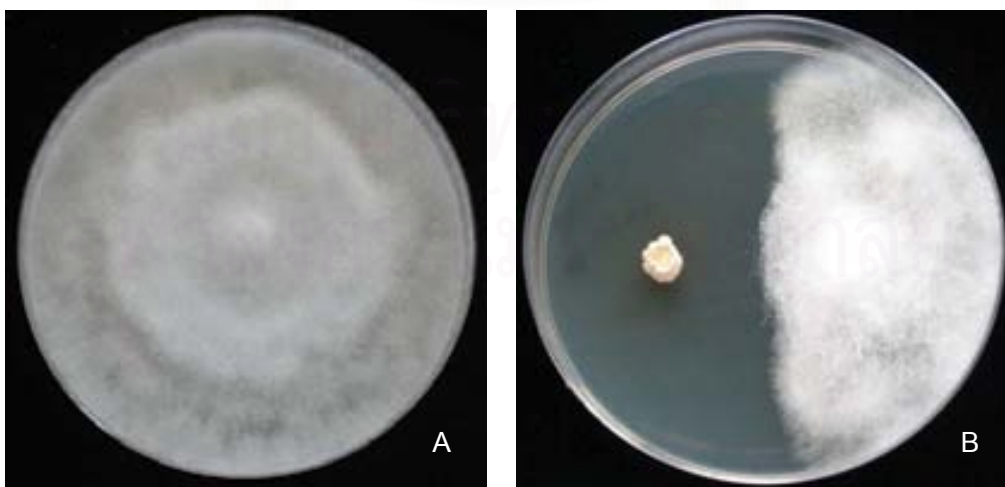


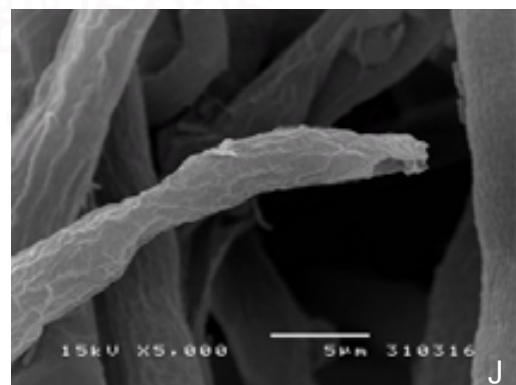
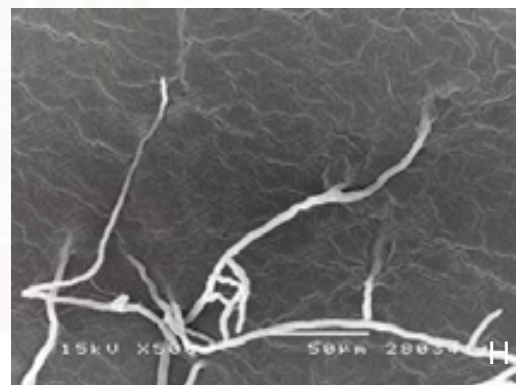
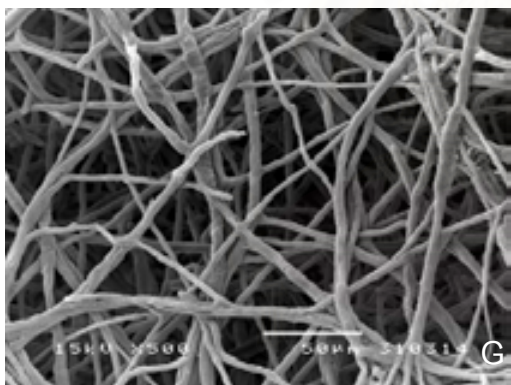
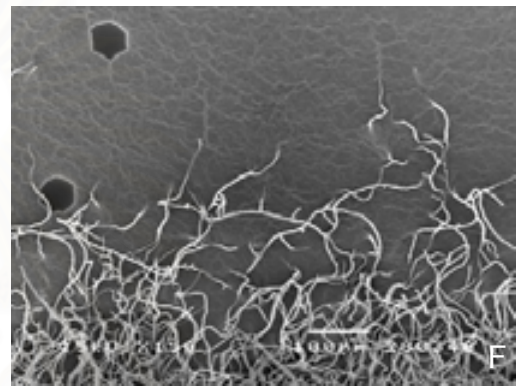
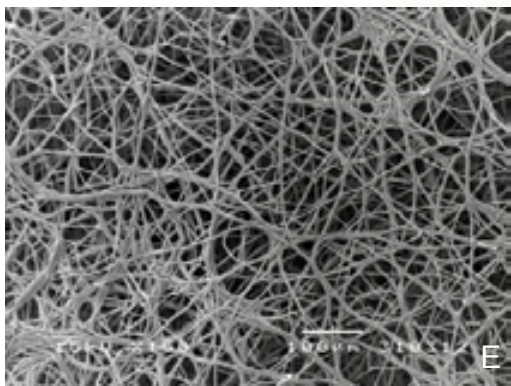
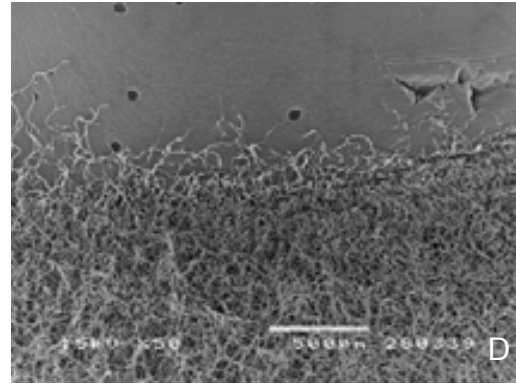
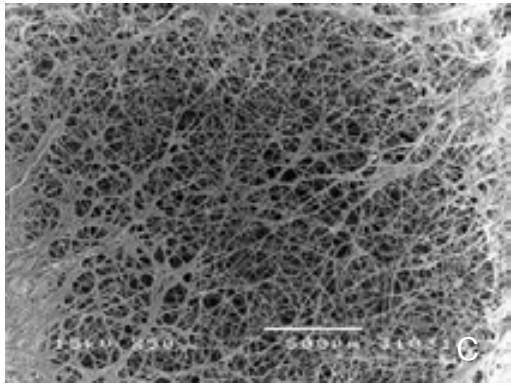




**รูปที่ 4.15** แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* DOAC 0893 (จากการสร้าง โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10) A) ในจานเลี้ยงเชื้อ C) กำลังขยาย 50x E) กำลังขยาย 150x G) กำลังขยาย 500x และ I) กำลังขยาย 5000x ในชุดควบคุม B) ในจานเลี้ยงเชื้อ D) กำลังขยาย 50x F) กำลังขยาย 150x H) กำลังขยาย 500x และ J) กำลังขยาย 5000x ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีต

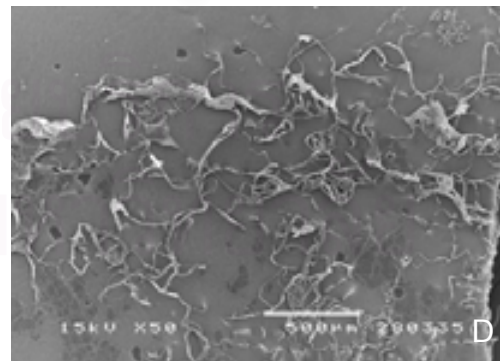
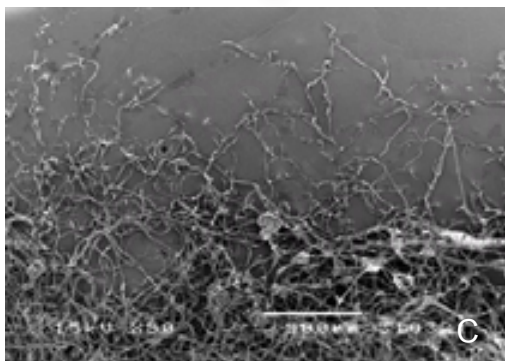
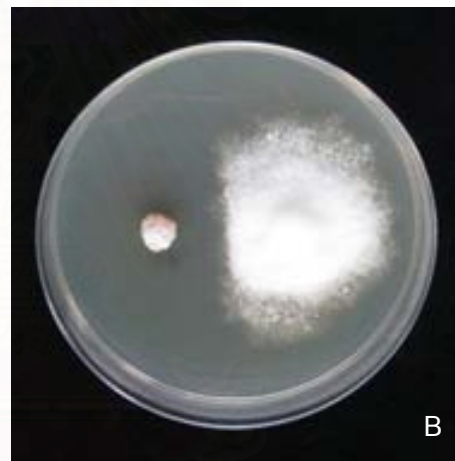
จากรูปที่ 4.15 จะเห็นได้ว่า ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีตเส้นใยของรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* มีโครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์ มีขนาดเส้นใยเล็กลง มีการหดตัว หดสั้น มีรอยขรุขระ ขณะที่ชุดควบคุมเส้นใยมีโครงสร้างที่สมบูรณ์ มีการกระจายตัว เจริญประสานกันยืดยาวแผ่ออกไปได้



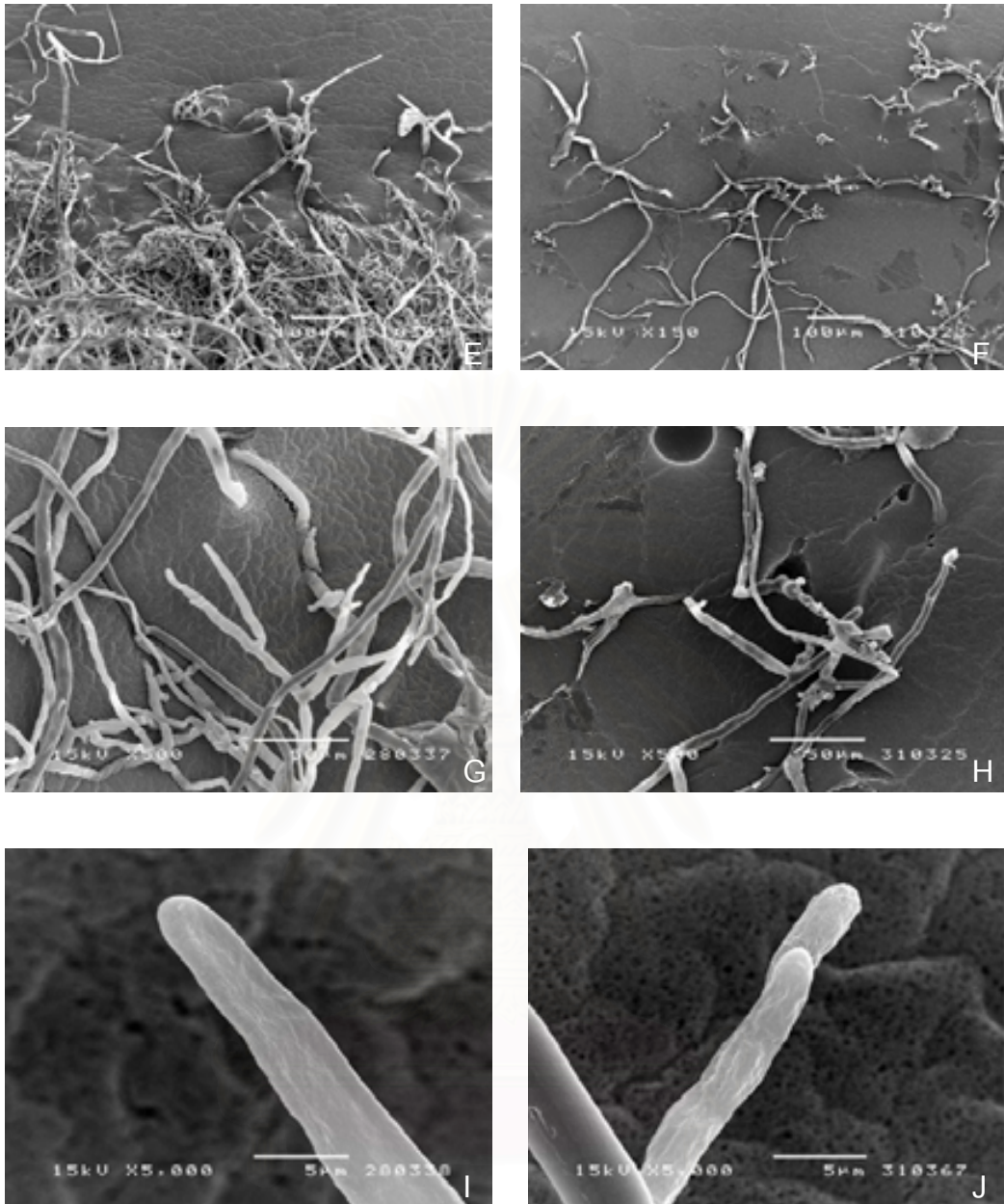


**รูปที่ 4.16** แสดงการยับยั้ง แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ *Pythium aphanidermatum* DOAC 1662 (จากการสร้าง โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10) A) ในจานเลี้ยงเชื้อ C) กำลังขยาย 50x E) กำลังขยาย 150x G) กำลังขยาย 500x และ I) กำลังขยาย 5000x ในชุดควบคุม B) ในจานเลี้ยงเชื้อ D) กำลังขยาย 50x F) กำลังขยาย 150x H) กำลังขยาย 500x และ J) กำลังขยาย 5000x ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีต

จากรูปที่ 4.16 จะเห็นได้ว่า ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีตเส้นใยของรา *Pythium aphanidermatum* มีโครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์ มีการเจริญกระจายตัวอย่างหลวมๆ มีขนาดเส้นใยเล็กกลง มีการหดตัว หดสั้น มีรอยขรุขระ ขณะที่ชุดควบคุมเส้นใยมีโครงสร้างที่สมบูรณ์ มีการเจริญประสานกันอย่างหนาแน่น

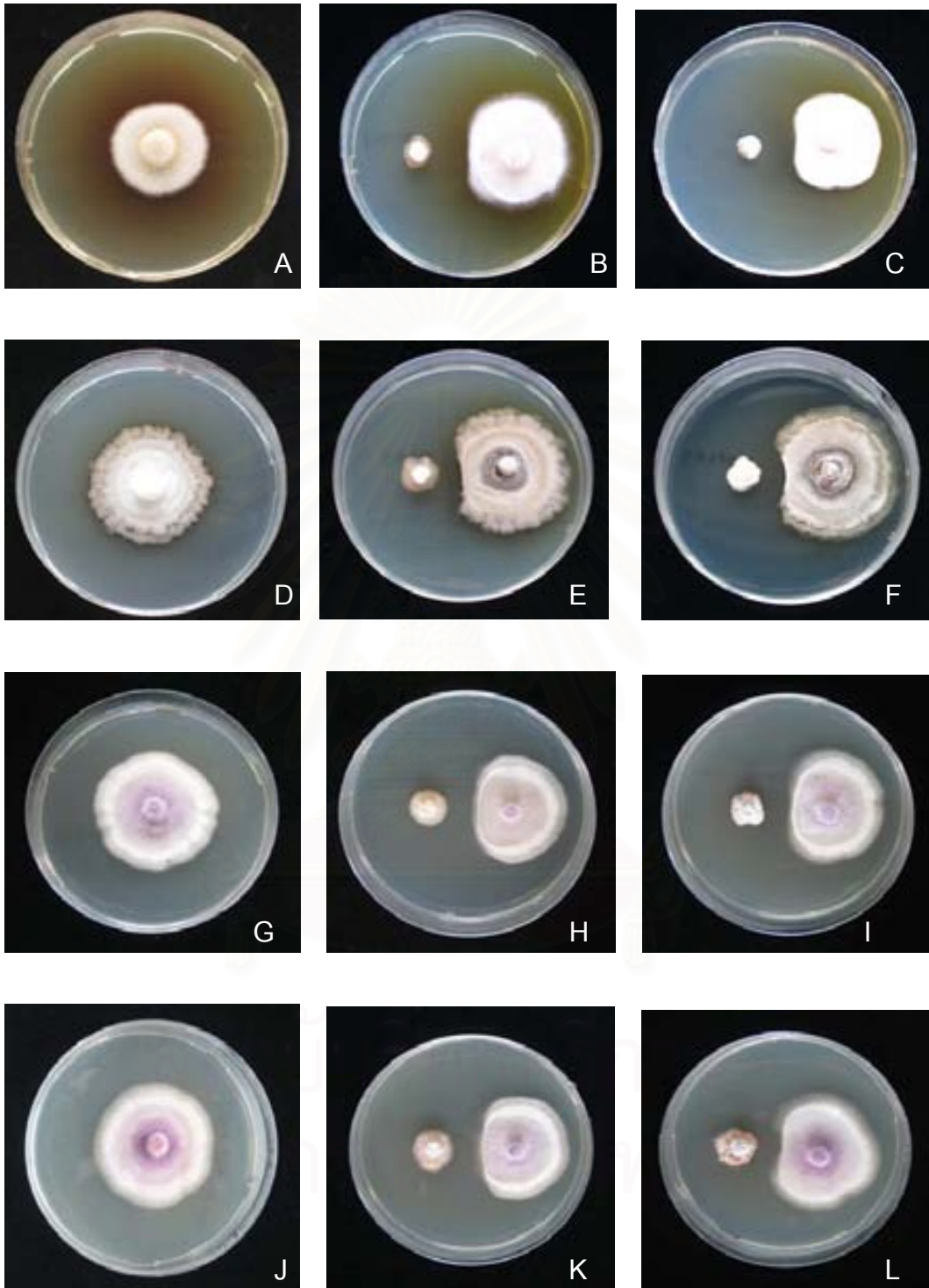




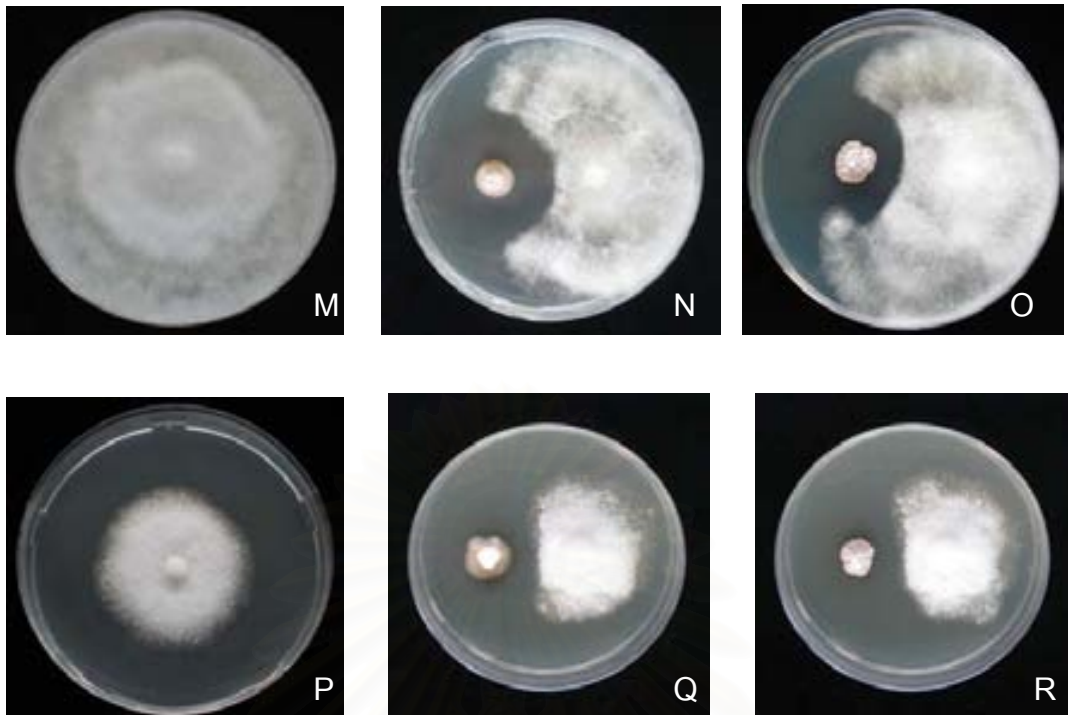


**รูปที่ 4.17** แสดงผลกระทบของสารปฏิชีวนะต่อ *Phytophthora parasitica* DOAC 0005 (จากการสร้าง โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10) A) ในจานเลี้ยงเชื้อ C) กำลังขยาย 50x E) กำลังขยาย 150x G) กำลังขยาย 500x และ I) กำลังขยาย 5000x ในชุดควบคุม B) ในจานเลี้ยงเชื้อ D) กำลังขยาย 50x F) กำลังขยาย 150x H) กำลังขยาย 500x และ J) กำลังขยาย 5000x ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีต

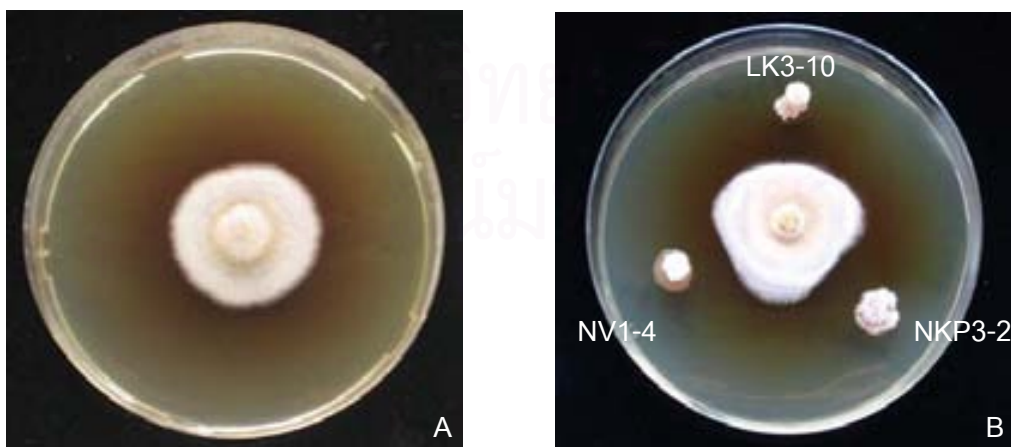
จากรูปที่ 4.17 จะเห็นได้ว่า ในชุดที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีตเส้นใยของรา *Phytophthora parasitica* มีโครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์ มีขนาดเส้นใยเล็กกลวง มีการหดตัว หักงอ หดสั้น มีรอยขรุขระ ขณะที่ชุดควบคุมเส้นใยมีโครงสร้างที่สมบูรณ์ มีการกระจายตัวเจริญประสานกัน ยืดยาวแผ่ออกไปได้



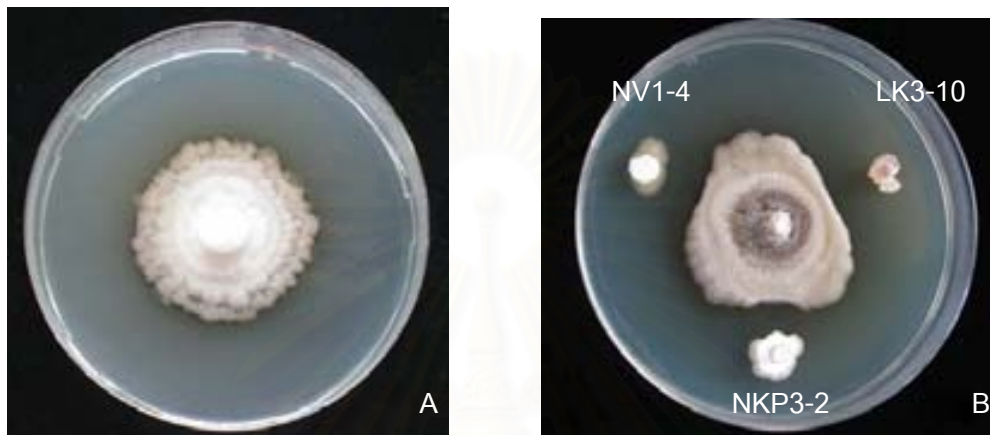




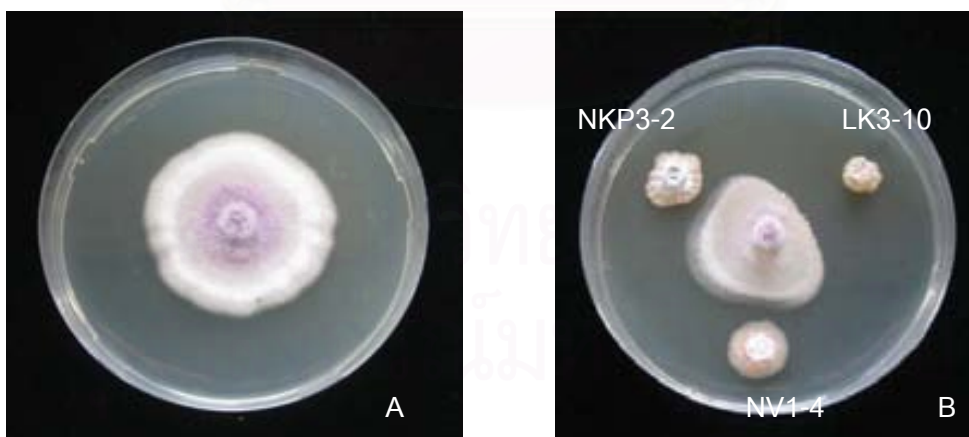
**รูปที่ 4.18** แสดงการยับยั้งราโรคพืชทั้ง 6 ชนิด ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 และ NKP3-2 ภาพ A) D) G) J) M) และ P) แสดงตัวควบคุมของรา *Pythium aphanidermatum* *Phytophthora parasitica* *Collectotrichum capsici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* และ *Alternaria porri* ตามลำดับ ภาพ B) E) H) K) N) และ Q) แสดงการถูกยับยั้งด้วยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 ภาพ C) F) I) L) O) และ R) แสดงการถูกยับยั้งด้วยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ตามลำดับ



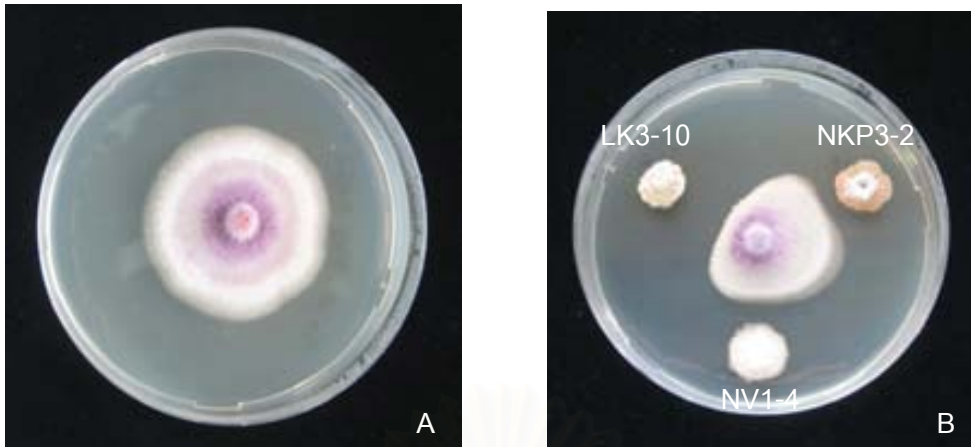
**รูปที่ 4.19** แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช *Alternaria porri* โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 A) เมื่อเลี้ยง *Alternaria porri* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียว B) เมื่อเลี้ยง *Alternaria porri* ร่วมกับแอกติโนมัยซีต



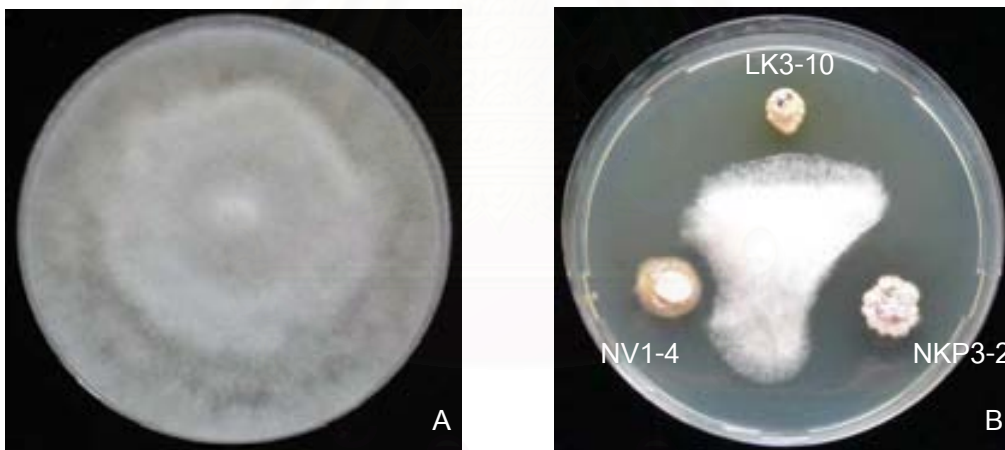
**รูปที่ 4.20** แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช *Collectotrichum capsici* โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 A) เมื่อเลี้ยง *Collectotrichum capsici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียว B) เมื่อเลี้ยง *Collectotrichum capsici* ร่วมกับแอกติโนมัยซีต



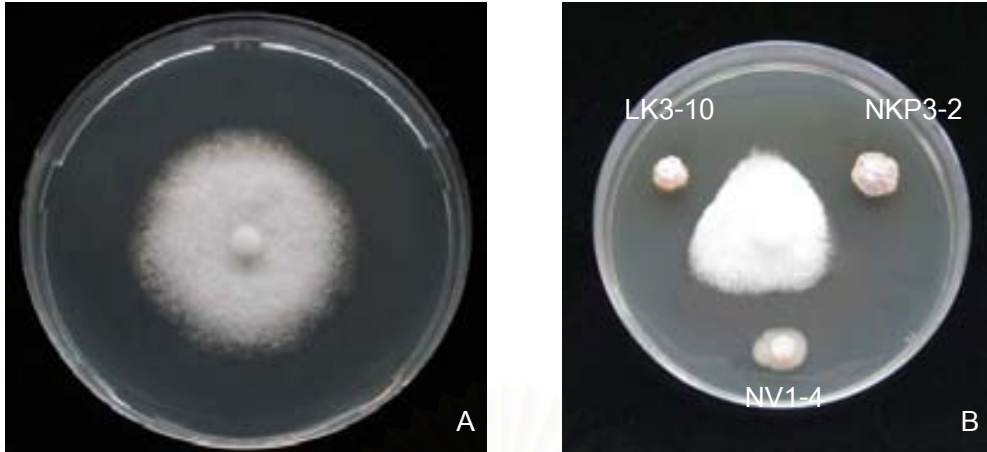
**รูปที่ 4.21** แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 A) เมื่อเลี้ยง *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียว B) เมื่อเลี้ยง *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ร่วมกับแอกติโนมัยซีต



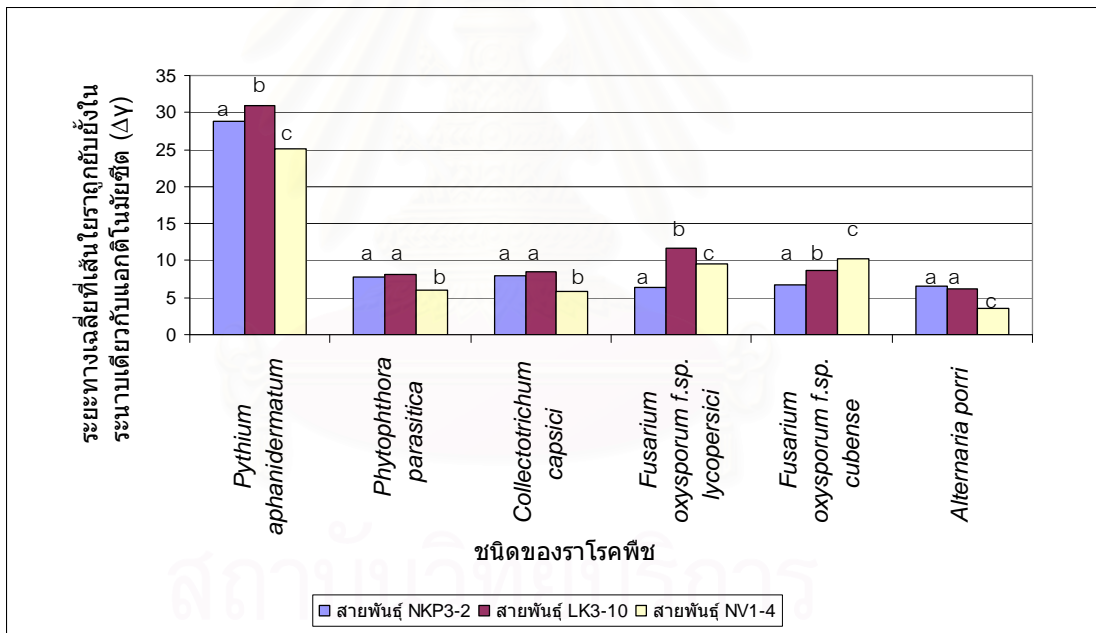
รูปที่ 4.22 แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 A) เมื่อเลี้ยง *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียว B) เมื่อเลี้ยง *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ร่วมกับแอกติโนมัยซีต



รูปที่ 4.23 แสดงภาพการถูกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช *Pythium aphanidermatum* โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 A) เมื่อเลี้ยง *Pythium aphanidermatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียว B) เมื่อเลี้ยง *Pythium aphanidermatum* ร่วมกับแอกติโนมัยซีต



รูปที่ 4.24 แสดงภาพการถุกยับยั้งการเจริญของราโรคพืช *Phytophthora parasitica* โดยแอกติโนไมซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 A) เมื่อเลี้ยง *Phytophthora parasitica* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียว B) เมื่อเลี้ยง *Phytophthora parasitica* ร่วมกับแอกติโนไมซีต



รูปที่ 4.25 แผนภูมิแท่งแสดงระยะทางเฉลี่ย( $\Delta Y$ )ที่เส้นใยราถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนไมซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4

หมายเหตุ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าระยะทางเฉลี่ย( $\Delta Y$ )ที่เส้นใยราถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนไมซีต ตัวอักษรบนแท่งกราฟที่ต่างกัน แสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากรูปที่ 4.25 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชทั้ง 6 ชนิด พบว่าแอกติโนไมซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 สามารถยับยั้งราโรคพืช *Pythium aphanidermatum* ได้ดีที่สุด



เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติในการยับยั้งราโรคพืชแต่ละชนิดของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 พบว่า ระยะเวลาเฉลี่ย( $\Delta Y$ )ที่ราทดสอบ *Pythium aphanidermatum* ถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีตทั้ง 3 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระยะเวลาเฉลี่ย( $\Delta Y$ ) ที่ราทดสอบ *Phytophthora parasitica* ถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 และ LK3-10 มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ NV1-4 อย่างมีนัยสำคัญ ระยะเวลาเฉลี่ย( $\Delta Y$ ) ที่ราทดสอบ *Collectotrichum capsici* ถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 และ LK3-10 มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ NV1-4 อย่างมีนัยสำคัญ ระยะเวลาเฉลี่ย( $\Delta Y$ )ที่ราทดสอบ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีตทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระยะเวลาเฉลี่ย( $\Delta Y$ )ที่ราทดสอบ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีตทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระยะเวลาเฉลี่ย( $\Delta Y$ )ที่ราทดสอบ *Alternaria porri* ถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 และ LK3-10 มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ NV1-4 อย่างมีนัยสำคัญ

#### 4.9 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างเซลล์เลส

จากการทดสอบการความสามารถในการสร้างเซลล์เลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC พบว่า แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเป็นเวลา 7 วันสูงสุดเท่ากับ 4.30 เซนติเมตร จึงมีแนวโน้มที่จะสร้างเซลล์เลสได้ดี เพื่อนำมาศึกษาเซลล์เลสแอกติโนมัยซีตในอาหารเหลวได้ต่อไป

#### 4.10 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคพืช

เพื่อการนำแอกติโนมัยซีตไปประยุกต์ใช้ในการเกษตรให้ได้ประโยชน์สูงสุด การคัดเลือกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราโรคพืชได้หลากหลายชนิด (Broad spectrum) จึงมีความสำคัญ จากการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะเบื้องต้นโดยวิธี Dual-culture พบว่า สายพันธุ์ LK3-10 มีความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิด ทั้งยังมีความสามารถในการยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum* และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในระดับสูงที่สุด และสายพันธุ์ NV1-4 มีความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิดได้ดี รองลงมา และจากการจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างเซลล์เลสพบว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราโรคพืชได้ในระดับสูง



#### 4.11 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

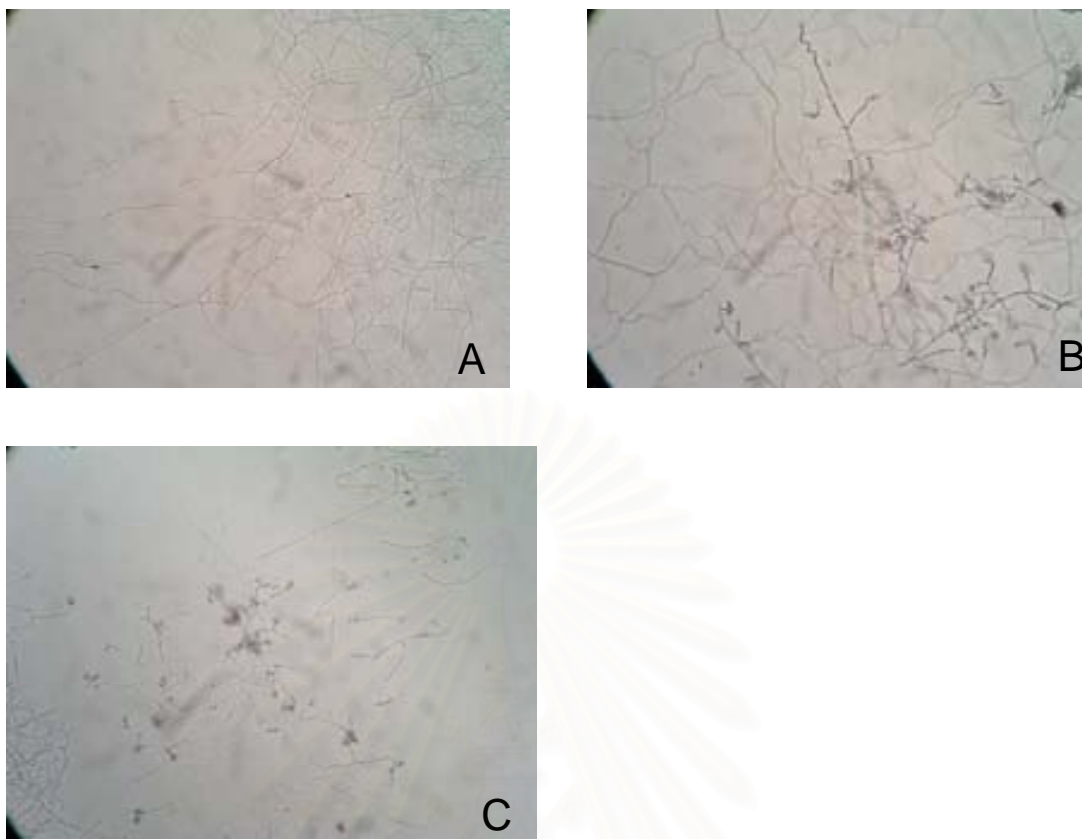
จากการจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างเซลล์และสารปฏิชีวนะ สามารถคัดเลือก แอกติโนมัยซีตได้ 3 สายพันธุ์ โดยพบว่าสายพันธุ์ NKP3-2 มีความสามารถในการสร้างเซลล์ ได้สูงที่สุด และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิดในระดับสูง สายพันธุ์ LK3-10 มีความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิด (Broad spectrum) ทั้งยังมีความสามารถในการยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum* และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในระดับสูงที่สุด ทั้งยังมีความสามารถในการสร้างเซลล์ได้ในระดับปานกลาง และสายพันธุ์ NV1-4 มีความสามารถในการยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิด ได้ดีรองลงมา ทั้งสามารถสร้างเซลล์ได้ในระดับสูงอีกด้วย ดังนั้นจึงน่าจะเป็นประโยชน์ที่จะใช้แอกติโนมัยซีต ทั้งสามสายพันธุ์มาประยุกต์มาใช้ร่วมกันในการทำปุ๋ยหมัก เพราะจะช่วยย่อยสลายซากพืชและยังช่วยทำลายราโรคพืชด้วย

#### 4.12 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10

ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตโดย Williams และคณะ Bergey's Manual of systematic Bacteriology Volume 9 (Williams และคณะ, 1994)

4.12.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope, กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

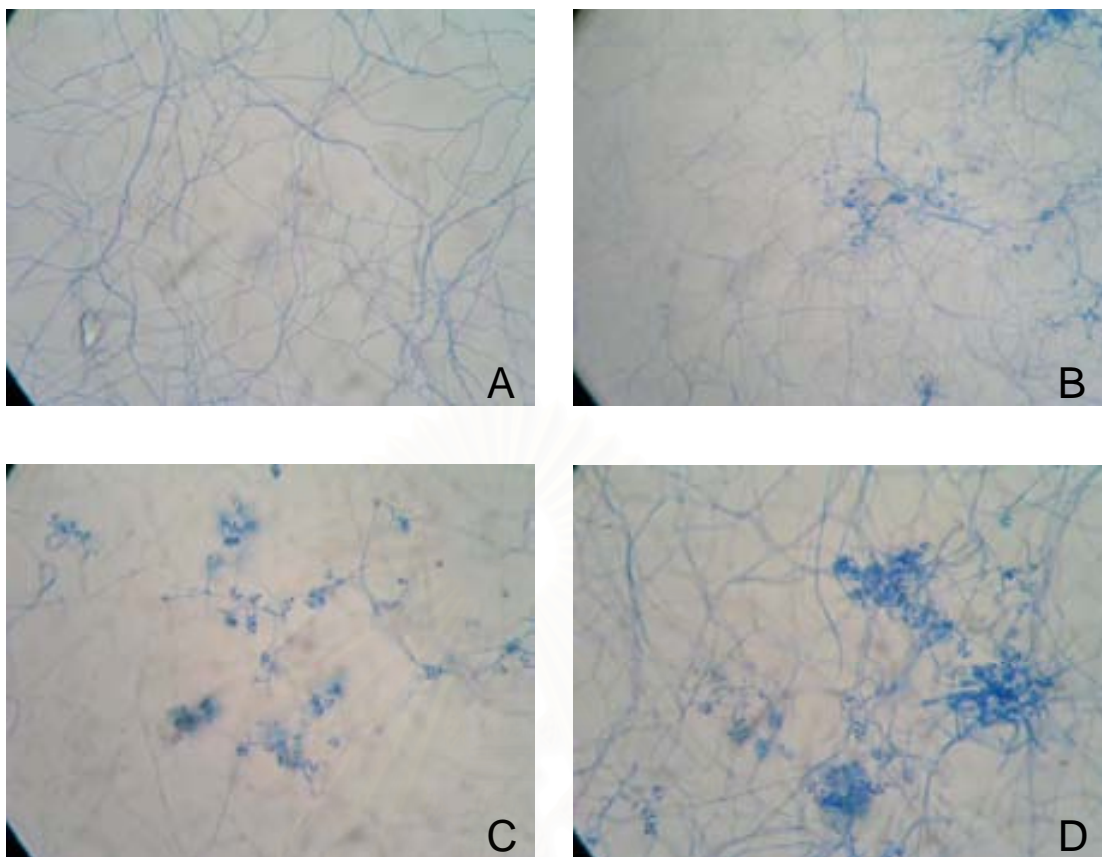
ใช้เทคนิคการทำ slide culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 agar และ mannitol mungbean agar ในการจำแนกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่าง (light microscope) พบว่าสายพันธุ์ NKP3-2 มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ลักษณะค่อนข้างเป็นเส้นตรงปลายโค้งงอเป็นเกลียว บนเส้นใยอาหาร สร้างสปอร์สายสั้น ๆ เส้นใยอากาศสร้างสปอร์สายยาว สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สายสปอร์เจริญเต็มที่ในวันที่ 3 ดังรูปที่ 4.25 สายพันธุ์ LK3-10 มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศที่มีลักษณะค่อนข้างเป็นเส้นตรงปลายโค้งงอเป็นเกลียวพันกันหลายรอบ สร้างสปอร์สายสั้น ๆ บนเส้นใยอาหาร สร้างสปอร์สายยาวบนเส้นใยอากาศ สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สายสปอร์เจริญเต็มที่ในวันที่ 7 ดังรูปที่ 4.26 สายพันธุ์ NV1-4 มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศลักษณะค่อนข้างเป็นเส้นตรงปลายโค้งงอเป็นเกลียว สร้างสปอร์สายสั้น ๆ บนเส้นใยอาหาร สร้างสปอร์สายยาวบนเส้นใยอากาศ สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สายสปอร์เจริญเต็มที่ในวันที่ 4 ดังรูปที่ 4.27



**รูปที่ 4.26** แสดงการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอสเพอริลนินดูลินัสสายพันธุ์ NKP3-2 บนอาหารแข็ง ISP2 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400x (AและC) และ 1,000x (B)

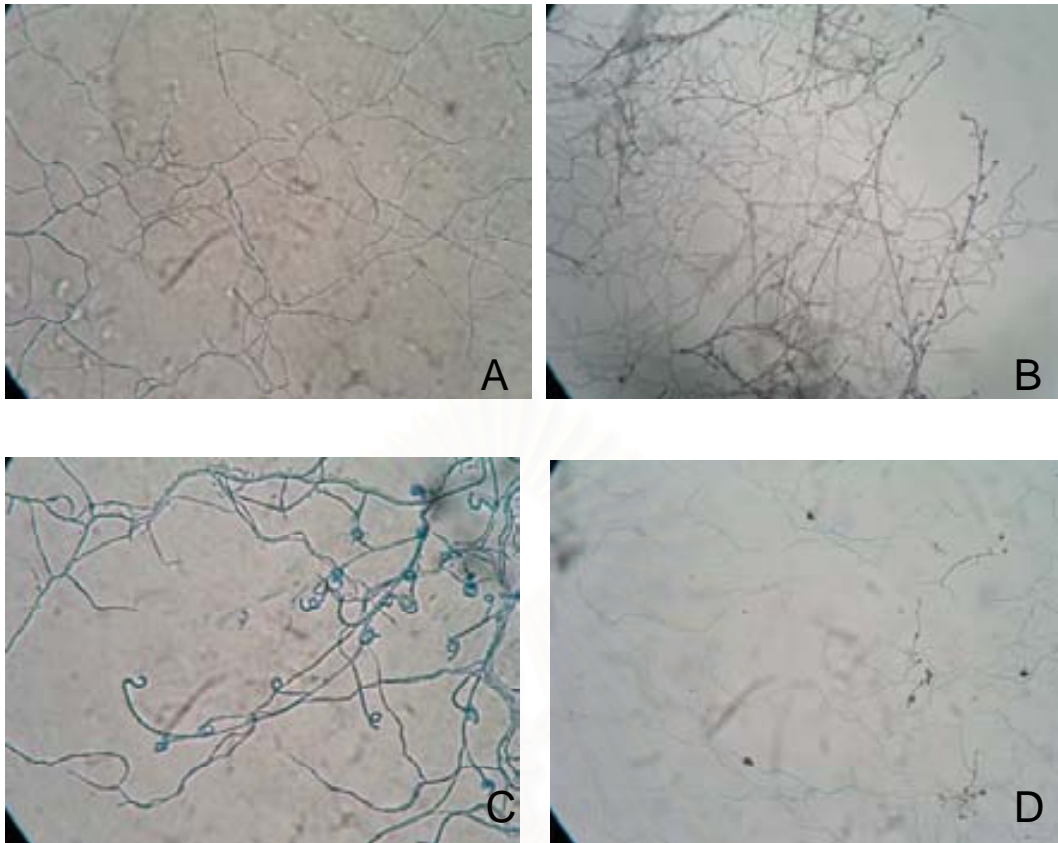
- A) สายใยอาหารอายุ 3 วัน มีลักษณะเป็นเส้นยาวแตกแขนง
- B) สายใยอากาศอายุ 3 วัน ปลายของเส้นใยพัฒนาแตกแขนงไปซุ่มมีการสร้างผนังกั้นภายในเส้นใย มีการเริ่มสร้างสปอร์ สายสปอร์มีวนเป็นเกลียว
- C) สายใยอากาศอายุ 5 วัน เส้นใยที่แตกแขนงเริ่มมีการหลุดออกเป็นท่อน สายสปอร์เริ่มหลุดออกจากซอกสปอร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 4.27** แสดงการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอสเพอริลนัมยีสต์สายพันธุ์ LK3-10 บนอาหารแข็ง ISP2 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400x (B) และ 1,000x (A,C และ D)

- A) สายใยอาหารอายุ 5 วัน มีลักษณะเป็นเส้นยาวแตกแขนง
- B) สายใยอาหารและสายใยอากาศอายุ 5 วัน ปลายของเส้นใยอาหารพัฒนาแตกแขนง มีการสร้างผนังกันไป มีการเริ่มสร้างซอสปอร์ สายสปอร์มีวงเป็นเกลียว
- C) สายใยอากาศอายุ 7 วัน สายสปอร์เจริญเต็มที่ มีวงเป็นเกลียวหลายรอบชัดเจน
- D) สายใยอาหารและสายใยอากาศอายุ 7 วัน สายสปอร์มีวงเป็นเกลียวหลายรอบชัดเจน อยู่เป็นกลุ่ม เส้นใยอาหารแตกแขนงมีขนาดหนาขึ้น



**รูปที่ 4.28** แสดงการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอสเพอริลในมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 บนอาหารแข็ง ISP2 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400x (D) และ 1,000x (A,B และ C)

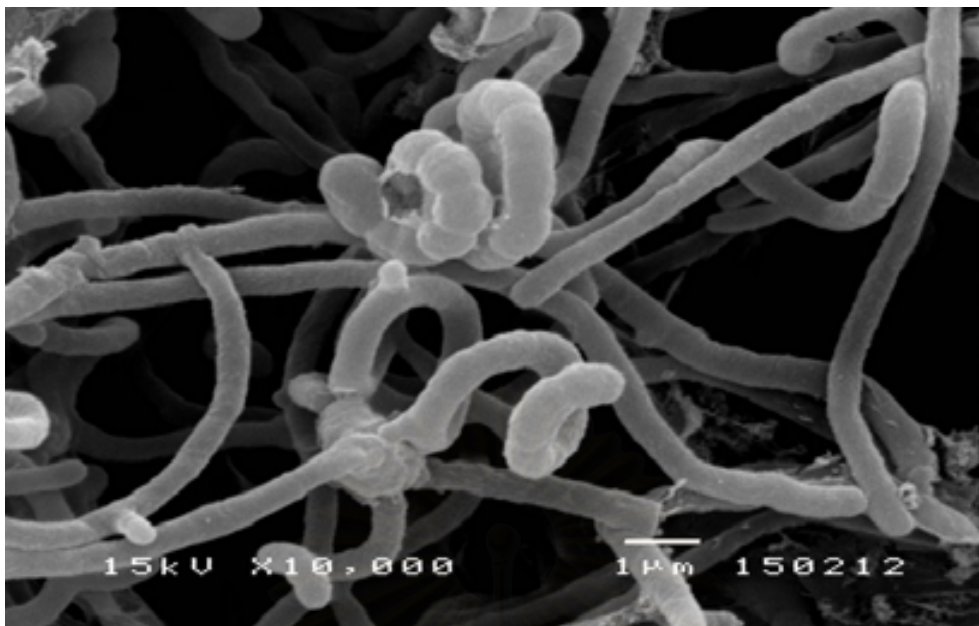
A) สายใยอาหารอายุ 3 วัน มีลักษณะเป็นเส้นยาวแตกแขนง

B) สายใยอากาศอายุ 3 วัน ปลายของเส้นใยอาหารพัฒนาแตกแขนง มีการสร้างผนังกันไป มีการเริ่มสร้างซอสปอร์ สายสปอร์ยาวม้วนเป็นเกลียว

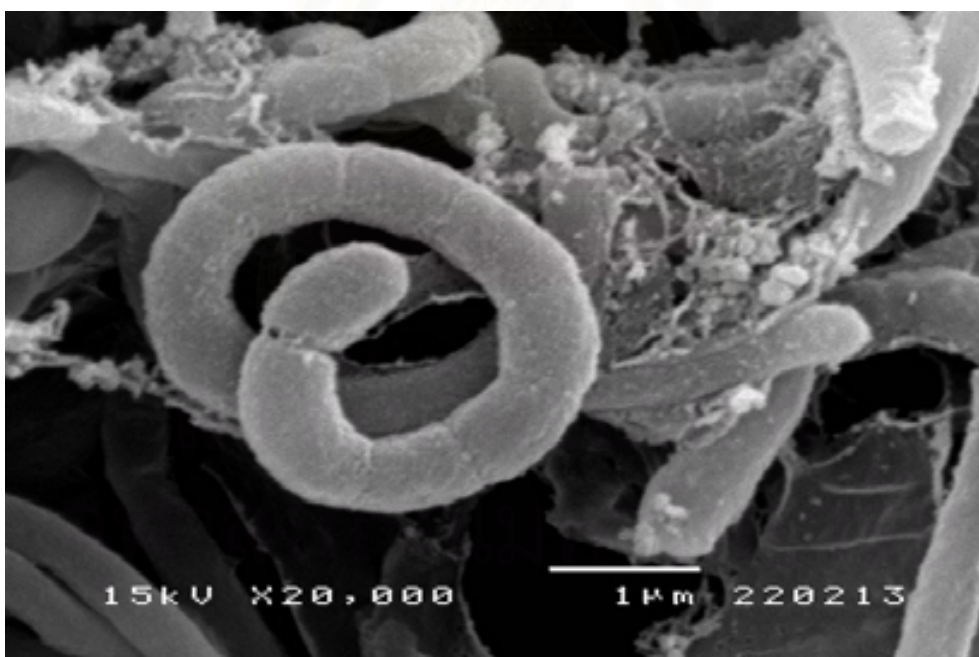
C) สายใยอากาศอายุ 4 วัน สายสปอร์เจริญเต็มที่ม้วนเป็นเกลียวชัดเจน

D) สายใยอาหารและสายใยอากาศอายุ 7 วัน สายใยอาหารที่แตกแขนงเริ่มขดงอ และสปอร์สายยาวเริ่มขาดเป็นท่อนๆ



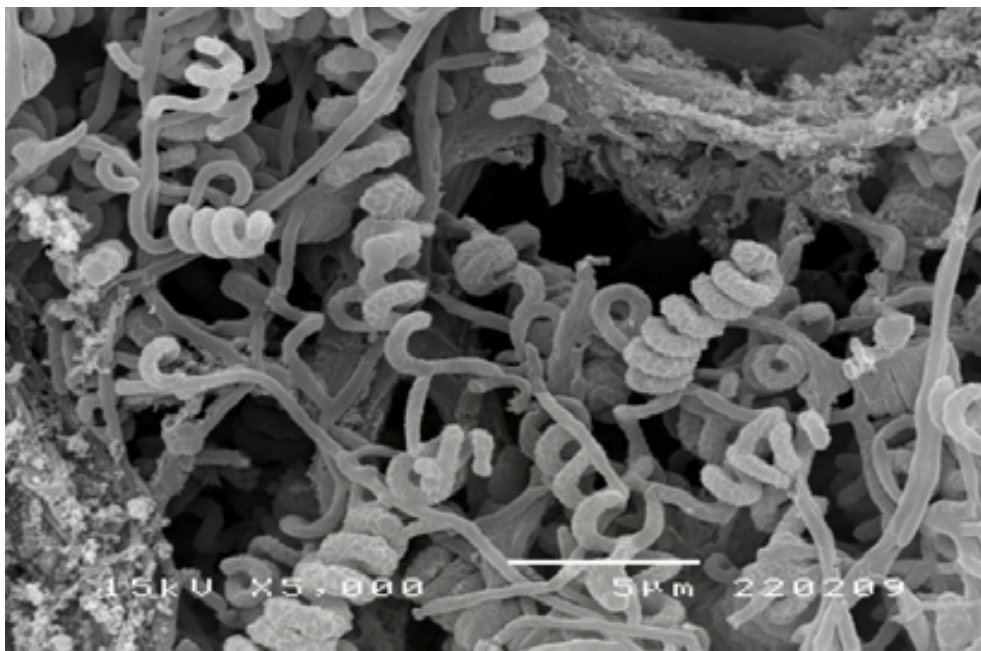


รูปที่ 4.29 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 3 วัน กำลังขยาย 10,000x

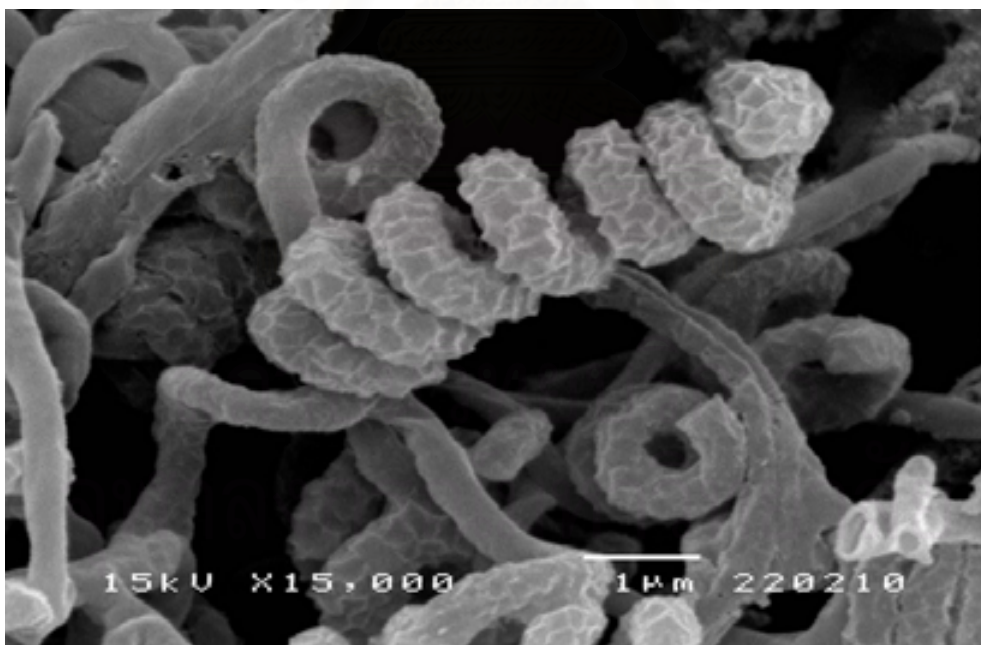


รูปที่ 4.30 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 3 วัน กำลังขยาย 20,000x

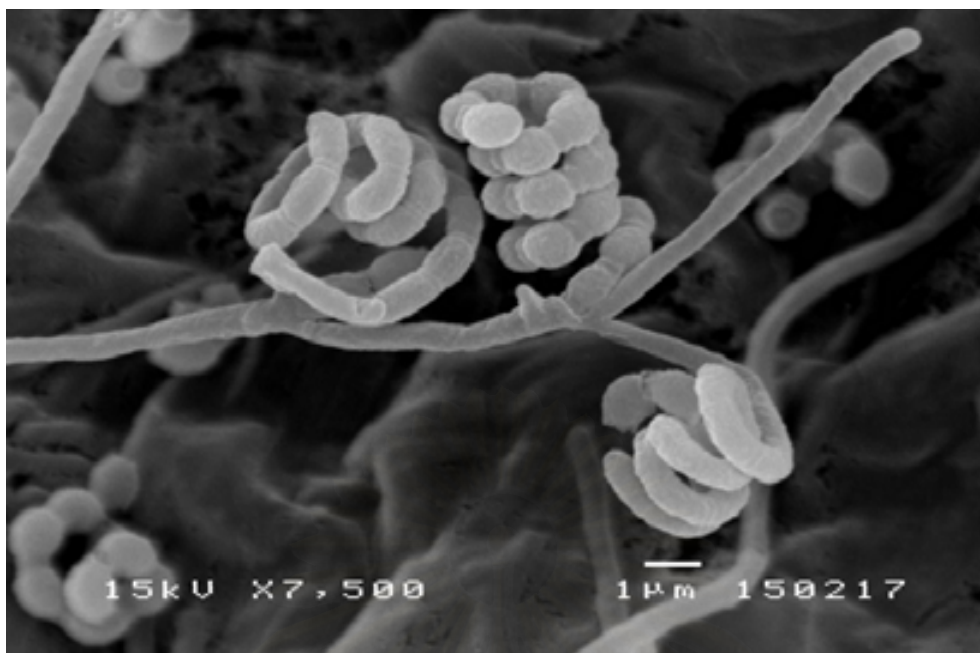




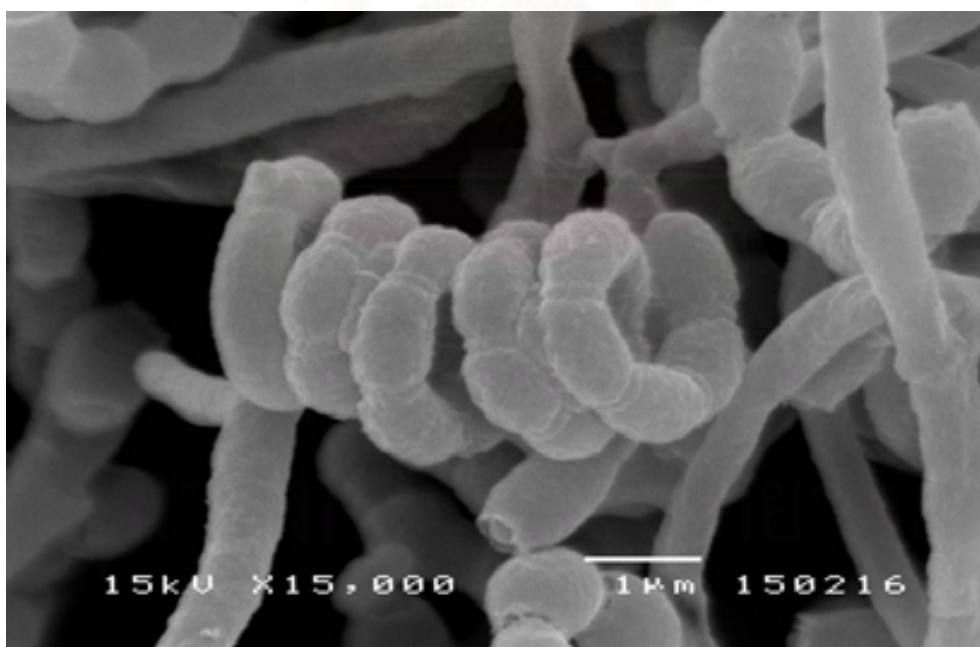
รูปที่ 4.31 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol mungbean ระยะเวลา 7 วัน กำลังขยาย 5,000x



รูปที่ 4.32 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol mungbean ระยะเวลา 7 วัน กำลังขยาย 15,000x



รูปที่ 4.33 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 4 วัน กำลังขยาย 7,500x



รูปที่ 4.34 ภาพ Scanning Electron Micrograph ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ระยะเวลา 4 วัน กำลังขยาย 15,000x

4.12.2 ศึกษาการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project (ISP) media

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, NV1-4 และ LK3-10 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 6 ชนิด คือ

ISP1	TYEA	Tryptone-yeast extract agar
ISP2	YMEA	Yeast-malt extract agar
ISP3	OA	Oat meal agar
ISP4	ISSA	Inorganic salts starch agar
ISP5	GAA	Glycerol asparagines agar
ISP6	PYEA	Peptone-yeast extract iron agar

ศึกษาการเจริญ และเมื่อเจริญเต็มที่ บันทึกลักษณะของสายใยอากาศ สายใยอาหาร รงควัสดุที่ละลายน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38 และ 4.39 แสดงลักษณะของโคโลนี สีของสายใยอากาศ สีของสปอร์ และสีของสายใยอาหาร

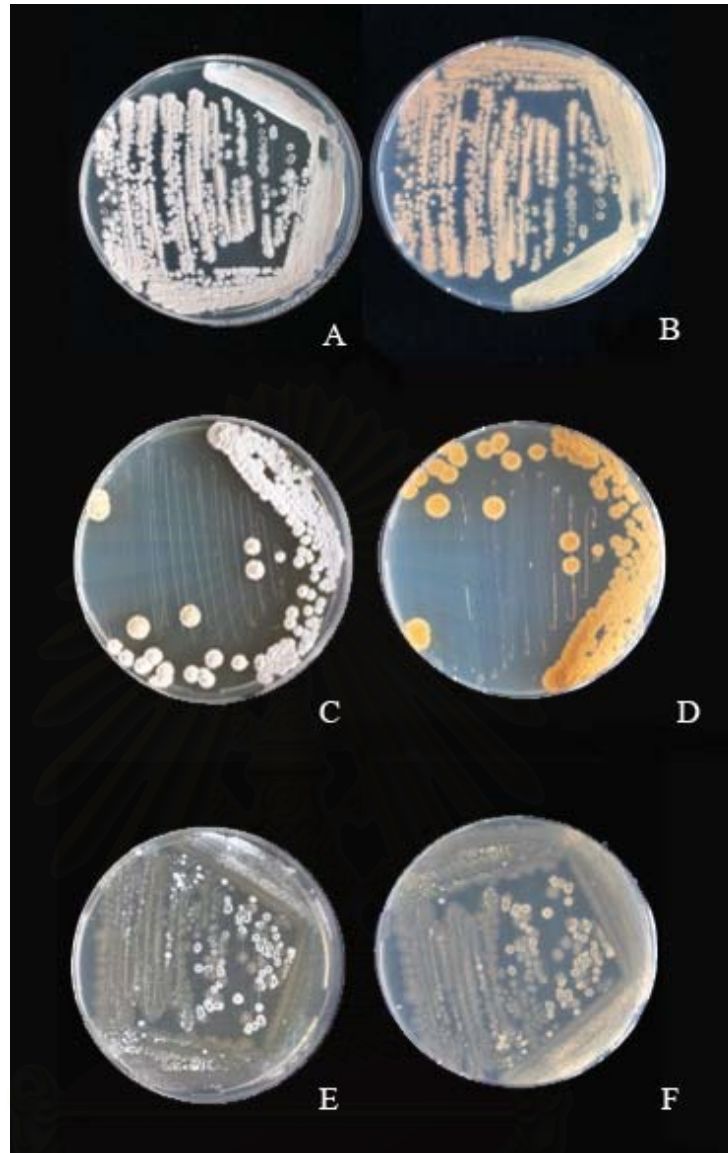
ตารางที่ 4.7 แสดงการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP

ชนิดของอาหาร	สายพันธุ์	ลักษณะ				
		การเจริญ	เส้นใยอาหาร	เส้นใยอากาศ	สปอร์	รงควัตถุที่ละลายน้ำ
ISP1-TYEA (Tryptone-yeast extract agar)	NKP3-2	ดี	ดี สีเหลืองขุ่น	ดี สีขาว	ดี สีขาว	ไม่สร้าง
	LK3-10	ดี	ดี สีเหลืองเข้ม	ดี สีขาว	ดี สีขาว	สร้าง
	NV1-4	ปานกลาง	ปานกลาง สีเหลือง	ปานกลาง สีขาว	ปานกลาง สีขาว	ไม่สร้าง
ISP2-YMEA (Yeast-malt extract agar)	NKP3-2	ดีมาก	ดีมาก สีเหลืองเข้ม	ดีมาก สีน้ำตาลเทา	ดีมาก สีน้ำตาลเทา	ไม่สร้าง
	LK3-10	ดี	ดี สีเหลือง	ดี สีเทาขาว	ดี สีเทาขาว	สร้าง
	NV1-4	ดี	ดี สีเหลือง	ดี สีขาว	ดี สีขาว	สร้าง
ISP3-OA (Oat meal agar)	NKP3-2	ดีมาก	ดีมาก สีขาวเหลือง	ดีมาก สีขาว	ดีมาก สีน้ำตาล	ไม่สร้าง
	LK3-10	ปานกลาง	ปานกลาง สีเหลือง	ปานกลาง สีขาว	ปานกลาง สีขาว	สร้าง
	NV1-4	ดี	ดี สีเหลือง	ดี สีขาว	ดี สีน้ำตาลเทา	สร้าง

ตารางที่ 4.7(ต่อ) แสดงการเจริญของแบคทีเรียชนิดสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP

ชนิดของอาหาร	สายพันธุ์	ลักษณะ				
		การเจริญ	เส้นใยอาหาร	เส้นใยอากาศ	สปอร์	รงควัตถุที่ละลายน้ำ
ISP4-ISSA (Inorganic salts starch agar)	NKP3-2	ปานกลาง	ปานกลาง สีเหลือง	ปานกลาง สีขาว	ปานกลาง สีขาว	ไม่สร้าง
	LK3-10	ดี	ดี สีเหลือง	ดี สีขาว	ดี สีขาว	สร้าง
	NV1-4	ดี	ดี สีเหลืองเข้ม	ดี สีขาว	ดี สีขาว	สร้าง
ISP5-GAA (Glycerol asparagines agar)	NKP3-2	น้อย	น้อย สีเหลือง	น้อย สีขาว	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
	LK3-10	น้อย	น้อย สีเหลือง	น้อย สีขาว	ไม่สร้าง	สร้าง
	NV1-4	ดี	ดี สีเหลืองเข้ม	ดี สีขาว	ดี สีขาว	สร้าง
ISP6-PYEA (Peptone-yeast extract iron agar)	NKP3-2	ปานกลาง	ปานกลาง สีเหลือง	น้อย สีขาว	น้อย สีขาว	ไม่สร้าง
	LK3-10	ปานกลาง	ปานกลาง สีเหลืองเข้ม	น้อย สีขาว	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
	NV1-4	ปานกลาง	ปานกลาง สีเหลือง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง



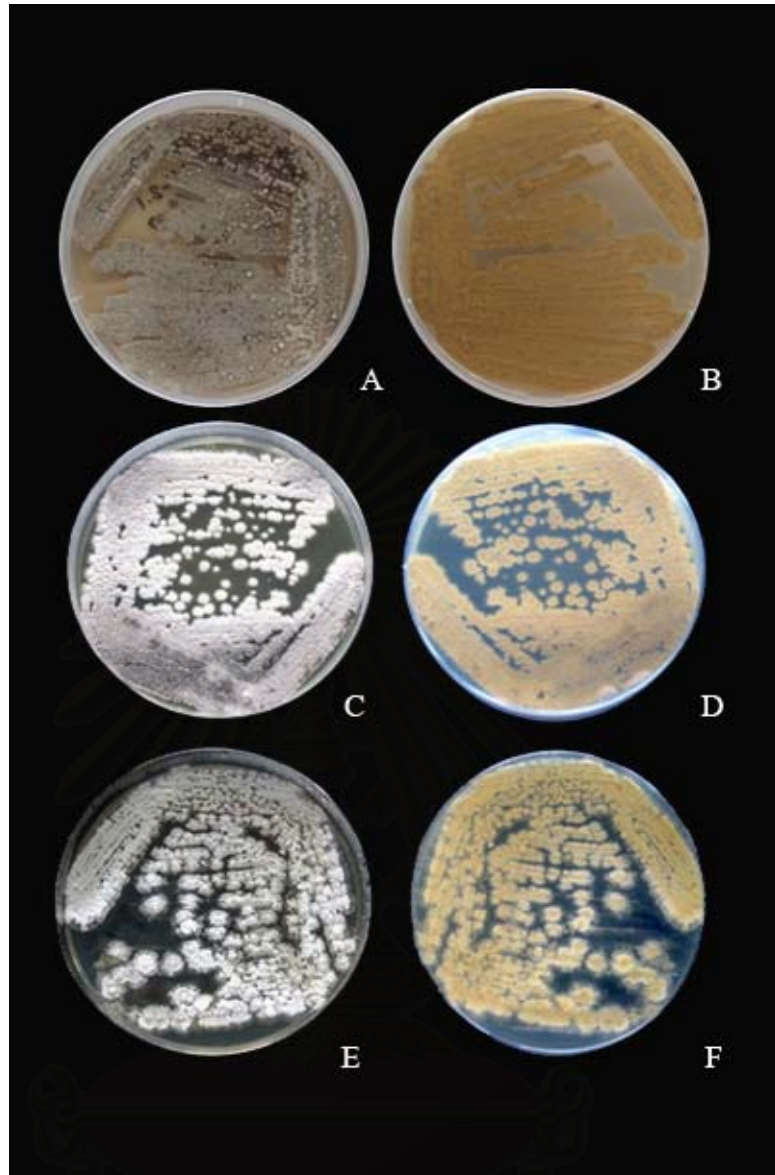


รูปที่ 4.35 ลักษณะโคโลนีและสีของแอกติโนมัยซีตชนิดต่างๆบนอาหาร ISP1

A) ด้านบนของสายพันธุ์ NKP3-2    B) ด้านล่างของสายพันธุ์ NKP3-2

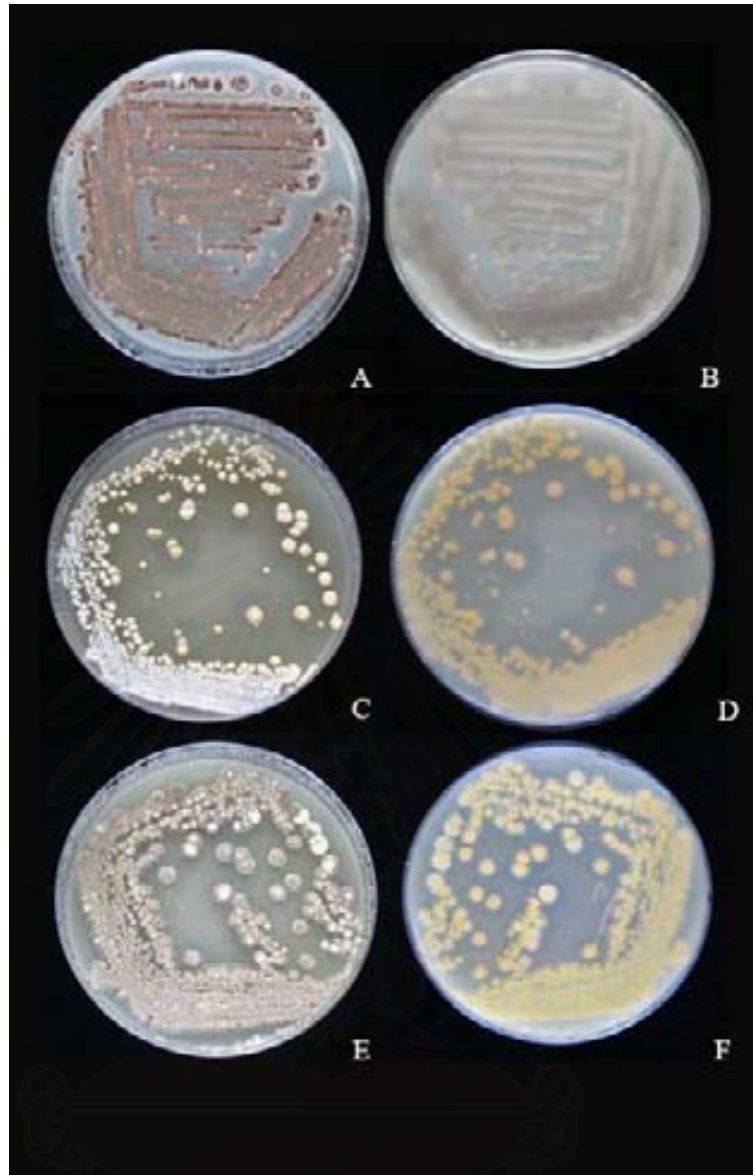
C) ด้านบนของสายพันธุ์ LK3-10    D) ด้านล่างของสายพันธุ์ LK3-10

E) ด้านบนของสายพันธุ์ NV1-4    F) ด้านล่างของสายพันธุ์ NV1-4



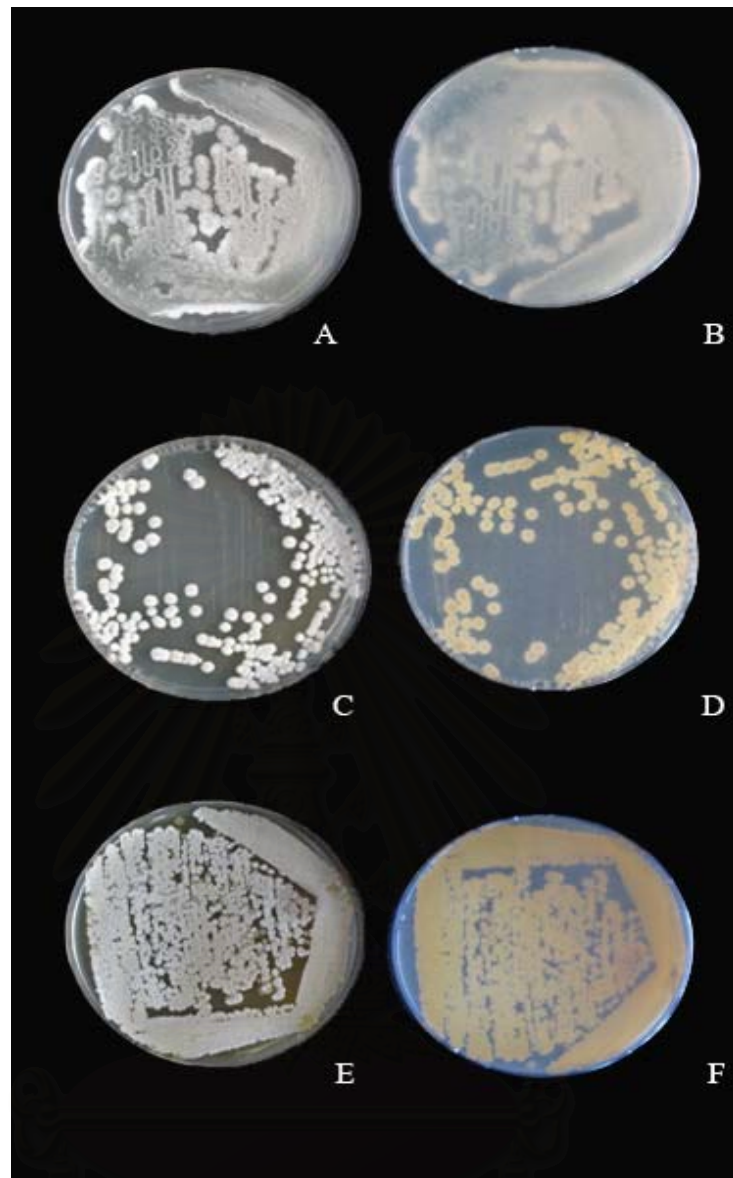
รูปที่ 4.36 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตบนอาหาร ISP2

- A) ด้านบนของสายพันธุ์ NKP3-2    B) ด้านล่างของสายพันธุ์ NKP3-2  
 C) ด้านบนของสายพันธุ์ LK3-10    D) ด้านล่างของสายพันธุ์ LK3-10  
 E) ด้านบนของสายพันธุ์ NV1-4    F) ด้านล่างของสายพันธุ์ NV1-4



**รูปที่ 4.37** ลักษณะการเจริญของแอสเพอริลในมายซีตบนอาหาร ISP3

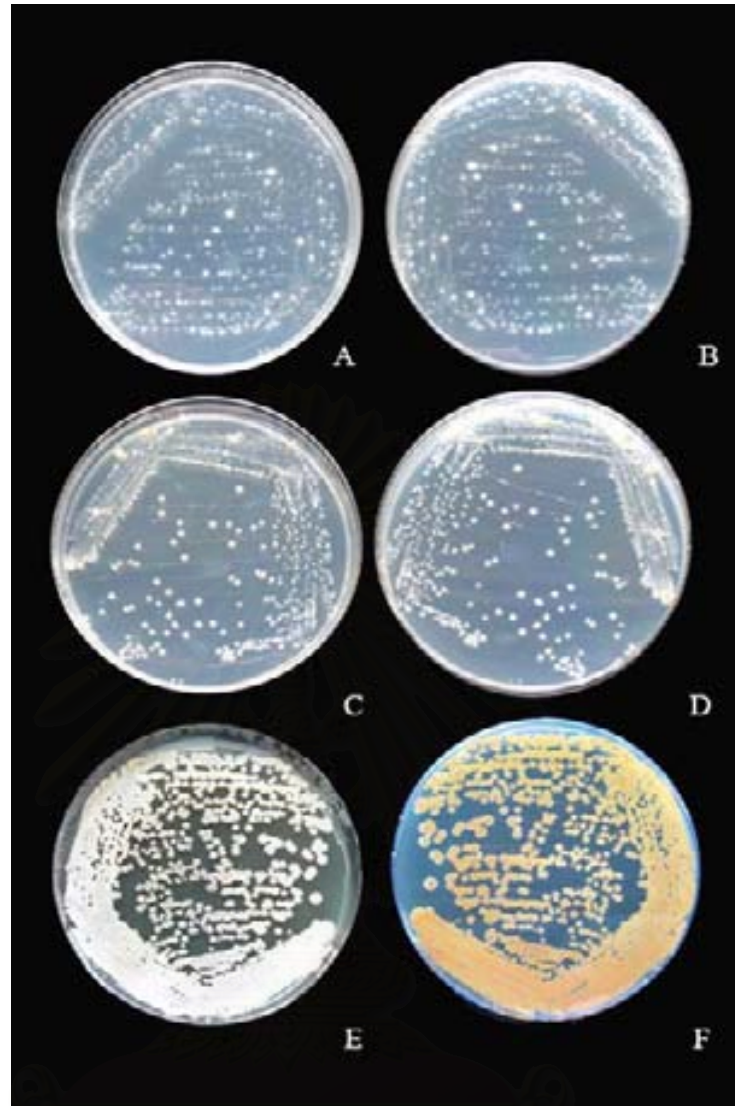
- A) ด้านบนของสายพันธุ์ NKP3-2    B) ด้านล่างของสายพันธุ์ NKP3-2  
 C) ด้านบนของสายพันธุ์ LK3-10    D) ด้านล่างของสายพันธุ์ LK3-10  
 E) ด้านบนของสายพันธุ์ NV1-4    F) ด้านล่างของสายพันธุ์ NV1-4



**รูปที่ 4.38** ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียชนิดบนอาหาร ISP4

- A) ด้านบนของสายพันธุ์ NKP3-2    B) ด้านล่างของสายพันธุ์ NKP3-2  
 C) ด้านบนของสายพันธุ์ LK3-10    D) ด้านล่างของสายพันธุ์ LK3-10  
 E) ด้านบนของสายพันธุ์ NV1-4    F) ด้านล่างของสายพันธุ์ NV1-4



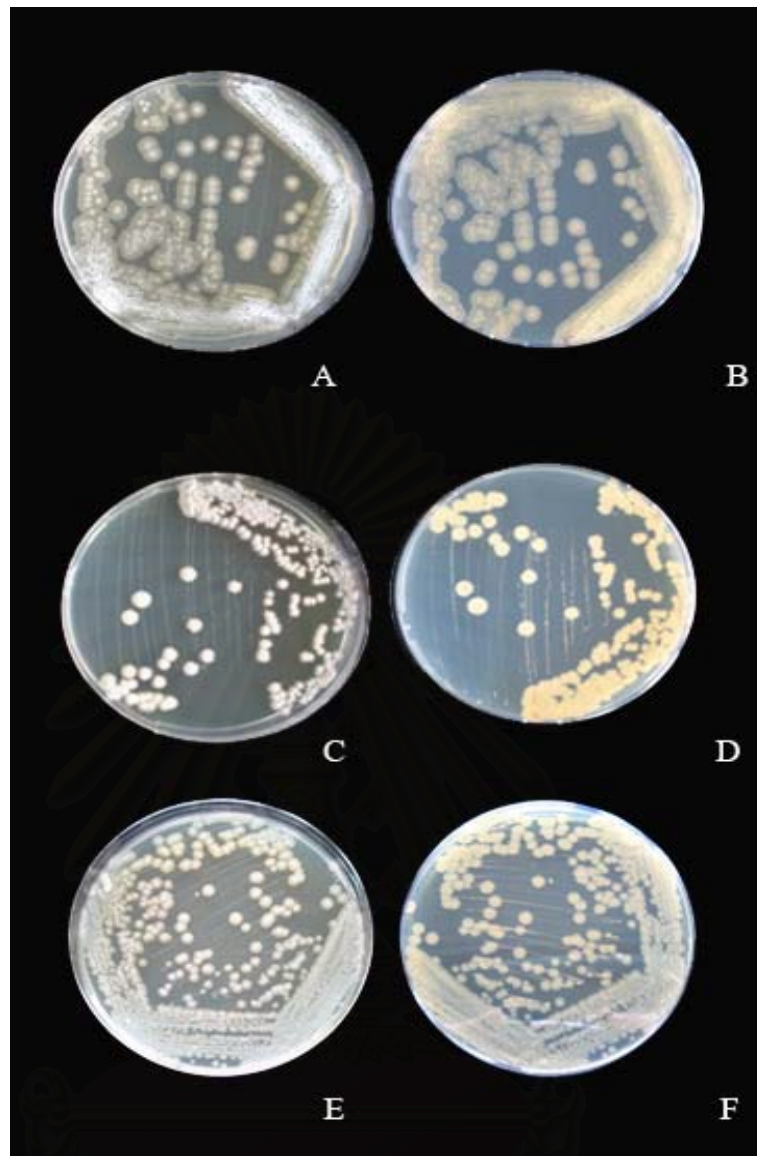


รูปที่ 4.39 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียในมายซีตบนอาหาร ISP5

- A) ด้านบนของสายพันธุ์ NKP3-2    B) ด้านล่างของสายพันธุ์ NKP3-2  
 C) ด้านบนของสายพันธุ์ LK3-10    D) ด้านล่างของสายพันธุ์ LK3-10  
 E) ด้านบนของสายพันธุ์ NV1-4    F) ด้านล่างของสายพันธุ์ NV1-4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 4.40 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตบนอาหาร ISP6

- A) ด้านบนของสายพันธุ์ NKP3-2    B) ด้านล่างของสายพันธุ์ NKP3-2  
 C) ด้านบนของสายพันธุ์ LK3-10    D) ด้านล่างของสายพันธุ์ LK3-10  
 E) ด้านบนของสายพันธุ์ NV1-4    F) ด้านล่างของสายพันธุ์ NV1-4

#### 4.11.3 การศึกษาการสร้างรงควัตถุเมลานิน

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเคี้ยว peptone yeast extract iron agar และอาหารวุ้นเคี้ยว tyrosine agar สามารถตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน จากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 เจริญบนอาหาร tyrosine agar สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขุ่น สายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเจริญบนอาหาร peptone yeast extract iron agar

#### 4.11.4 การรีดิวส์ในเตรท

จากการแทง (stab) แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrate agar สำหรับสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อหยดด้วยสารละลาย A และ B แสดงว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถรีดิวส์ในเตรทได้ ส่วนสายพันธุ์ NV1-4 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อหยดด้วยสารละลาย A และ B แสดงว่าเชื้อไม่สามารถรีดิวส์ในเตรทได้

#### 4.11.5 การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

จากการขีด (streak) แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 บนผิวหน้าอาหารวุ้นเคี้ยว peptone yeast extract iron agar พบว่าสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อสีน้ำเงินดำ และ TSI agar พบว่าสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำเงินดำ

#### 4.11.6 การศึกษาสมบัติการย่อยสลายสาร

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified bennett agar ที่เติมสารที่ต้องการตรวจสอบการย่อยสลายสารแต่ละชนิดลงไป ผลแสดงดังตารางที่ 4.8

**ตารางที่ 4.8** แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบ

สารทดสอบ	ผลการย่อยสลายสารทดสอบของแอกติโนมัยซีต		
	สายพันธุ์ NKP3-2	สายพันธุ์ LK3-10	สายพันธุ์ NV1-4
อะดีนีน (adenine)	+	-	+
ไทโรซีน (tyrosine)	+	+	+
ไซแลน (xylan)	+	+	+
แซนทีน (xanthine)	+	+	+
เคซีน (casein)	+	+	+
เจลาติน (gelatin)	+	+	+
แป้ง (starch)	+	+	+

หมายเหตุ + : ย่อยได้ - : ไม่ย่อย

**4.11.7** การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified bennett agar และตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4 10 30 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส ผลการเจริญแสดงดังตารางที่ 4.9

**ตารางที่ 4.9** ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เลี้ยงที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	สายพันธุ์ NKP3-2	สายพันธุ์ LK3-10	สายพันธุ์ NV1-4
4	-	-	-
10	-	-	-
30	+	+	+
37	+	+	+
45	+	+	+
55	+	+	+

หมายเหตุ + : เจริญ - : ไม่เจริญ

#### 4.11.8 การตรวจสอบการเจริญที่พีเอชต่าง ๆ

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified bennett agar ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4 4.5 5 5.5 6 8 8.5 และ 9 ผลการเจริญแสดงดังตารางที่ 4.10

**ตารางที่ 4.10** แสดงความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 ที่พีเอชต่าง ๆ

พีเอช แอกติโนมัยซีต	4	4.5	5	5.5	6	8	8.5	9
สายพันธุ์ NKP3-2	+	+	+	+	+	+	+	+
สายพันธุ์ LK3-10	-	-	+	+	+	+	+	+
สายพันธุ์ NV1-4	-	-	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + : เจริญ - : ไม่เจริญ

#### 4.11.9 การตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar ที่เติมสารประกอบไนโตรเจนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar ที่ไม่เติมสารประกอบไนโตรเจน และชุดควบคุมบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar ที่เติมแอสปารากีน หรือโปรลีน ผลแสดงดังตารางที่ 4.11

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.11 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4

สารประกอบไนโตรเจน	ความสามารถในการเจริญ		
	สายพันธุ์ NKP3-2	สายพันธุ์ LK3-10	สายพันธุ์ NV1-4
L-อาร์จินีน (L-arginine)	+	+	+
L-ฮิสทีดีน (L-histidine)	+	+	+
L-เมทไธโอนีน (L-methionine)	-	-	+
โพแทสเซียมไนเตรท (potassium nitrate)	+	+	+
L-ซีรีน (L-serine)	+	+	+
L-ธีโอนีน (L-theonine)	+	+	+
L-วาลีน (L-valine)	+	+	+
B-อะลานีน (B-alanine)	+	+	+
L-กลูตามีน (L-glutamine)	+	+	+

หมายเหตุ + : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ

ชุดควบคุมลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

ชุดควบคุมบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar ที่เติม 0.1% L-asparagine

#### 4.11.10 การตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar ที่เติมสารประกอบคาร์บอนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar ที่ไม่ได้เติมสารประกอบคาร์บอน และชุดควบคุมบวกคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar ที่ประกอบด้วยกลูโคส ผลแสดงดังตารางที่ 4.12



ตารางที่ 4.12 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4

สารประกอบคาร์บอน	ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีต		
	สายพันธุ์ NKP3-2	สายพันธุ์ LK3-10	สายพันธุ์ NV1-4
L-อะราบิโนส ( <i>L</i> -arabinose)	+	+	+
เดกแทรนซ์ (dextrane)	+	+	+
D-ฟรุกโตส ( <i>D</i> -fructose)	+	+	+
D-กาแลคโตส ( <i>D</i> -galactose)	+	+	+
มีโซ-อินโนสิทอล ( <i>meso</i> -inositol)	+	+	+
D-แลคโตส ( <i>D</i> -lactose)	+	+	+
D-แมนนิทอล ( <i>D</i> -mannitol)	+	+	+
D-แมนโนส ( <i>D</i> -mannose)	+	+	+
L-รามโนส ( <i>L</i> -rhamnose)	+	+	+
ซูโครส (sucrose)	+	+	+
ทรีฮาโลส (trehalose)	+	+	+
ไซโลส (xylose)	+	+	+
โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate)	+	+	+
โซเดียมซิเตรท (sodium citrate)	+	+	+

หมายเหตุ + : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ

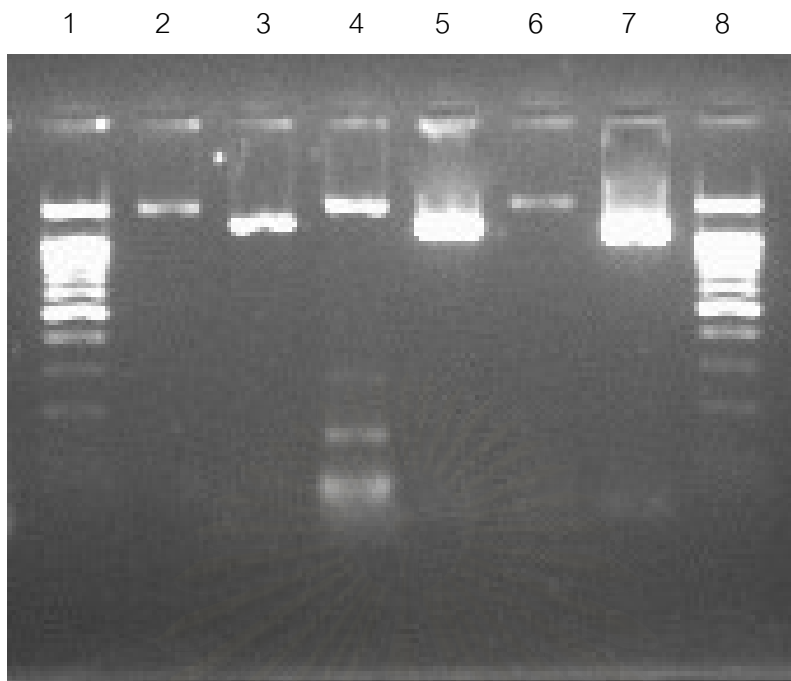
ชุดควบคุมลบ : อาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน

ชุดควบคุมบวก : อาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar ที่เติม 1.0% glucose

#### 4.13 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

จากการจำแนกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 ตามหลักการจำแนกอ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 9 (Williams และคณะ, 1994) พบว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* จากผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ที่แน่ชัดได้ จึงได้ทำการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 แต่เนื่องจากยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA ของแอกติโนมัยซีตเป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ และมีบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ (conserved sequence) อยู่มาก โดยใช้ไพรเมอร์ PA PH และ StrepF เพื่อให้มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายขนาด และสามารถครอบคลุมช่วงที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA มากที่สุด (hypervariable region) และส่ง PCR product ของสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 ไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA

จากการตรวจสอบขนาดของ PCR product เบื้องต้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4.40



**รูปที่ 4.41** ขนาดของ PCR product เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆบนอะกาโรสเจล

Lane 1 และ 8 : DNA marker ขนาด 1,500 bp

Lane 2 : PCR product ของสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ PA/PH

Lane 3 : PCR product ของสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ PA/StrepF

Lane 4 : PCR product ของสายพันธุ์ LK3-10 เมื่อใช้ไพรเมอร์ PA/PH

Lane 5 : PCR product ของสายพันธุ์ LK3-10 เมื่อใช้ไพรเมอร์ PA/StrepF

Lane 6 : PCR product ของสายพันธุ์ NV1-4 เมื่อใช้ไพรเมอร์ PA/PH

Lane 7 : PCR product ของสายพันธุ์ NV1-4 เมื่อใช้ไพรเมอร์ PA/StrepF

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 แสดงดังรูปที่ 4.41, 4.42 และ 4.43 ตามลำดับ

```

ATCGACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG
GCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATG
ACCGTCTTGGGCATCCTTGACGGTGTAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCG
GCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGC
CTGAGAGGGCGACCGGTCACACTGGGACTGAGCCACGTTTACAAATATATACGGGA

```

GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT  
 GAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTG  
 ACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 TAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTC  
 ACGTCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGG  
 CTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT  
 CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGA  
 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG  
 GTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAA  
 GTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGG  
 GCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTAC  
 CAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTCGGTGT  
 ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
 AACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTC  
 ACTGGAGACCGCCG

**รูปที่ 4.42** แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA ของแบคทีเรียในมัยซีตสายพันธุ์

NKP3-2 จำนวน 1,082 เบส

CGAACGATGAACCGTTTTGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG  
 GGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAT  
 GACTACCGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCC  
 GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCC  
 GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  
 GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCC  
 GCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCA  
 AGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  
 TACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCT  
 TGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGG  
 CAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA  
 GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTG  
 AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA

AACGTTGGGAAGTGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCA  
 TTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACG  
 GGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCT  
 TACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGGTCGG  
 TGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC  
 CGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGATGGGGA  
 CTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACT

**รูปที่ 4.43** แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์

LK3-10 จำนวน 1,093 เบส

AGCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG  
 GGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAC  
 CACTCTCGCAGGCATCTGTGAGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCCG  
 GGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG  
 CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG  
 AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGC  
 GTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGT  
 GACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
 GTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGT  
 CACGTCGGGTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTA  
 GCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA  
 TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGA  
 GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG  
 GTGGGAAGTGTGGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAA  
 GTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG  
 CCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACC  
 AAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTA  
 CAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCA

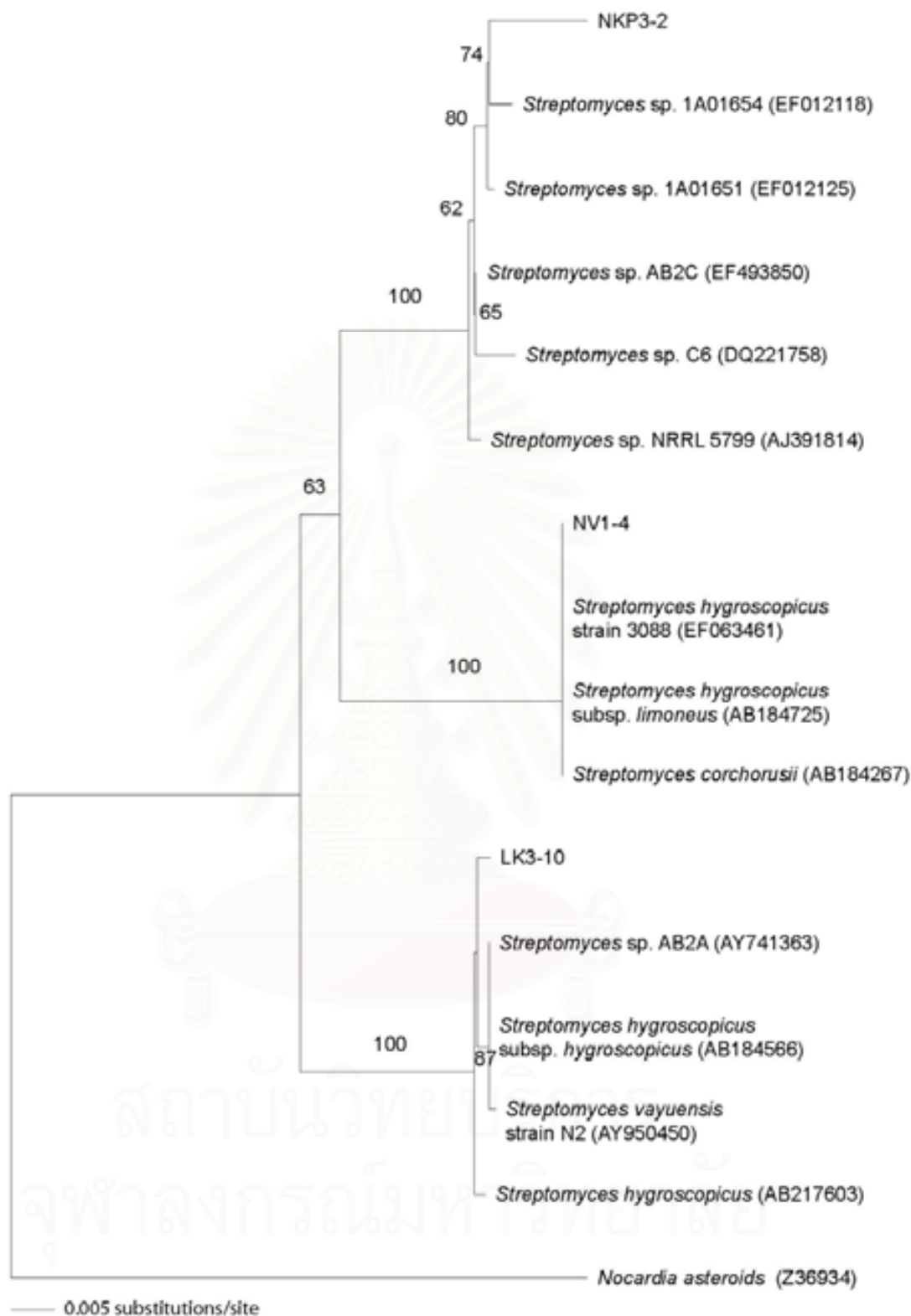


ACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCA  
CAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGA

**รูปที่ 4.44** แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์  
NV1-4 จำนวน 1,096 เบส

จากนั้นลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2, LK3-10 และ NV1-4 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่บันทึก และรวบรวมไว้ใน GenBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> พบว่าลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) กับ *Streptomyces* sp. เท่ากับ 98% ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ นำมาสร้าง dendogram พบว่าสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุดคือ *Streptomyces* sp. 1A01654 ลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) กับ *Streptomyces* sp. เท่ากับ 99% ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ นำมาสร้าง dendogram พบว่าสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด 3 สายพันธุ์คือ *Streptomyces* sp. AB2A *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* และ *Streptomyces hygrosopicus* ลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) กับ *Streptomyces* sp. เท่ากับ 100% ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ นำมาสร้าง dendogram พบว่าสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุดคือ *Streptomyces hygrosopicus* strain 3088

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.45 Dendrogram แสดงระดับความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 NV1-4 และแบคทีเรียกลุ่มอื่น โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของยีนที่ประมวลรหัส 16s rRNA

ตารางที่ 4.13 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces hygroscopicus* บนอาหาร ISP2

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ สรีรวิทยา	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต			
	NKP3-2	LK3-10	NV1-4	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
สีของสายใยอาหาร	เหลือง	เหลือง	เหลือง	เหลือง
สีของสายใยอากาศ	น้ำตาล	เทา	ขาว	เทา
สีสปอร์	เทาดำ	เทาดำ	เทา	เทาดำ
รูปร่างสปอร์	ทรงกระบอก (cylindrical)	ทรงกระบอก (cylindrical)	รูปไข่ (ovoid)	รูปไข่ (ovoid)
ลักษณะผิวสปอร์	เรียบ	ขรุขระ	เรียบ	ขรุขระ
ลักษณะสายสปอร์	เกลียว	เกลียว	เกลียว	เกลียว
การสร้าง รงควัตถุเมลานิน	+	+	+	+
รงควัตถุที่ละลายน้ำได้	-	+	+	+
การรีดิวซ์ไนเตรท	+	+	-	+
การย่อยสลาย เจลาติน	+	+	+	+

ตารางที่ 4.13(ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces hygroscopicus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ สรีรวิทยา	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต			
	NKP3-2	LK3-10	NV1-4	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
อะดีนีน	+	+	+	+
แป้ง	+	+	+	+
<u>การใช้แหล่งคาร์บอน</u>				
L-อะราบิโนส	+	+	+	+
L-แรมโนส	+	+	+	+
D-ฟรุกโตส	+	+	+	+
D-กาแลคโตส	+	+	+	+
ซูโครส	+	+	+	-
มีไซ – อินโนซิทอล	+	+	+	+
ไซโลส	+	+	+	+
D-แมนนิทอล	+	+	+	+
ทรีฮาโลส	+	+	+	+

ตารางที่ 4.13(ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces hygroscopicus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ สรีรวิทยา	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต			
	NKP3-2	LK3-10	NV1-4	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
การให้แหล่งไนโตรเจน				
L-อะลานีน	+	+	+	+
L-ฮีสทีดีน	+	+	+	+
L-เมทไทโอนีน	-	-	+	-
L-ซีรีน	+	+	+	+
L-ธรีโอนีน	+	+	+	+
L-วาลีน	+	+	+	+
B-อะลานีน	+	+	+	+
L-กลูตามีน	+	+	+	+

หมายเหตุ + : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

ที่มา : [www.freepatentsonline.com](http://www.freepatentsonline.com)



## บทที่ 5

### วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกแอกติโนมัยซีตจากตัวอย่างดินในจังหวัดต่างๆในประเทศไทย จำนวน 36 ตัวอย่าง ได้แก่ จังหวัดตาก ลำปาง นครสวรรค์ ปทุมธานี น่าน นครศรีธรรมราช ระยอง พิษณุโลก สกลนคร เชียงราย สุราษฎร์ธานี สามารถแยกแอกติโนมัยซีตได้ 115 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเซลลูเลสเบื้องต้นบน CMC agar พบว่ามีแอกติโนมัยซีตที่สามารถสร้างเซลลูเลสได้จำนวน 71.30% และจำนวนแอกติโนมัยซีตที่ไม่สร้างเซลลูเลสมีจำนวน 28.70% โดยทำการจัดอันดับจากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณไฮโดรไลซิสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (Ratio of the size of CMC hydrolysis zone to colony diameter) โดยพบว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในนาข้าว อ.โกรกพระ จ.นครสวรรค์ มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณไฮโดรไลซิสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่เวลา 7 วันมากที่สุดเท่ากับ 4.30 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Abdulla H.M. และคณะ (2007) ที่ทำการแยกแอกติโนมัยซีตจากดินในสวนพฤกษศาสตร์ ประเทศอียิปต์ ศึกษาเซลลูเลสแอกติวิตีโดยการย่อยสลายกระดาษกรองและฟางข้าวเหลือใช้ พบว่าแอกติโนมัยซีตส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายฟางข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้นำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 ที่คัดเลือกได้มาศึกษาเอนไซม์แอกติวิตี โดยจากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนคือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และแอลฟาเซลลูโลส ต่อการสร้างเซลลูเลสพบว่า แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 สามารถใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้ดีกว่า โดยมีเซลลูเลสแอกติวิตีสูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลองเท่ากับ 260.859 mU/ml โดยเอนไซม์แอกติวิตีเมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และแอลฟา เซลลูโลส เป็นแหล่งคาร์บอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และน้ำหนักแห้งในระยะเวลาเดียวกัน เมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และแอลฟา เซลลูโลส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนคือ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $\text{KNO}_3$  ต่อการสร้างเซลลูเลสพบว่า แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 สามารถสร้างเซลลูเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ได้สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม  $\text{KNO}_3$  โดยมีเซลลูเลสแอกติวิตีสูงสุดในวันที่ 5 ของการทดลอง เท่ากับ 249.75 mU/ml จะเห็นได้ว่าเซลลูเลสแอกติวิตีเมื่อใช้  $\text{NH}_4\text{Cl}$  เป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าใกล้เคียงกับกับเซลลูเลสแอกติวิตีเมื่อใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่สามารถนำ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีต้นทุนต่ำกว่าแทน yeast extract ได้ และน้ำหนักแห้งในระยะเวลาเดียวกัน เมื่อใช้  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $\text{KNO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การศึกษาผลของ pH ต่อการสร้างเซลลูเลสพบว่า

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เท่ากับ 6 มีเซลลูเลสแอกติวิตีสูงสุดในวันที่ 4 โดยมีค่าเท่ากับ 368.56 mU/ml รองลงมาคือที่ pH 5 7 8 และ 9 ตามลำดับ โดยเซลลูเลสแอกติวิตีในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 6 7 8 และ 9 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ น้ำหนักแห้งในระยะเวลาเดียวกันที่ pH 5 8 และ 9 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และน้ำหนักแห้งที่ pH 5 6 และ 7 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสร้างเซลลูเลสพบว่า แอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ NKP3-2 สามารถสร้างเซลลูเลสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในวันที่ 4 โดยมีค่าเท่ากับ 390.38 mU/ml รองลงมาคือ ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส โดยมีเซลลูเลสแอกติวิตีเท่ากับ 264.90 และ 220.04 mU/ml ในวันที่ 3 และ 4 ตามลำดับ โดยเซลลูเลสแอกติวิตีในแต่ละอุณหภูมิที่เลี้ยงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ น้ำหนักแห้งในระยะเวลาเดียวกันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างจากน้ำหนักแห้งที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีรายงานโดย Andre Luiz Grigorevski de Lima และคณะ(2005) พบว่า *Streptomyces drozdowiczii* สามารถสร้าง CMCase ได้สูงสุดเท่ากับ 595 U/l เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี CMC และ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ และเอนไซม์สามารถคงตัวได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5 ได้นาน 1 ชั่วโมง

จากการทดสอบความสามารถของแอกติโนมัยซีดที่แยกได้ 115 สายพันธุ์ในการสร้างสารปฏิชีวนะเบื้องต้นยับยั้งราโรคพืช 6 ชนิดได้แก่ *Pythium aphanidermatum* DOAC 1662, *Phytophthora parasitica* DOAC 0005, *Collectotrichum capsici* DOAC 1196, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DOAC 0874, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* DOAC 0893 และ *Alternaria porri* DOAC 1756 โดยวิธี Dual-culture พบว่ามีแอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราโรคพืชได้จำนวน 66.96% และมีแอกติโนมัยซีดที่ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราโรคพืชได้จำนวน 33.04% นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มของแอกติโนมัยซีดที่สามารถยับยั้งราได้ชนิดเดียวมีจำนวน 2.61% ยับยั้งราได้ 2 ชนิดมีจำนวน 4.35% ยับยั้งราได้ 3 ชนิดมีจำนวน 13.91% ยับยั้งราได้ 4 ชนิดมีจำนวน 20.00% ยับยั้งราได้ 5 ชนิดมีจำนวน 15.65% ยับยั้งราได้ 6 ชนิดมีจำนวน 10.43% ทั้งนี้แอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะทั้งหมด สามารถยับยั้งราโรคพืชได้จำเพาะแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์แอกติโนมัยซีดจากการคัดเลือกแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ พบว่า สายพันธุ์ LK3-10 NKP3-2 และ NV1-4 สามารถยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิด โดยสายพันธุ์ LK3-10 สามารถยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum* ( $\Delta Y=31$  มม.) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ( $\Delta Y=11.7$  มม.) ได้ดีที่สุด สายพันธุ์ NKP3-2 สามารถยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum* ( $\Delta Y=28.8$  มม.) ได้รองลงมา และสายพันธุ์ NV1-4 สามารถยับยั้งรา *Pythium*

*aphanidermatum* ( $\Delta Y=25.2$  มม.) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ( $\Delta Y=9.5$  มม.) ได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ NKP3-2 และ NV1-4 และเพื่อแสดงผลกระทบและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของราทดสอบด้วยสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10 โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ ได้แก่ เส้นใยมีการหดสั้นลง หักและเจริญได้น้อย เส้นใยมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เส้นใยแผ่กระจายได้น้อย ลักษณะผนังเส้นใยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เป็นต้น ทั้งนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ NKP3-2 ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเซลล์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราโรคพืชได้ทั้ง 6 ชนิดได้ในระดับสูงอีกด้วย

ในการจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 NV1-4 และ LK3-10 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่องสว่าง (light microscope) กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าทั้งสามสายพันธุ์อยู่ในจีนัส *Streptomyces* จากผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ที่แน่ชัดได้ จึงต้องทำการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีและศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ประมวลรหัส 16S rRNA ทั้งนี้ต้องใช้แบบไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายขนาดและสามารถครอบคลุมช่วงที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA มากที่สุด (hypervariable region) ดังนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้จากการใช้ primer 2 คู่ ได้แก่ PA กับ PH และ PA กับ StrepF ส่งวิเคราะห์ที่บริษัท วอร์ด เมติก จำกัด ในส่วนของ First BASE Laboratories, Selangor Darul Ehsan ประเทศมาเลเซีย เพื่อวิเคราะห์ ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสใน GenBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/beta/> นำเอาข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสใน GenBank DNA database มาจัดเรียงลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม ClustalX และทำการสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม PAUP 4.08 b พบว่าลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) กับ *Streptomyces* sp. เท่ากับ 98% ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ นำมาสร้าง dendogram พบว่าสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุดคือ *Streptomyces* sp. 1A01654 ลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ LK3-10 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) กับ *Streptomyces* sp. เท่ากับ 99% ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ นำมาสร้าง dendogram พบว่าสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด 3 สายพันธุ์คือ *Streptomyces* sp. AB2A *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* และ *Streptomyces hygroscopicus* ลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NV1-4 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%identity) กับ *Streptomyces* sp. เท่ากับ



100% ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ นำมาสร้าง dendogram พบว่าสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุดคือ *Streptomyces hygroscopicus* strain 3088

ดังนั้นการนำแอกติโนมัยซีดทั้ง 3 สายพันธุ์ซึ่งช่วยย่อยสลายเซลลูโลสและทั้งยังช่วยทำลายราโรคพืชทั้ง 6 ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีความสามารถสูงในการยับยั้งรา *Pythium aphanidermatum* และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* โดย *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าและเน่าคอดิน (Damping off, Root rot) เช่น โรคโคนเน่าของต้นกล้าแตงกวา ซึ่งจะแพร่ระบาดได้ง่ายโดยการติดมากับเมล็ดหรืออยู่ในดิน ระบาดโดยน้ำชลประทาน ลม และฝน เป็นต้น จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้แอกติโนมัยซีดแทนการใช้สารเคมีจำพวก แมนโคเซบ โปรปีโอเนบ ในการกำจัดโรครากเน่าและเน่าคอดินนี้ได้ นอกจากนี้ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) เช่น โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โดยราสามารถแพร่กระจายเข้าไปได้ทั้งทางรากและลำต้นของพืช จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้แอกติโนมัยซีดแทนการใช้สารเคมีจำพวก เบโนมิล คาร์เบนดาซิม ในการกำจัดโรคเหี่ยวเหลืองนี้ได้ นอกจากนี้ในปัจจุบันการทำปุ๋ยหมักชีวภาพ เริ่มมีการนำน้ำกากส่า (Distillery Slop) เป็นน้ำทิ้งจากหมักในอุตสาหกรรมการกลั่นสุรา เกิดจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักสุรา ได้แก่ กากน้ำตาล ซึ่งมีสารประกอบ N P และ K ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยตรงทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักปามาด้วย แอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ NKP3-2 จึงมีแนวโน้มที่สามารถย่อยสลายแหล่งไนโตรเจนจากยีสต์เมื่อนำน้ำกากส่ามาผสมหรือรดการกองปุ๋ยในการทำปุ๋ยหมักได้ ในการทำปุ๋ยหมักโดยทั่วไป มักมีการคลุกกองปุ๋ยด้วย  $\text{NH}_4\text{Cl}$  หรือ  $\text{KNO}_3$  เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจึงเป็นข้อดีที่จะสามารถประยุกต์ใช้แอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ NKP3-2 เป็นหัวเชื้อในกองปุ๋ยหมักนี้ได้

การนำแอกติโนมัยซีดมาประยุกต์ใช้ร่วมกันในระบบการทำปุ๋ยหมัก เพื่อการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี ลดต้นทุนในการจัดซื้อสารเคมี ทั้งยังช่วยรักษาสภาพแวดล้อม จึงน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทางด้านการเกษตรอินทรีย์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541. จุลชีวะวิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร:

สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. 2546. การแยกแอกติโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินร้งปลวกใน

ประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิตสาขาจุลชีวะวิทยาทางอุตสาหกรรม

ภาควิชาจุลชีวะวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทิพวรรณ สิทธิรังสรรค์. 2547. ปุ๋ยหมัก ดินหมักและปุ๋ยน้ำชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์

โอเดียนสโตร์.

### ภาษาอังกฤษ

Abdulla H.M., El-Shatoury A.S., 2007. Actinomycetes in rice straw decomposition. Waste Management J. 27: 850-853.

Aghighi, S., Shahidi Bonjar, G.H., Rawashdeh, R., Batayneh, S. and Saadoun, I., 2004.

First report of antifungal spectra of activity of Iranian Actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Asian Journal of plant sciences 4: 463-471.

Alan T. Bull, 2004. Microbial diversity and bioprospecting. Washington D.C.: ASM press.

Andre, L., Rodrigo, N., and Elba, S., 2005. Streptomyces drozdowiczii cellulose production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. Enz and microb technol J. 37: 272-277.

Boudjella, H., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Boulahrouf, A., and Boiron,

P., 2005. Isolation and molecular identification of actinomycetes microflora, of some saharian soils of south east Algeria study of antifungal activity of isolated strains. Mycologie Me'dicale. J. 15: 39-44.



- Donadio, S., Monciardini, P., and Puglia Maria, A., 2002. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. Biotechnology. J. 99: 187-198.
- El-Tarably, A.K. and Sivasithamparam, K., 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biology and Biochemistry. 38: 1505-1520.
- Fernando Pela'ez., 2005. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-. Biochem. Pharma. J.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. and Mordarski, M., 1988. Actinomycetes in biotechnology. New York: Academic Press.
- Hankin and Anagnostakis, 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulose activity of microorganisms. Gen Micro. J. 98: 109-115.
- Kieser, T., Bibb, M., Buttner, M., Chater, K., and Hopwood, D., 2000. Practical Streptomyces genetics. England: The John Innes Foundation.
- Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Couble, A. and Boiron, P., 2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. Mycologie Me'dicale J. 15: 45-51.
- Kroppenstedt, R., Mayilraj, S., Kallow, W. and Stackebrandt, E., 2005. Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea*, *Micromonospora echinaurantiaca*, *Micromonospora echinofusca*, *Micromonospora fulviviridis*, *Micromonospora inyonensis*, *Micromonospora peucetia*, *Micromonospora sagamiensis*, and *Micromonospora viridifaciens* . Sys. And App. Microbio. J. 28: 328-339.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, C.M., Dawyndt, P., Liu, Z., Huang, Y., and Swings, J., 2005. Grouping of streptomycetes using 16s-ITS RFLP fingerprinting. Research in Microbiology. 156: 755-762.
- Lee, J.Y. and Hwang, B.K., 2002. Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol. 48: 407-417.

- Lee, L., Paul, W., Willem, V., and Isak, P., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol and molecularbiology Reviews. 66: 506-577.
- Lixiang Cao, Zhiqi Qui, Jianlan You, Hongming Tan and Shining Zhou, 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiology Letters. 247: 147-152.
- Lynd, R., Weimer, J., Zyl, H. and Pretorius, S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Biology and Molecular Biology Reviews. 506–577.
- Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. Japan: Asakura publishing.
- Norris, J.R. and Ribbons, D.W. 1971. Methods in Microbiology. London and New York: Academic Press.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M. and Finance, C., 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. Soil Biol. J. 37: 69-74
- Petr Karlovsky, 2008. Secondary metabolites in soil ecology. Germany: Springer-Verlag.
- Rintala, H. Nevalainen, A., Ronka, E., and Suutari, M., 2001. PCR primers targeting the 16s rRNA gene for the specific detection of Streptomycetes. Molecular and Cellular Probes. 15: 337-347.
- Shirling, E.B., and Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int Syst Bacteriol J. 16: 313-340.
- Skyes, G., and Skinner, F., 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical importance. New York: Academic Press.
- Sudeep, P., Ahmad, A. and Rao, M., 2001. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. Bioresearch Technol. J. 77: 171-175.
- Sujatha, P. 2004. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiological Research. 160: 119-126.

- Taiwo, L.B. and Oso, B.A., 2004. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. African J. of Biotechnol. 3: 239-243.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresarch Technol. J. 72: 169-183.
- Wakman, S.A., 1950. The Actinomycetes. U.S.A.: The Chronica Botanica Company of Waltham.
- Wakman, S.A., and Henrici. Streptomycetaceae. In : Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
- Wietse de Boer, Larissa, F., Richard, S., and Lynne, B., 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. FEMS Microbiol Reviews. 29: 795-811.
- William M. Fogarty. 1983. Microbial enzymes and biotechnology. London: Applied science publishers.
- Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G., 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. U.S.A.: The Williams and Wilkins.
- Yu-Zhong., Yang, H. and Gao, Pei-Ji., 2004. Quantitative estimate of the effect of cellulase components during degradation of cotton fibers. Carbohydrate Research. 339: 819-824.
- Zaitlin, B., Turkington, K., Parkinson, D., and Clayton, G., 2004. Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycetes communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes. App.Soil Ecology. J. 26: 53-62.
- Zhou, X., Chen, H. and Li, Z., 2004. CMCase activity assay as a method for cellulase adsorption analysis. Enz. And Microbiol. Technol. J. 35: 455-459.
- Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L. and Sabaou, N., 2005. *Nocardioopsis* and *Saccharothix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Research in Microbiology. 156: 984-993.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. โซเดียม เคซีเนต อการ์ (Sodium Caseinate Ager)

โซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
เฟอร์รึคลอไรด์ ( $FeCl_3$ )	0.01	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

เติม cycloheximide ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ nystin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารปฏิชีวนะทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรและเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 50 °C

## 2. นิวเทรียนท์ อการ์ (Nutrient Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 3. แมนนิทอล มังปิ้ง อการ์ (Mannitol Mungbean Agar)

ถั่วเขียวบด	20.0	กรัม
น้ำตาลแมนนิทอล (D-mannitol)	20.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำประปา	500.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร



ต้มถั่วเขียวบดกับน้ำประปาจนเดือด กรองเอาถั่วเขียวออก นำน้ำต้มถั่วเขียวที่ได้มาเติมน้ำตาลแมนนิทอล และน้ำกลั่น ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 เติมน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มจนเดือดอีกครั้งหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

#### 4. แชนบรอต อการ์ (Sabouraud Agar)

แบคโตเปปไทน์ (Bacto peptone)	200.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	40.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

#### 5. โปเตโต เดกซ์โตรส อการ์ (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง	200.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือดประมาณ 20 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้		
ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

#### 6. กลูโคส ยีสต์ มอลต์ เอ็กซ์แทรก อการ์ (Glucose Yeast Malt Extract Agar)

กลูโคส	4.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO <sub>3</sub> )	2.0	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอช เท่ากับ 7.2		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 7. คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส อการ์ ( Carboxymethyl cellulose agar)

Carboxymethylcellulose	5	g.
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	1	g.
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.7	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต( $KH_2HPO_4$ )	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.01	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ( $ZnSO_4$ )	0.001	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 8. คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส บรอก ( Carboxymethyl cellulose broth)

Carboxymethylcellulose	5	g.
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	1	g.
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.7	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต( $KH_2HPO_4$ )	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.01	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ( $ZnSO_4$ )	0.001	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 9. แอลฟา เซลลูโลส บรอก (alpha-cellulose broth)

แอลฟา เซลลูโลส	5	g.
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	1	g.
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.7	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต( $KH_2HPO_4$ )	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5	กรัม

เฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.01	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4$ )	0.001	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

#### 10. ISP1 ทริปโตน ยีสต์ เอ็กซ์แทรก อการ์ (Trypton-Yeast Extract Agar)

ทริปโตน (Trypton)	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

#### 11. ISP2 ยีสต์ มอลต์ เอ็กซ์แทรก อการ์ (Yeast-Malt Extract Agar)

สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4.0	กรัม
กลูโคส	4.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

#### 12. ISP3 ไรต์ มิล อการ์ (Oat Meal Agar)

ข้าวไรต์ (Oat meal)	20.0	กรัม
*สารละลายเทรซ โซลชัน (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มข้าวไรต์ในน้ำกลั่นโดยต้มให้เดือดประมาณ 10-15 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงไปให้อาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เติม Trace salt solution ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (\*ภาคผนวก ก หมายเลข 21)

### 13. ISP4 อินออร์แกนิก ซอลล์ สตาร์ช (Inorganic Salts Starch Agar)

แป้ง (Soluble starch)	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ )	2.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ( $CaCO_3$ )	2.0	กรัม
*สารละลายเทรซ ซอลท์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		
(*ภาคผนวก ก หมายเลข 21)		

### 14. ISP5 กลีเซอรอล แอสปาราจีน อการ์ (Glycerol Asparagines Agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แอสปาราจีน (L-asparagine)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
*สารละลายเทรซ ซอลท์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที		
(*ภาคผนวก ก หมายเลข 21)		

### 15. ISP6 เปปโตน ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ ไอร์ออน อการ์ (Peptone Yeast Extract Iron Agar)

แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	15.0	กรัม
โปรติโอส เปปโตน (Proteose peptone)	5.0	กรัม
เฟอริก แอมโมเนียม ซิเตรต (Ferric ammonium citrate)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
โซเดียมซัลเฟต ( $Na_2SO_4$ )	0.08	กรัม

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

#### 16. ไทโรซีน อการ์ (Tyrosine Agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	15.0	กรัม
แอสปาราจีน (L-asparagine)	1.0	กรัม
แอล ไทโรซีน (L-Tyrosine)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1.0	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.01	กรัม
*สารละลายเทรซ ซอลต์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2-7.4		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที		
(*ภาคผนวก ก หมายเลข 21 )		

#### 17. ไนเตรต อการ์ (Nitrate Agar)

แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
โพแทสเซียมไนเตรต ( $KNO_3$ )	2.0	กรัม
วุ้นผง	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		



### 18. โมดิฟาย เบนเนท อการ์ (Modified Bennett's Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1.0	กรัม
กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	2.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 19. เบซอล มีเดียม (Basal Medium Agar)

กลูโคส	10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.01	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
วุ้นผง	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที		

### 20. คาร์บอน ยูทิลไลเซชัน อการ์ (Carbon Utilization Agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ )	2.64	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2HPO_4$ )	2.38	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5	กรัม
*สารละลายเทรซซอลล์ของ Pridham และ Gottlieb	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที  
(\*ภาคผนวก ก หมายเลข 22 )

### 21. สารละลายเทรซ ซอลล์ (Trace Salts Solution)

เฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.01	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ )	0.1	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  และเติมลงในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว  
ที่อุณหภูมิ 45-50 °C

### 22. สารละลายเทรซ ซอลล์ของ Pridham และ Gottlieb

(Pridham และ Gottlieb trace salt solution)

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.64	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.11	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ )	0.79	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  และเติมลงในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว  
ที่อุณหภูมิ 45-50 °C

### 23. กลูโคส ยีสต์ มอลล์ เอกซ์แทรก บรอก (Glucose Yeast Malt Extract Broth)

กลูโคส	4.0	กรัม
สารสกัดจากมอลล์ (Malt extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4.0	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## ภาคผนวก ข

## สารเคมีและวิธีการเตรียม

## 1. สารละลายที่ใช้ทดสอบบริเวณใส (Clear zone หรือ CMC hydrolysis zone)

1.1 สารละลายสีคองโก เรด ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร

ละลายสีคองโก เรด 1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

1.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

ละลาย NaCl 58.443 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

## 2. รีเอเจนต์สำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

2.1 อัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนต์ (Alkaline copper reagent)

ละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 71 กรัม และโพแทสเซียมทาร์ทเรต ( $\text{Potassium ammonium tartrate} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) 1 N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

2.2 เนลสัน รีเอเจนต์ (Nelson's reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต  $[(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  53.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ( $\text{Conc. H}_2\text{SO}_4$ ) 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโซเดียมอาซีเนท ( $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ความเข้มข้น 12% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอน กรองออกก่อนนำไปใช้

## 3. สารละลาย Acetate buffer 0.2 M

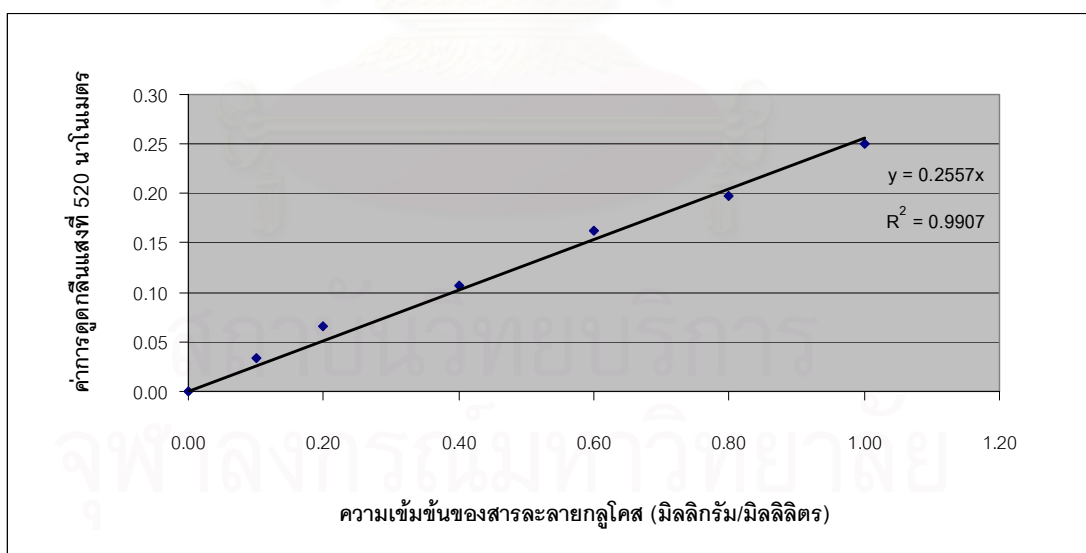
ประกอบด้วย สารละลาย A x มิลลิลิตร และสารละลาย B y มิลลิลิตร นำมาผสมรวมกัน แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

สารละลาย A : 0.2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (11.55 ml. in 1000 ml.)

สารละลาย B : 0.2 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$  16.4 g. หรือ  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  27.2 g. in 1000 ml.)

x (ml.)	y (ml.)	pH
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

#### 4. กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (Somogyi, 1952; Nelson, 1944)

### 5. สารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol

เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ลงใน 80 มิลลิลิตร isopropanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย isopropanol เก็บที่อุณหภูมิห้อง

### 6. Tris-Hcl pH 8

Tris base	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

### 7. Washing buffer

PVP (Polyvinylpyrrolidone)	2	กรัม
Ascorbic acid	1.76	กรัม
1M Tris-Hcl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### 8. Cholroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v)

Chloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

### 9. 20% Polyethylene glycol 6000(PEG)

Polyethylene glycol 6000	20	กรัม
NaCl	14.61	กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### 10. Tris-EDTA buffer (TE buffer)

1 M Tris -HCl; pH 7.4 หรือ 8	10	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA; pH 8.0	2	มิลลิลิตร



เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 11. 0.5 M EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)

EDTA	86.10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

### วิธีการทดลอง

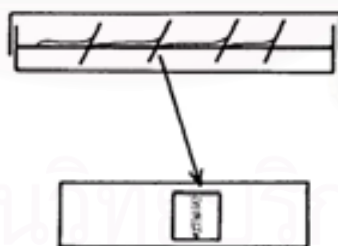
#### 1. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดิน

นำตัวอย่างดิน 25 กรัม เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร (1:1) นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Rotary shaker 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วย pH meter

#### 2. เทคนิคการทำ Slide culture

ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยม (agar block) วางบนแผ่นสไลด์ฆ่าเชื้อ จากนั้นลงเชื้อบนแผ่นวุ้น วางแผ่นปิดสไลด์ฆ่าเชื้อทับด้านบน นำไปบ่มใน moist chamber สังเกตการสร้างสายใยอากาศ(A) และสายใยอาหาร(B) โดยการนำสไลด์ไปวางบนแท่นของกล้องจุลทรรศน์ส่องดูโดยตรง หรือนำแผ่นปิดสไลด์มาวางบนแผ่นสไลด์ที่มีการหยดสี lacto phenol cotton blue นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

หรือ ทำการขีดแอกติโนมัยซีตลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแผ่นปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว มาเสียบเป็นมุมเฉียงลงบนรอยขีด บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นดึงแผ่นสไลด์มาวางบนแผ่นสไลด์ที่หยดสี lacto phenol cotton blue ไว้ แล้วจึงนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ดังรูปด้านล่าง



#### 3. การหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย (Dry cell weight)

3.1 นำกระดาษกรอง Whatman No.1 อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้เย็นในโถอบแห้ง (desicator) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

3.2 นำกระดาษกรองมากรองเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

3.3 นำกระดาษกรองที่มีเส้นใยติดอยู่ เข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 นำออกมาใส่ในโถอบแห้ง(desicator) ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

3.5 นำค่าน้ำหนักของกระดาษกรองมาหักออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร

#### 4. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopes, SEM)

4.1 ตัดชิ้นรุ้นที่มีโคโลนีของแอกติโนมัยซีตอยู่เป็นชิ้นสี่เหลี่ยม มีพื้นที่ประมาณ 5x5 ตาราง มิลลิเมตร นำชิ้นรุ้นไปอบด้วยไอของ 1% ออสเมียมเตตระออกไซด์ (Osmium tetroxide, OsO<sub>4</sub>) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายในตู้ควีน

4.2 ขจัดน้ำออก (dehydration) จุ่มตัวอย่างในเอทานอลความเข้มข้น 30, 50, 70, 90 และ 100 % ชั้นตอนละ 10-20 นาทีตามลำดับ

4.3 การทำตัวอย่างให้แห้ง โดยการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยการใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical dryer mode SAMDRI-780)

4.4 นำตัวอย่างไปติดบนแท่นทองเหลืองด้วยการติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (electroconductive adhesive)

4.5 นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 ไมโครเมตร โดยใช้เครื่อง Ion sputter coater, model JSC-110)

4.6 นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopes, IEOL รุ่น JSM-5410L V)

ที่มา : ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ง

## ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ 1 อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ CMC ถูกย่อยสลายต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย(เซนติเมตร) ของแอกติโนมัยซีต 82 สายพันธุ์

สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต ที่สร้างเซลล์	อัตราส่วนเส้นผ่าน ศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้น ผ่านศูนย์กลางโคโลนี	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต ที่สร้างเซลล์	อัตราส่วนเส้นผ่าน ศูนย์กลางบริเวณใสต่อ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี
TM1-1	3.0	NV2-3	1.5
TM1-2	2.5	NV2-4	2.1
TM1-3	4.1	NV2-5	3.3
TM2-1	3.2	NV3-1	2.1
TM3-3	2.7	NV3-3	2.7
TP1-1	1.5	NV4-1	2.3
TP1-3	1.5	NV4-2	3.1
LH1-1	2.7	NV4-3	3.4
LH1-2	2.6	NV4-4	2.5
LK1-1	2.1	NT1-1	1.7
LK1-2	2.4	RK1-1	2.4
LK1-3	2.1	RK1-2	2.0
LK2-1	3.0	RK1-4	2.8
LK3-2	3.5	PB1-1	1.5
LK3-3	2.2	PT1-1	1.2
LK3-4	2.1	PT1-2	2.7

ตารางที่ 1 (ต่อ) อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ CMC ถูกย่อยสลายต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย (เซนติเมตร) ของแอกติโนมัยซีต 82 สายพันธุ์

สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต ที่สร้างเซลล์	อัตราส่วนเส้นผ่าน ศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้น ผ่านศูนย์กลางโคโลนี	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต ที่สร้างเซลล์	อัตราส่วนเส้นผ่าน ศูนย์กลางบริเวณใสต่อ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี
LK3-5	2.9	PP1-1	3.1
LK3-7	2.3	PP1-2	3.1
LK3-8	1.6	PP1-3	1.6
LK3-9	2.5	NV1-4	3.8
LK3-10	2.9	NV2-1	3.4
NK1-2	1.4	PP1-4	4.1
NK2-1	2.7	PP1-5	3.3
NK2-4	3.9	CHR1-1	2.7
NKP1-1	1.9	CHR1-2	1.7
NKP1-2	3.5	SK1-1	1.5
NKP1-3	1.5	SK1-2	1.6
NKP1-4	1.6	SK2-1	2.3
NKP1-5	2.5	SK3-1	2.8
NKP1-6	2.9	SK3-3	1.4
NKP2-1	2.8	NC1-1	2.7
NKP2-2	1.6	NP1-1	2.9
NKP2-3	2.8	NMJ1-1	2.8
NKP3-2	4.3	NMJ2-1	2.3
NKP3-3	1.7	NS1-1	2.3
NKP3-4	3.1	NPP1-1	2.6
NKP3-5	1.5	NST1-1	1.7
NKP3-10	2.3	NST1-2	1.6



ตารางที่ 1(ต่อ) อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ CMC ถูกย่อยสลายต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย(เซนติเมตร) ของแอกติโนมัยซีต 82 สายพันธุ์

สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต ที่สร้างเซลล์	อัตราส่วนเส้นผ่าน ศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้น ผ่านศูนย์กลางโคโลนี	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต ที่สร้างเซลล์	อัตราส่วนเส้นผ่าน ศูนย์กลางบริเวณใสต่อ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี
PL1-1	3.4	SRT1-1	1.6
PL1-3	2.9	SRT1-2	2.0
NV1-2	1.5		
NV1-3	1.5		

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยรากยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
TM1-1	6.0	-	4.0	-	-	5.3
TM1-2	11.3	-	-	-	3.7	-
TM1-3	-	-	-	-	-	-
TM2-1	-	-	7.5	-	-	-
TM2-2	4.3	-	3.3	-	4.0	-
TM3-3	-	-	-	-	-	-
TM3-4	5.0	3.7	2.8	-	-	6.3
TM3-5	7.3	4.7	12.7	-	-	5.0
TP1-1	-	-	-	-	-	-
TP1-2	17.7	7.7	4.3	-	3.3	5.8
TP1-3	-	-	-	-	-	-
LH1-2	8.7	-	7.7	6.3	-	3.7
LK1-1	5.0	4.0	4.3	-	-	4.8

ตารางที่2(ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
LK1-2	-	-	-	-	-	-
LK1-3	-	3.5	3.0	-	-	3.0
LK2-1	-	-	-	-	-	-
LK3-1	8.7	5.0	4.3	3.3	4.0	4.0
LK3-2	-	-	-	-	-	-
LK3-3	18.7	5.0	4.0	7.3	13.0	9.0
LK3-4	-	-	-	-	-	-
LK3-5	3.3	-	-	-	-	-
LK3-6	-	-	4.3	6.0	-	5.0
LK3-7	-	-	-	-	-	-
LK3-8	5.0	-	4.3	7.7	9.7	5.0
LK3-9	-	-	-	-	-	-
LK3-10	31.0	8.2	8.5	11.7	8.7	6.2

ตารางที่ 2 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยรากยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
NK1-1	12.3	5.0	5.0	-	-	4.0
NK1-2	-	-	-	-	-	-
NK1-3	7.0		4.7	5.0	4.0	3.7
NK1-4	9.7	5.0	4.7	6.7	6.0	5.0
NK2-1	4.0	-	8.3	3.0	-	3.3
NK2-2	-	-	-	-	-	-
NK2-3	10.0	-	2.3	-	-	7.3
NK2-4	-	-	-	-	-	-
NK3-1	-	-	-	-	-	-
NK3-2	-	-	-	-	-	-
NK3-3	5.0	-	4.3	4.7	3.3	4.0
NKP1-1	5.0	6.3	8.0	9.0	8.8	4.7
NKP1-2	-	-	-	-	-	-

ตารางที่2(ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta Y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
NKP1-3	11.3	5.0	5.0	-	-	8.3
NKP1-4	-	-	-	-	-	-
NKP1-5	5.3	5.0	5.0	-	-	5.0
NKP1-6	19.3	-	14.0	-	-	5.0
NKP2-1	3.3	8.3	5.0	6.3	7.7	5.0
NKP2-2	-	-	-	-	-	-
NKP2-3	-	-	4.0	-	2.0	3.3
NKP2-4	4.0	-	-	-	-	-
NKP3-1	4.3	-	5.0	-	-	4.0
NKP3-2	28.8	7.8	8.0	6.3	6.7	6.5
NKP3-3	4.3	7.7	4.0	-	-	2.7
NKP3-4	9.7	-	4.3	4.0	4.0	8.3



ตารางที่2(ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
NKP3-5	-	-	-	-	-	-
NKP3-6	5.7	3.7	7.0	-	-	4.7
NKP3-7	13.7	-	4.0	6.3	6.7	5.0
NKP3-8	-	-	-	-	-	-
NKP3-9	-	-	-	-	-	-
NKP3-10	9.0	4.0	2.0	3.7	-	4.3
NKP3-11	-	8.7	5.0	4.3	4.0	3.3
PL1-1	19.7	-	10.0	-	-	4.3
PL1-2	-	-	-	-	-	-
PL1-3	4.0	7.3	3.3	5.7	5.0	-
PL1-4	-	-	4.3	7.7	8.0	5.0
PL1-5	-	-	-	-	-	-

ตารางที่2(ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
NV1-1	-	4.0	4.3	4.0	3.7	7.0
NV1-2	-	-	-	-	-	-
NV1-3	9.7	5.0	5.7	-	2.0	4.3
NV1-4	25.2	6.0	5.8	9.5	10.3	3.5
NV2-1	2.0	-	3.0	4.0	-	2.0
NV2-2	-	-	-	-	-	-
NV2-3	-	-	-	-	-	-
NV2-4	19.3	-	7.7	6.0	4.7	5.0
NV2-5	6.0	-	7.0	-	-	7.7
NV3-1	3.3	-	2.0	-	2.7	3.7
NV3-2	-	-	-	-	-	-
NV3-3	-	-	-	-	-	-

ตารางที่2(ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยรากยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
NV4-1	-	-	5.0	-	3.7	3.0
NV4-2	-	-	-	-	-	-
NV4-3	-	-	4.7	9.7	9.0	4.3
NV4-4	2.7	2.7	4.0	4.7	4.3	5.0
NT1-1	-	-	-	-	-	-
NT1-2	9.3	-	3.3	-	-	2.0
RK1-1	-	-	-	-	-	-
RK1-2	-	-	-	-	-	-
RK1-3	7.7	-	5.0	-	-	5.0
RK1-4	10.0	13.7	-	-	-	-
PB1-1	-	-	-	-	-	-
PT1-1	-	-	-	-	-	-

ตารางที่2(ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยรากยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
PT1-2	15.7	9.3	4.3	-	-	5.7
PT1-3	-	-	10.0	-	-	4.7
PP1-1	-	-	-	-	-	-
PP1-2	-	4.3	4.3	5.0	-	4.3
PP1-3	-	5.0	9.3	-	3.7	3.0
PP1-4	-	-	-	-	-	-
PP1-5	17.7	3.7	5.0	-	2.0	11.7
CHR1-1	9.3	-	7.3	-	-	-
CHR1-2	4.0	3.3	6.7	3.7	3.0	2.7
SK1-1	-	-	-	-	-	-
SK1-2	8.7	3.3	3.0	7.3	5.0	4.3
SK2-1	10.0	4.3	6.0	-	4.3	5.0

ตารางที่2(ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยรากยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
SK3-1	2.7	-	9.3	-	-	5.0
SK3-2	-	-	-	-	-	-
SK3-3	11.3	13.3	4.3	-	-	9.3
SK3-4	4.3	-	5.0	4.7	4.3	4.0
RY1-1	8.7	-	-	-	3.3	-
NS1-1	3.0	8.7	4.3	4.0	-	4.3
NPP1-1	-	-	4.3	-	9.0	5.0
NC1-1	3.7	2.3	2.0	2.0	-	4.7
NP1-1	2.3	-	3.0	-	8.0	3.0
NMJ1-1	4.0	9.0	3.3	-	-	5.0
NMJ2-1	5.0	-	2.3	-	-	2.3
NST1-1	-	5.0	4.0	-	3.3	4.0



ตารางที่ 2(ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งราที่ก่อโรคในพืชของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีต	ระยะทางที่เส้นใยรากยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีตเฉลี่ย ( $\Delta y$ ) (มิลลิเมตร)					
	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Collectotrichum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
	<i>aphanidermatum</i>	<i>parasitica</i>	<i>capsici</i>	f. sp. <i>lycopersici</i>	f. sp. <i>cubense</i>	<i>porri</i>
NST1-2	9.7	-	4.0	3.0	3.0	4.0
SRT1-1	7.7	3.0	4.0	3.3	3.0	3.3
SRT1-2	4.7	3.7	3.7	-	-	4.3

## ภาคผนวก จ

## ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 1 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของ เซลลูโลสแอกติวิตีของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อใช้ CMC และ alpha-cellulose เป็นแหล่งคาร์บอน

## T-Test

## Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	CMCase	260.8590	3	12.18908	7.03737
	alpha-cellulase	24.0863	3	.62394	.36023

## Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	CMCase & alpha-cellulase	3	.868	.331

## Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	CMCase - alpha cellulase	236.7727	11.65169	6.72710	207.8283	265.7171	35.197	2	.001

ตารางที่ 2 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของ เซลลูโลสแอกติวิตีของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อใช้ yeast extract  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $\text{KNO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจน

## ANOVA

## เซลล์แอกติวิตี

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19991.46	2	9995.732	130.295	.000
Within Groups	460.296	6	76.716		
Total	20451.76	8			

Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets

**เซลล์ูเลสแอกติวิตี**

a  
Duncan

แหล่งไนโตรเจน	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
potassium nitrate	3	155.7880	
ammonium chloride	3		249.7457
yeast extract	3		260.8590
Sig.		1.000	.171

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**ตารางที่ 3** วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของ เซลล์ูเลสแอกติวิตีของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้น เท่ากับ 5 6 7 8 และ 9 ตามลำดับ

ANOVA

**เซลล์ูเลสแอกติวิตี**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36445.40	4	9111.350	199.637	.000
Within Groups	456.396	10	45.640		
Total	36901.79	14			

Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets

**เซลล์ูเลสแอกติวิตี**

a  
Duncan

pH	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
9.00	3	232.1667				
8.00	3		265.5063			
7.00	3			310.3637		
5.00	3				340.0667	
6.00	3					368.5570
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 4 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของ เซลลูโลสแอกติวิตีของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญที่อุณหภูมิ 30 45 และ 55 องศาเซลเซียส

## ANOVA

## เซลล์ูโลสแอกติวิตี

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	46771.82	2	23385.912	291.943	.000
Within Groups	480.626	6	80.104		
Total	47252.45	8			

Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets

## เซลล์ูโลสแอกติวิตี

Duncan<sup>a</sup>

temperature	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
55.00	3	220.0427		
45.00	3		264.9000	
30.00	3			390.3793
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของ น้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อใช้ CMC และ alpha-cellulose เป็น แหล่งคาร์บอน

### T-Test

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 CMC	2.0127	3	.37723	.21780
alpha-cellulose	.3247	3	.14914	.08610

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 CMC & alpha cellulose	3	.077	.951

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 CMC - alpha cellulose	1.6880	.39482	.22795	.7072	2.6688	7.405	2	.018

ตารางที่ 6 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของ น้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อใช้ yeast extract  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $\text{KNO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจน

ANOVA

### น้ำหนักเซลล์แห้ง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.512	2	.256	1.724	.256
Within Groups	.891	6	.148		
Total	1.402	8			

Post Hoc Tests  
Homogeneous Subsets



### น้ำนักเซลล์แห้ง

Duncan <sup>a</sup>

แหล่งไนโตรเจน	N	Subset for alpha = .05
		1
potassium nitrate	3	1.4627
ammonium chloride	3	1.9080
yeast extract	3	2.0127
Sig.		.142

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**ตารางที่ 7** วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของน้ำนักเซลล์แห้งของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 6 7 8 และ 9 ตามลำดับ

## ANOVA

## น้ำนักเซลล์แห้งt

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.641	4	.160	4.802	.020
Within Groups	.334	10	.033		
Total	.975	14			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

## น้ำนักเซลล์แห้ง

Duncan <sup>a</sup>

pH	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
9	3	.5440	
8	3	.6570	
5	3	.8347	.8347
6	3		1.0313
7	3		1.0780
Sig.		.092	.150

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**ตารางที่ 8** วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของ น้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 เจริญที่อุณหภูมิ 30 45 และ 55 องศาเซลเซียส

## ANOVA

## น้ำหนักเซลล์แห้ง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.302	2	.651	34.438	.001
Within Groups	.113	6	.019		
Total	1.415	8			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

## น้ำหนักเซลล์แห้ง

Duncan<sup>a</sup>

อุณหภูมิ	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
55	3	.9260	
45	3	1.1373	
30	3		1.8173
Sig.		.109	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**ตารางที่ 9** วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของระยะทางเฉลี่ยที่ราททดสอบ *Pythium aphanidermatum* ถูกยับยั้ง ( $\Delta\gamma$ ) โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4

## ANOVA

## ระยะทางเฉลี่ยที่ราถูกยับยั้ง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	52.167	2	26.083	36.115	.000
Within Groups	4.333	6	.722		
Total	56.500	8			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

ระยะทางเฉลี่ยที่รากถูกยับยั้ง

Duncan <sup>a</sup>

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
NV1-4	3	25.1667		
NKP3-2	3		28.8333	
LK3-10	3			31.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่10 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของระยะทางเฉลี่ยที่รากทดสอบ *Phytophthora parasitica* ถูกยับยั้ง ( $\Delta\gamma$ ) โดยแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4

ANOVA

ระยะทางเฉลี่ยที่รากถูกยับยั้ง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.722	2	2.861	11.444	.009
Within Groups	1.500	6	.250		
Total	7.222	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ระยะทางเฉลี่ยที่รากถูกยับยั้ง

Duncan <sup>a</sup>

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
NV1-4	3	6.3333	
NKP3-2	3		7.8333
LK3-10	3		8.1667
Sig.		1.000	.445

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่11 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของระยะทางเฉลี่ยที่ราดสอบ *Collectotrichum capsici* ถูกยับยั้ง( $\Delta\gamma$ ) โดยแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4

## ANOVA

## ระยะทางเฉลี่ยที่ราดถูกยับยั้ง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.056	2	6.028	13.563	.006
Within Groups	2.667	6	.444		
Total	14.722	8			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

## ระยะทางเฉลี่ยที่ราดถูกยับยั้ง

Duncan<sup>a</sup>

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
NV1-4	3	5.8333	
NKP3-2	3		8.0000
LK3-10	3		8.5000
Sig.		1.000	.394

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่12 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของระยะทางเฉลี่ยที่ราดสอบ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ถูกยับยั้ง( $\Delta\gamma$ ) โดยแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4

## ANOVA

## ระยะทางเฉลี่ยที่ราดถูกยับยั้ง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	43.167	2	21.583	38.850	.000
Within Groups	3.333	6	.556		
Total	46.500	8			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

ระยะทางเฉลี่ยที่รากถูกยับยั้ง

Duncan <sup>a</sup>

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
NKP3-2	3	6.3333		
NV1-4	3		9.5000	
LK3-10	3			11.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่13 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของระยะทางเฉลี่ยที่รากทดสอบ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubeense* ถูกยับยั้ง( $\Delta\gamma$ ) โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4

ANOVA

ระยะทางเฉลี่ยที่รากถูกยับยั้ง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20.222	2	10.111	17.333	.003
Within Groups	3.500	6	.583		
Total	23.722	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ระยะทางเฉลี่ยที่รากถูกยับยั้ง

F

Duncan <sup>a</sup>

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
NKP3-2	3	6.6667		
LK3-10	3		8.6667	
NV1-4	3			10.3333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ตารางที่ 14 วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของระยะทางเฉลี่ยที่ราดสอบ *Alternaria porri* ถูกยับยั้ง ( $\Delta\gamma$ ) โดยแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ NKP3-2 LK3-10 และ NV1-4

## ANOVA

## ระยะทางเฉลี่ยที่ราดถูกยับยั้ง

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.222	2	8.111	41.714	.000
Within Groups	1.167	6	.194		
Total	17.389	8			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

## ระยะทางเฉลี่ยที่ราดถูกยับยั้ง

Duncan<sup>a</sup>

ISOLATE	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
NV1-4	3	3.5000	
LK3-10	3		6.1667
NKP3-2	3		6.5000
Sig.		1.000	.390

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิริภรณ์ สุขวโรทัย เกิดเมื่อวันที่ 18 ธันวาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2547 และ เข้าศึกษาต่อในระดับหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย