# สถานะเชิงจุลินทรีย์ของป่าชายเลนในเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก (Eastern Economic Corridor; EEC): กรณีศึกษาป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

โดย

นายปพน กาญจนศิริพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

# สถานะเชิงจุลินทรีย์ของป่าชายเลนในเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก (Eastern Economic Corridor; EEC): กรณีศึกษาป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

โดย
นายปพน กาญจนศิริพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

# MICROBIAL STATUS OF MANGROVE FOREST IN THE EASTERN ECONOMIC CORRIDOR (EEC): A CASE STUDY OF KLONG TUB MANGROVE FOREST, CHUK SAMED COMMUNITY, SATTAHIP DISTRICT, CHONBURI PROVINCE

By

MR. Papon GANJANASIRIPONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (MICROBIOLOGY)

Department of MICROBIOLOGY

Silpakorn University

Academic Year 2022

Copyright of Silpakorn University

| | |
|---|---|
| หัวข้อ | สถานะเชิงจุลินทรีย์ของป่าชายเลนในเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก (Eastern Economic Corridor; EEC): กรณีศึกษาป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี |
| โดย | นายปพน กาญจนศิริพงศ์ |
| สาขาวิชา | จุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต |
| อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาพร ชื่นอิ่ม |

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

( )

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย เตโชวิศาล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาพร ชื่นอิ่ม)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(รองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา สและน้อย)

61313202 : จุลชีววิทยาแผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : ป่าชายเลน, อะไมเลส, ไลเปส, โปรตีเอส, โครงการเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก, EEC, แอคติโนมัยซีท

นาย ปพน กาญจนศิริพงศ์: สถานะเชิงจุลินทรีย์ของป่าชายเลนในเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก (Eastern Economic Corridor; EEC): กรณีศึกษาป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาพร ชื่นอิ่ม

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่ตั้งอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างแผ่นดินกับทะเล เป็นพื้นที่ชุ่มน้ำที่มีน้ำขึ้นน้ำลงเป็นลักษณะเฉพาะทำให้ป่ามีลักษณะเป็นน้ำกร่อย ป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับพื้นที่ชุ่มน้ำต้นธูปฤาษี และมีตำแหน่งอยู่ในพื้นที่เขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก (Eastern Economic Corridor; EEC) ใกล้เมืองพัทยาซึ่งเป็นแหล่งท่องเที่ยวที่มีชื่อเสียงระดับโลก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ 1) เพื่อศึกษากลุ่มประชากรแบคทีเรียในป่าชายเลน 2) เพื่อศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ไลเปส และโปรตีเอส และ 3) เพื่อสำรวจสถานะของป่าชายเลน ต่อการรองรับเป้าหมายอุตสาหกรรมการท่องเที่ยวเชิงนิเวศของเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออกหรือ EEC ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Heterotrophic bacteria (n=71) ด้วยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 24 จีนัส จาก 15 แฟมิลี่ ดังนี้ *Paenibacillaceae* (31%) > *Bacillaceae* (18%) > *Vibrionaceae* (10%) > *Lactobacillacea* (9%) > *Enterobacterieceae* (7%) > *Aeromonadaceae* (6%) > *Staphylococcaceae* (5%) > *Pasteurellaceae, Pseudomonadaceae, Yersiniaceae* (แฟมิลี่ละ 3%) > *Budviciaceae, Erwiniaceae, Hafniaceae, Moraxellaceae, Streptococcaceae* (แฟมิลี่ละ 1%) และไม่พบแบคทีเรียในกลุ่ม coliform การทดสอบการผลิตเอนไซม์สำคัญในอุตสาหกรรมพบแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส คือ *Pasteurella* sp. โดยมีค่า amylolytic index อยู่ที่ 9.0 เอนไซม์ไลเปสคือ *Serratia* sp. มีค่า lipolytic index อยู่ที่ 10.0 และเอนไซม์โปรตีเอส คือ *Bacillus* sp. มีค่า proteolytic index อยู่ที่ 6.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียเส้นใย แกรมบวกทั้งหมด 4 ไอโซเลท พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces platensis*, *Micromonospora* sp. A38, *Streptomyces* sp. NA03103 และ *Bacillus velezensis* strain KKLW จากผลการศึกษานี้พบว่าป่าชายเลนคลองถูป มีความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยพบแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์สำคัญในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังมีมลพิษทางน้ำน้อยมาก จึงกล่าวได้ว่าสถานะของป่าชายเลนคลองถูป สามารถรองรับอุตสาหกรรมการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ ในเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออกและมีศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพสูง

61313202 : Major (MICROBIOLOGY)

Keyword : mangrove, amylase, lipase, protease, actinomycetes, Eastern Economic Corridor, EEC

MR. Papon GANJANASIRIPONG : Microbial Status of Mangrove Forest in the Eastern Economic Corridor (EEC): A Case Study of Klong Tub Mangrove Forest, Chuk Samed Community, Sattahip District, Chonburi Province Thesis advisor : Assistant Professor Thanaporn Chuen-im, Ph.D.

Mangrove forests are ecosystems located at the border between land and sea. The unique characteristic is tides leading to brackish water in the forest. Klong Tub mangrove forest, Chuk Samet Community, Sattahip District, Chonburi Province is located nearby a narrow cattail wetland near Pattaya city (a famous worldwide touring place), and within the Eastern Economic Corridor (EEC). The aims of this research were to 1) study bacterial community of the forest, 2) determine potentials of bacteria in term of amylase, lipase and protease production and 3) evaluate status of the forest in supporting ecotourism, one target industrial in EEC. Isolation and identification of heterotrophic bacteria (n=71) by biochemical approach revealed 24 genus in 15 families *Paenibacillaceae* (31%) > *Bacillaceae* (18%) > *Vibrionaceae* (10%) > *Lactobacillacea* (9%) > *Enterobacterieceae* (7%) > *Aeromonadaceae* (6%) > *Staphylococcaceae* (5%) > *Pasteurellaceae, Pseudomonadaceae, Yersiniaceae* (3% each family) > *Budviciaceae, Erwiniaceae, Hafniaceae, Moraxellaceae, Streptococcaceae* (1% each family). No coliform detected. Investigation of bacteria with high potential in amylase production revealed *Pasteurella* sp. (amylolytic index at 9.0) and for lipase and protease production were *Serratia* sp.(lypolytic index at 10.0) and *Bacillus* sp.(proteolytic index at 6.7), respectively. Nucleotide analysis of 16S rRNA gene sequence of Gram-positive filamentous bacteria (4 isolates) indicated that they were closely related to *Streptomyces platensis*, *Micromonospora* sp. A38, *Streptomyces* sp. NA03103 and *Bacillus velezensis* strain KKLW. From this study, Klong Tub forest contains microbial diversity with very little pollution, where bacteria have high potentials of essential enzyme-industrial production. Conclusively, the status of Klong Tub forest has high potentials in biotechnological application and is capable of supporting the ecotourism strategy of EEC.

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาพร ชื่นอิ่ม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ให้ข้อมูล ความรู้ คำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมถึงความเอาใจใส่ที่ดีตลอดทั้งการทำวิทยานิพนธ์นี้จนประสบความสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล รองศาสตราจารย์ ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน และ รองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา สและน้อย ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้มอบความรู้ คำแนะนำที่ดีและเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณกรพรรณ เศวตสุวรรณกุล นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชา ที่อำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือในด้านวัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย รวมถึงคำปรึกษาต่างๆ

ขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆและน้องๆทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยให้ความช่วยเหลือกันมาเสมอ และสุดท้ายขอขอบคุณบุคคลในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ รวมถึงเป็นแรงผลักดันที่สำคัญจนผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง รวมถึงให้การสนับสนุนช่วยเหลือจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

นาย ปพน กาญจนศิริพงศ์

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ ..... 1

1.ความเป็นมาของปัญหา ..... 1

2.วัตถุประสงค์ของการศึกษา ..... 4

3.สมมติฐานของการศึกษา ..... 4

4.ขอบเขตของการศึกษา ..... 5

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 6

1.ป่าชายเลนและแบคทีเรีย ..... 6

2. เอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม ..... 7

2.1 เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ..... 7

2.2 เอนไซม์ไลเปส (lipase) ..... 8

2.3 เอนไซม์โปรตีเอส (protease) ..... 9

3. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) ..... 11

3.1 Catalase test ..... 11

3.2 Oxidase test ..... 11

3.3 Decarboxylase test ..... 11

3.4 Oxidation-fermentation (OF) test ..... 12
3.5 Triple sugar iron (TSI) agar slant ..... 12
3.6 Urease test ..... 12
3.7 Citrate utilization test ..... 13
3.8 Methyl red test and Voges-Proskauer test (MR-VP test) ..... 13
3.9 Indole production test ..... 13
3.10 Carbohydrate fermentation test ..... 14
4. แอคติโนมัยซีท ..... 14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย ..... 16
1.อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ..... 16
2.สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ..... 18
3. วิธีการทดลอง ..... 20
3.1 การเก็บตัวอย่าง ..... 20
3.2 การสำรวจ Heterotrophic bacteria ด้วยอาหาร Nutrient agar + 1% NaCl (NA+1% NaCl) ..... 20
3.3 การสำรวจเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์โปรตีเอส ..... 21
3.3.1 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ..... 21
3.3.2 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส ..... 21
3.3.3 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ..... 22
3.4 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมี ..... 22
3.5 การสำรวจและแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทให้บริสุทธิ์ ..... 23
3.6 การสกัดดีเอนเอของเชื้อแอคติโนมัยซีท ..... 23
3.7 การระบุจำแนกเชื้อของแอคติโนมัยซีทโดยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ..... 24

บทที่ 4 ผลการทดลอง ..... 26
4.1 ตำแหน่งที่ตั้งและลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากป่าชายเลน ..... 26
4.1.1 ตำแหน่งที่ตั้ง ..... 26
4.1.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเค็ม (Salinity) และอุณหภูมิ (Temperature) ของตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอน ..... 29
4.2 ชนิดและปริมาณของ Heterotrophic bacteria บนอาหาร NA+ 1% NaCl ..... 30
4.3 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ..... 37
4.4 ชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส ..... 41
4.5 ชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ..... 50
4.6 ศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียในป่าชายเลนต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์โปรตีเอส ..... 60
4.7 การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ..... 65
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลทดลอง ..... 68
รายการอ้างอิง ..... 72
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) ..... 78
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี (Reagent) ..... 87
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลอง ..... 96
ประวัติผู้เขียน ..... 114

# สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลักษณะตัวอย่างและพิกัดที่ทำการเก็บตัวอย่าง ..... 27

ตารางที่ 2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเค็ม (Salinity) และอุณหภูมิ (Temperature) ของตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี 29

ตารางที่ 3 ปริมาณ Heterotrophic bacteria บนอาหาร NA + 1% NaCl ..... 30

ตารางที่ 4 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์ที่คัดแยกได้จากตำแหน่งต่างๆ ..... 38

ตารางที่ 5 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนในตำแหน่งที่ 4 และ amylolytic index ..... 38

ตารางที่ 6 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ที่คัดแยกได้จากตำแหน่งต่างๆ ..... 42

ตารางที่ 7 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนในตำแหน่งต่างๆและ lipolytic index ..... 43

ตารางที่ 8 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ที่คัดแยกได้จากตำแหน่งต่างๆ ..... 51

ตารางที่ 9 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนในตำแหน่งต่างๆและ proteolytic index ..... 52

ตารางที่ 10 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์สำคัญในอุตสาหกรรมที่พบในแต่ละตำแหน่ง ..... 64

ตารางที่ 11การจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยเปรียบเทียบความเหมือนของยีนส่วน 16S rRNA ในฐานข้อมูล BLAST database , EzBiocloud และ RDP classifier ..... 66

ตารางที่ 12 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA+1% NaCl ..... 96

ตารางที่ 13 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Starch agar+1% NaCl ..... 97

ตารางที่ 14 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหาร Starch agar+1% NaCl ..... 98

ตารางที่ 15 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl ..... 99

ตารางที่ 16 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl..... 100

ตารางที่ 17 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA+milk+1% NaCl ..... 101

ตารางที่ 18 จำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหาร NA+milk+1% NaCl ..... 102

ตารางที่ 19 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร ISP-2 +1% NaCl ..... 103

ตารางที่ 20 จำนวนโคโลนีเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP-2 +1% NaCl..... 104

ตารางที่ 21 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA+ 1% NaCl ในแต่ละตำแหน่ง ..... 105

ตารางที่ 22 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA+ 1% NaCl (ภาพรวมทั้งหมด) ..... 107

ตารางที่ 23 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar+1% NaCl (ภาพรวมทั้งหมด)..... 108

ตารางที่ 24 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA+milk agar+1% NaCl (ภาพรวมทั้งหมด) ..... 109

มหาวิทยาลัยศิลปากร

# สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (ที่มา : google map) ..... 28

ภาพที่ 2 แฟมิลี่และร้อยละของ Heterotrophic bacteria ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 32

ภาพที่ 3 จีนัสและร้อยละของ Heterotrophic bacteria ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 33

ภาพที่ 4 แฟมิลี่และร้อยละของ Heterotrophic bacteria ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 1 (B) ตำแหน่งที่ 2 (C) ตำแหน่งที่ 3 (D) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 35

ภาพที่ 5 จีนัสและร้อยละของ Heterotrophic bacteria ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 1 (B) ตำแหน่งที่ 2 (C) ตำแหน่งที่ 3 (D) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 36

ภาพที่ 6 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร Starch agar+1%NaCl โดยแบคทีเรียที่มีการผลิตและหลั่งเอนไซม์อะไมเลสออกมานอกเซลล์ จะเกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ..... 37

ภาพที่ 7 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร Starch agar+1% NaCl จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ในตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท) ... 40

ภาพที่ 8 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร Starch agar+1% NaCl จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ในตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 40

ภาพที่ 9 เชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร Tween80 agar+1% NaCl โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตและหลั่งเอนไซม์ไลเปส จะมีตะกอนขาวขุ่นล้อมรอบโคโลนี (precipitation zone) ..... 41

ภาพที่ 10 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลน คลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 45

ภาพที่ 11 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลน คลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 46

ภาพที่ 12 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลน คลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 2 (B) ตำแหน่งที่ 3 (C) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 48

ภาพที่ 13 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลน คลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 2 (B) ตำแหน่งที่ 3 (C) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 49

ภาพที่ 14 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร NA+milk+1% NaCl โดยเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตและหลั่งเอนไซม์โปรตีเอสออกมานอกเซลล์ จะเกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ..... 50

ภาพที่ 15 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร NA+milk+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลน คลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 55

ภาพที่ 16 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร NA+milk+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลน คลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 56

ภาพที่ 17 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร NA+milk +1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลน คลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 2 (B) ตำแหน่งที่ 3 (C) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 58

ภาพที่ 18 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร NA+milk +1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 2 (B) ตำแหน่งที่ 3 (C) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท) ..... 59

ภาพที่ 19 ร้อยละของไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ..... 61

ภาพที่ 20 ร้อยละของไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส ..... 61

ภาพที่ 21 ร้อยละของไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ..... 62

ภาพที่ 22 ร้อยละของไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์สำคัญในอุตสาหกรรม ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอน ..... 62

ภาพที่ 23 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีการสร้าง aerial mycelium บนอาหาร ISP-2 +1% NaCl อายุ 7 วัน ที่แยกได้จากน้ำและดินตัวอย่างบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยแสดงลักษณะโคโลนีของ (A) *Streptomyces platensis* (B) *Micromonospora* sp. A38 (C) *Streptomyces* sp. NA03103 (d) *Bacillus velezensis* strain KKLW ..... 67

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.ความเป็นมาของปัญหา

ป่าชายเลนธรรมชาติพบได้ตามแนวชายฝั่งเขตร้อนหรือเขตกึ่งร้อนของโลก (Liang et al., 2007) เป็นระบบนิเวศที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิตโดยป่าทำหน้าที่เป็น แหล่งพักพิงอาศัย แหล่งอาหาร รวมถึงเป็นแหล่งเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ นับว่าเป็นระบบนิเวศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ มีมวลชีวภาพสูงโดยมีปริมาณสารอินทรีย์เป็นจำนวนมากในรูปของเศษซากและสิ่งมีชีวิต ก่อให้เกิดการหมุนเวียนแร่ธาตุ สิ่งที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดคือ แบคทีเรีย ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ (Klingfoong et al., 2022) ดังนั้นป่าชายเลนจึงถูกมองว่าเป็นแหล่งธรรมชาติสำคัญในการค้นพบแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น เอนไซม์อะไมเลสที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหาร การผลิตสิ่งทอ เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เครื่องหนัง เครื่องสำอาง (Gupta et al., 2003) และเอนไซม์โปรตีเอสในอุตสาหกรรมยาและกระบวนการการบำบัดทางชีวภาพ (Naidu, 2011) ความหลากหลายของระบบนิเวศในป่าชายเลนมีอิทธิพลต่อการค้นพบแอคติโนมัยซีทที่มีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต่างๆ เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในปัจจุบัน ซึ่งเป็นปัญหาที่ระบาดไปทั่วโลกเนื่องจากว่ายังไม่สามารถหายาหรือการรักษาใหม่ๆได้ (Sangkanu et al., 2017) ดังนั้นการค้นพบแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ใหม่ๆหรือมีความสามารถที่หลากหลายมากขึ้นในป่าชายเลนจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ

ป่าชายเลนนอกจากจะเป็นแหล่งที่พักอาศัย แหล่งอาหาร และแหล่งเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ ยังเป็นแนวป้องกันการกัดเซาะชายฝั่งทะเลที่เกิดจากลมฟ้าอากาศ และยังเป็นแหล่งผลิตเชื้อเพลิงเนื่องจากต้นไม้ในป่าโกงกางปลูกง่ายและโตเร็วจึงเหมาะแก่การนำมาผลิตถ่านไม้ และยังเป็นแหล่งที่พบสิ่งมีชีวิตใหม่ๆอีกด้วย แต่ในปัจจุบัน ป่าชายเลนมีสภาพที่เสื่อมโทรมมากขึ้น โดยมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น การเปลี่ยนแปลงผังเมืองเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของประชากร การสร้างท่าเทียบเรือใน

อุตสาหกรรม การทำเกษตรกรรมและการเพาะเลี้ยงสัตว์ที่มีการทิ้งน้ำเสียสู่สิ่งแวดล้อม และการท่องเที่ยวเช่นร้านอาหารและที่พักอาศัยที่ก่อให้เกิดมลพิษได้

โครงการเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก หรือ Eastern Economic Corridor (EEC) มีจุดมุ่งหมายในการขับเคลื่อนการลงทุนครั้งใหญ่ของประเทศซึ่งเป็นจุดเปลี่ยนแปลงสำคัญที่ส่งผลให้เศรษฐกิจและภาคอุตสาหกรรมไทยสามารถเติบโตได้อย่างก้าวกระโดด ครอบคลุมพื้นที่ 3 จังหวัดในภาคตะวันออกของไทย ได้แก่ ระยอง ชลบุรี และฉะเชิงเทรา โดยหนึ่งในอุตสาหกรรมเป้าหมายคือการท่องเที่ยว อาทิเช่น พัทยา ซึ่งเป็นเมืองท่องเที่ยวหลักที่เป็นเมืองท่องเที่ยวระดับโลกและเป็นเสมือนแม่เหล็กดึงดูดด้านการท่องเที่ยว เพื่อยกระดับการท่องเที่ยวรวมไปถึงการพัฒนาคุณภาพของแหล่งท่องเที่ยวอื่นๆที่อยู่บริเวณรอบพัทยา ทั้งชายหาด เกาะต่างๆและป่าชายเลนให้อยู่ในสภาพที่ดี โดยสำหรับกิจกรรมกลุ่มเป้าหมายความสนใจพิเศษในแหล่งท่องเที่ยวเขตพัทยานั้นคือ กิจกรรมประเภท soft adventure และ eco-tourism เช่น การดำน้ำดูปลาในเขตน้ำลึกน้ำตื้น การปั่นจักรยานชมธรรมชาติ และการปลูกป่าชายเลน เป็นต้น (สำนักงานคณะกรรมการนโยบายเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก (2019) ; https://www.eeco.or.th/th/government-initiative )

ป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ตั้งอยู่ในพื้นที่ของหน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง เป็นป่าพื้นที่ขนาดเล็ก มีต้นไม้หลากหลายชนิด ต้นไม้มีขนาดกลาง น้ำชุ่ม มีคลองไหลผ่าน และมีขยะเล็กน้อยที่เกิดจากการพัดพาของกระแสน้ำบริเวณใกล้เคียงมีบ้านพักข้าราชการ สนามกอล์ฟ บ้านพักตากอากาศและร้านอาหาร มีกิจกรรมท่องเที่ยวเชิงธรรมชาติคือ การปลูกป่าชายเลน นอกจากนี้ยังอยู่ห่างจากพัทยาเพียง 36 กิโลเมตร ซึ่งอาจได้รับผลกระทบด้านมลพิษจากการท่องเที่ยวเขตพัทยา แต่ด้วยลักษณะองค์ประกอบทางธรรมชาติเช่น พันธุ์ไม้ที่หลากหลายชนิด กิจกรรมการปลูกป่าชายเลน ที่ดูเหมือนว่าป่าชายเลนแห่งนี้ยังมีสภาพแวดล้อมที่บริสุทธิ์ ปราศจากการปนเปื้อนมลพิษต่างๆ และยังไม่มีข้อมูลการสำรวจมาก่อนจึงมีความน่าสนใจในการสำรวจ
(ดินแดนท่องเที่ยวถิ่นทหารเรือ (2020) ; http://www.thainavyland.com/mangrove-forest-park01/)

งานวิจัยนี้มีความสนใจในการสำรวจ Heterotrophic bacteria ที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์โปรตีเอส และชนิดของแอคติโนมัยซีทในตัวอย่างน้ำและดินตะกอน

บริเวณป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เนื่องจากป่าชายเลนแห่งนี้ยังไม่มีการสำรวจมาก่อน มีกิจกรรมท่องเที่ยวเชิงธรรมชาติ เช่น ปลูกป่าชายเลนและไม่มีกิจกรรมอื่นๆ ที่กระทบต่อสภาพแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นพื้นที่ที่ตั้งอยู่ในส่วนหนึ่งของโครงการเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก (EEC) ซึ่งมีเป้าหมายในการยกระดับการท่องเที่ยวในพื้นที่ 3 จังหวัด ซึ่งอยู่ใกล้กับพื้นที่ที่เป็นสถานที่ท่องเที่ยวชื่อดังอย่างพัทยา ที่อาจได้รับผลกระทบด้านมลพิษจากการท่องเที่ยว โดยการรวบรวมข้อมูลนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาพื้นที่ป่าชายเลนและส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเศรษฐกิจการท่องเที่ยวเชิงธรรมชาติซึ่งนำไปพัฒนาให้เกิดประโยชน์สูงสุดโดยไม่ให้ส่งผลเสียต่อระบบนิเวศ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

**2.วัตถุประสงค์ของการศึกษา**

1. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของ heterotrophic bacteria ที่แยกได้จากน้ำและดินตะกอนจากป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

2. เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์โปรตีเอสของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำและดินตะกอนจากป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

3. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากน้ำและดินตะกอนจากป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

4. เพื่อใช้ผลการสำรวจเป็นตัวบ่งชี้หรือวิเคราะห์สถานะของป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เพื่อยกระดับการท่องเที่ยวในพื้นที่ 3 จังหวัด ตามแผนโครงการเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก (EEC) เนื่องจากอยู่ใกล้พัทยา ซึ่งอาจได้รับผลกระทบด้านมลพิษจากกิจกรรมการท่องเที่ยว

**3.สมมติฐานของการศึกษา**

1. มีความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในน้ำและดินตะกอนจากป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

2. แบคทีเรียในน้ำและดินตะกอนจากป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรีมีกิจกรรมการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์โปรตีเอส

3. มีความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทในน้ำและดินตะกอนจากป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

4. ป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรีไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต

**4.ขอบเขตของการศึกษา**

1. ตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียและเชื้อแอคติโนมัยซีทในน้ำและดินตะกอนตัวอย่างด้วยวิธี total plate count (CFU/ml)

2. แยกเชื้อแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีทให้บริสุทธิ์

3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีทที่แยกได้

4. ศึกษากิจกรรมการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์โปรตีเอสของแบคทีเรียที่แยกได้

5. จำแนกและยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Biochemical test ตาม Bergey's manual

6. จำแนกและยืนยันชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

มหาวิทยาลัยศิลปากร

# บทที่ 2
# งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 1.ป่าชายเลนและแบคทีเรีย

ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่ประกอบด้วยชีวะนิเวศชายฝั่งที่มีตำแหน่งของป่าอยู่บริเวณรอยต่อระหว่างแผ่นดินกับทะเล พบได้ตามแนวชายฝั่งเขตร้อนหรือเขตกึ่งร้อนครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 60-75% ของโลก (Liang et al., 2007) เป็นพื้นที่ชุ่มน้ำที่มีน้ำขึ้นน้ำลงเป็นลักษณะเฉพาะ (Dias et al., 2010) ส่วนใหญ่พบในเขตปากน้ำ น้ำนิ่ง สันดอน ทะเลสาบ บึงหรือพื้นที่โคลน (Sahoo and Dhal, 2009) ป่าชายเลนยังถือเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพทำหน้าที่เป็นแนวป้องกันการกัดเซาะตามแนวชายฝั่งทะเล แหล่งที่พักอาศัย แหล่งอาหาร แหล่งเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ แหล่งพืชทนเกลือ และมีปริมาณเศษซากพืชซากสัตว์สูง ส่งผลให้มีมวลชีวภาพสูงทั้งในน้ำและดินตะกอน โดยสิ่งที่มีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนแร่ธาตุและสารอาหาร คือจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรียซึ่งมีความหลากหลายของกิจกรรมเกี่ยวกับเมทาบอลิคเอนไซม์ (Klingfoong et al., 2022) ป่าชายเลนมีลักษณะเฉพาะคือน้ำขึ้นน้ำลงต่างจากระบบนิเวศอื่น ทำให้ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเช่น ความเค็มหรือสารอาหารมีความแปรผันสูงทำให้แบคทีเรียมีการปรับตัวหรือวิวัฒนาการตามที่อยู่อาศัยและสภาพแวดล้อม (Dias et al., 2010) ส่งผลให้เป็นระบบนิเวศที่ให้ผลผลิตสูงและเป็นแหล่งที่มีศักยภาพที่ดีในการค้นพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีศักยภาพสูง ทั้งนี้มีงานวิจัยหลายฉบับทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียในป่าชายเลนจากประเทศต่างๆ อาทิเช่น งานวิจัยของ Ramsay et al. (2000) ศึกษาแบคทีเรียในดินป่าโกงกาง บริเวณท่าเรือ Gladstone ประเทศออสเตรเลีย พบ heterotrophic bacteria อยู่ในช่วง$10^5$ -$10^6$ cell / g ดินตะกอน โดยกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Aeromonas, Alcaligenes, Alteromonas, Micrococcus, Moraxella, Pseudomonas, Photobacterium, Serratia, Shewanella* และ *Vibrio* งานวิจัยของ Liang et al. (2007) ทำการสำรวจแบคทีเรียในดินตะกอนป่าชายเลนบริเวณ Futian National Nature Reverse Of Shenzhen Special Economic Zone ในประเทศจีนพบกลุ่มเชื้อ *Proteobacteria* (67%) ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มเชื้อ *Gammaproteobacteria* (29%) รองลงมาคือ *Epsilonproteobacteria* (16%) และ*Deltaproteobacteria* (8%) นอกจากนี้ยังพบ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* group (9%), *Actinobacteria* (6%), *Chloroflexi* (5%), *Firmicutes* (4%),

*Fusobacteria* (1%) และ *Chlamydiae/Verrucomicrobia* group, *Fibrobacteres/Acidobacteria* group และ *Planctomycetes* (แต่ละกลุ่ม < 1%) งานวิจัยของ Dias et al. (2010) ได้ทำการสำรวจแบคทีเรียที่ป่าชายแลน Ilha do Cardosa ประเทศบราซิล โดยพบกลุ่มเชื้อ *Alphaproteobactria* (40.36%), *Gammaproteobacteria* (19.28%) และ *Acidobacteria* (27.72%) และกลุ่มเชื้อที่พบรองลงมาเป็นกลุ่มเชื้อ *Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria* และ *Bacteroidetes* งานวิจัยของ Castro et al. (2014) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากป่าโกงกางในเขต Bertioga และ เขต Cananeia ของประเทศบราซิล โดยป่าในเขต Cananeia พบกลุ่มเชื้อที่มากที่สุดคือ *Bacillus* (42.1%) รองลงมาคือ *Enterobacter* (10.5%), *Chryseobacterium* (10.5%), *Xanthomonas* (10.5%) และอื่นๆ ในขณะที่ป่าในเขต Bertioga พบกลุ่มเชื้อที่แตกต่างคือ *Bacillus* (28.6%), *Curtobacterium* (14.3%), *Alcaligenes* (14.3%), *Ochrobactrum* (9.5%), *Novosphingobium* (9.5%) จากงานวิจัยที่ได้กล่าวไปข้างต้น จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียมีการเจริญอยู่ในป่าชายเลน มีความหลากหลายสูงมาก

**2. เอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม**

**2.1 เอนไซม์อะไมเลส (amylase)**

เอนไซม์อะไมเลส จัดอยู่ในกลุ่มประเภทเอนไซม์ไฮโดรไลท์ (hydrolytic enzyme) ที่ย่อยพันธะไกลโคซิดิค (glycosidic bond) ในแป้ง ไกลโคเจนหรือโพลีแซคคาไรด์ (โมเลกุลใหญ่) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส หรือเดกตริน (Klingfoong et al., 2022) ในปัจจุบันเอนไซม์อะไมเลสนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งในเรื่องของเทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวกับอุตสาหกรรมด้านอาหาร การหมัก สิ่งทอรวมไปถึงกระดาษ ถึงแม้ว่าการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะพบได้ใน พืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ แต่เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ตอบสนองความต้องการทางอุตสาหกรรมได้ดี (Gupta et al., 2003) เนื่องจากมีกระบวนการผลิตที่ง่าย มีประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ดี (My et al., 2021) ทั้งนี้สามารถจำแนกเอนไซม์ได้เป็น 3 ประเภท

1.แอลฟา-อะไมเลส เป็นเอนไซม์สลาย glycoside-bond ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลแป้งและไกลโคเจนที่ตำแหน่ง 1-4 แบบสุ่มได้เป็นน้ำตาล เช่น มอลโทสและกลูโคสอย่างรวดเร็ว

2.บีตา-อะไมเลส เป็นเอนไซม์สลายแป้งที่ตำแหน่ง แอลฟา1-4 ของ glycoside-bond ที่เฉพาะส่วนปลายด้านที่เป็น non reducing end เข้ามาทีละ 2 หน่วย ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส

3.แกมมา-อะไมเลส หรือ อะมิโนกลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโมเลกุลแป้งได้ทั้งที่ตำแหน่ง glycoside-bond ตำแหน่งแอลฟา 1-4 และ แอลฟา 1-6 จึงสามารถย่อยโมเลกุลของอะไมโลเพคตินซึ่งมีสายแขนง โดยจะย่อยสลายส่วนปลาย non reducing end เข้ามาทีละ 1 หน่วยได้น้ำตาลกลูโคส (Singh et al., 2011)

มีงานวิจัยหลายฉบับสำรวจพบแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น งานวิจัยของ My et al. (2021) ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากป่าชายเลน Can Gio ประเทศเวียดนาม พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อกลุ่ม *Bacillus* ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี เมื่อศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ระบุได้ว่าเป็น *Bacillus amyloliquefaciens* (ความคล้ายคลึงกัน 100%) เมื่อนำไปบ่มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มีกิจกรรมอะไมเลสสูงที่สุด คือ1,279 IU/ml (174.7 IU/ml) งานวิจัยของ Mamangkey et al. (2021) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากป่าชายเลนทางตอนเหนือของเกาะสุมาตรา ประเทศอินโดนีเซีย และพบว่า 17 ไอโซเลท จากทั้งหมด 35 ไอโซเลท ที่สามารถสร้าง แอลฟา-อะไมเลส ได้สูงภายใน 24 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียที่เหลือ 18 ไอโซเลท สามารถสร้างได้ภายใน 27 ชั่วโมง และ 31 ไอโซเลท จาก 35 ไอโซเลทสามารถสร้าง บีตา-อะไมเลส ได้สูงภายใน 24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่เหลืออีก 4 ไอโซเลท สามารถสร้างได้ภายใน 27 ชั่วโมง งานวิจัยของ Kanimozhi et al. (2014) ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากป่าชายเลน Muthupettai เมือง TamiNadu ประเทศอินเดีย โดยเมื่อทำการทดสอบเบื้องต้นพบแบคทีเรีย 4 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ซึ่งพบผลการจำแนกชนิดพบว่าเป็นของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus*

**2.2 เอนไซม์ไลเปส (lipase)**

เอนไซม์ไลเปส หรืออีกชื่อหนึ่งคือ triacylglycerol acylhydrolase ซึ่งจะเข้าไปสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bond) (Chandra et al., 2020) ในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ให้กลายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยา hydrolysis (ปฏิกิริยาที่มีน้ำเข้าไปสลายพันธะ) และ transesterification (การเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์) ของกลุ่มเอสเทอร์อื่นๆ ตลอดจนการ

สังเคราะห์เอสเทอร์และคุณสมบัติต่างๆที่สามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีได้เฉพาะเจาะจงมากขึ้น (biotransformation) ทำให้เอนไซม์ไลเปสเป็นที่นิยมอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก เครื่องหนัง เครื่องสำอาง การสังเคราะห์สารอินทรีย์ และเภสัชกรรม (Treichel et al., 2010) เอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ใน สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ แต่เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียมีความสำคัญในเชิงพาณิชย์มากกว่าแหล่งอื่นๆ เนื่องจากความสะดวกและง่ายต่อการเพาะเลี้ยง รวมไปถึงการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงที่สุด (Bharathi et al., 2019) กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น *Bacillus, Pseudomas* และ *Burkholderia* เป็นต้น (Gupta et al., 2004)

ทั้งนี้มีงานวิจัยหลายฉบับสำรวจพบแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพสูงเช่น จากงานวิจัยของ Ghanem et al. (2000) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากป่าชายเลนบริเวณอ่าว Tubil ประเทศบาห์เรน ผลการศึกษาพบว่า ไอโซเลท B-M20 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อนและความเป็นด่างได้ดี ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียพบว่าเป็นแบคทีเรียอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* งานวิจัย Thangaraj et al. (2018) ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากป่าชายเลนบริเวณปากแม่น้ำ Vellar ประเทศอินเดีย พบเชื้อ *Pseudomonas* sp. AA1 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยมีค่า pH และค่าความเค็มที่เหมาะสมอยู่ที่ 7 และ 5% ตามลำดับ

**2.3 เอนไซม์โปรตีเอส (protease)**

เอนไซม์โปรตีเอส จัดเป็นเอนไซม์ประเภท ไฮโดรเลส (Hydrolase) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปบไทด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโน (Naidu, 2011) เอนไซม์โปรตีเอสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เอ็กโซเปบตีเดส (exopeptidases) และ เอนโดเปบตีเดส (endopeptidase) (Mamo and Assefa, 2018) เอนไซม์โปรตีเอสเป็นส่วนประกอบสำคัญของสิ่งมีชีวิตบนโลกไม่ว่าจะเป็นคน สัตว์หรือจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ที่มีการใช้งานมากในอุตสาหกรรม เช่น ผงซักฟอก เครื่องหนัง อาหาร ยา และกระบวนการบำบัดทางชีวภาพ (Bioremediation) (Naidu, 2011) เนื่องจากให้ผลผลิตสูง ใช้เวลาและพื้นที่ในการผลิตน้อย รวมไปถึงการดัดแปลงพันธุ์กรรมและประหยัดต้นทุน (Razzaq et al., 2019)

ทั้งนี้มีงานวิจัยหลายฉบับสำรวจพบแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่มีประสิทธิภาพสูงเช่น งานวิจัยของ Foophow and Tangjitaroenkun (2014) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้จากป่าชายเลนสถานีพัฒนาทรัพยาการป่าชายเลนที่ 2 ท่าสน จังหวัดจันทบุรี ซึ่งพบแบคทีเรีย 23 ไอโซเลทที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหาร skimmed milk agar (SKA) ที่เติม 3%(w/v) NaCl เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA พบว่ามี 22 ไอโซเลทมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus* sp. และอีก 1 ไอโซเลท มีความใกล้เคียงกับ *Rhodococcus* sp. เชื้อ 5 ไอโซเลทได้แก่ TS13, TS26, TS33, TS35 และ TS42 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสูง เมื่อพิจารณาจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone ที่มีขนาดมากกว่า 10 mm. โดยที่ TS13,TS33, TS35 และ TS42 มีความคล้ายคลึงกันอย่างใกล้ชิดกับเชื้อ *B. aquimaris* strain TF-12 (99.05-99.49%) และ TS26 มีความคล้ายคลึงกันอย่างใกล้ชิดกับเชื้อ *B. aryabhattai* strain B8W22 (100%) งานวิจัยของ Castro et al. (2014) ทำการศึกษาเชื้อแบคทีเรียจากป่าโกงกาง 2 แหล่งอยู่ในเขต Bertioga และ เขต Cananeia ประเทศบราซิล พบเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสถึง 75% ของเชื้อที่ทำการคัดแยกได้ (n=40) นอกจากนี้ Venugopal and Saramma (2006) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากป่าชายเลน Cochin ประเทศอินเดีย คือ *Vibrio fluvialis* หลังจากทำให้เอนไซม์โปรตีเอสมีความบริสุทธิ์แล้วทดสอบ casein zymography พบว่าสามารถปรับปรุงและพัฒนาเอนไซม์โปรตีเอสนี้ในการใช้เป็น additive ในผงซักฟอกได้ ในปีถัดมา Venugopal and Saramma (2007) สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากป่าชายเลนเดิมคือป่าชายเลน Cochin ประเทศอินเดีย ที่มีประสิทธิภาพอีก 1 ไอโซเลทคือ *Bacillus circulans* BM15 หลังจากทำให้เอนไซม์โปรตีเอสมีความบริสุทธิ์แล้วนำไปทดสอบ casein zymography พบว่าสามารถปรับปรุงและพัฒนาเอนไซม์โปรตีเอสนี้ในการใช้เป็น additiveในผงซักฟอกได้

**3. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)**

กิจกรรมเมทาบอลิกของจุลินทรีย์เกิดจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ชนิดต่างๆอย่างมีระบบ ซึ่งเชื้อแต่ละกลุ่มจะมีเอกลักษณ์ที่แตกต่างกันไปทำให้สามารถใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อได้

**3.1 Catalase test**

เป็นการตรวจหาเอนไซม์ย่อยสลาย hydrogen peroxide ($H_2O_2$) พบได้ใน aerobic bacteria และ facultative anaerobe ทำการทดสอบสอบโดยหยด 3-10% (v/v) $H_2O_2$ ลงบนแผ่นสไลด์แล้วป้ายด้วยเชื้อบริสุทธิ์ หากเกิดฟองฟู่ให้บันทึกผลเป็น บวก หากไม่เกิดให้บันทึกผลเป็น ลบ

**3.2 Oxidase test**

เป็นการตรวจหา cytochrome c oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน cytochrome oxidase system เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ reduced cytochrome ได้เป็น oxidized cytochrome พบได้ใน strict aerobe และ facultative anaerobe ทำการทดสอบโดยหยด oxidase reagent ลงบนกระดาษกรองแล้วป้ายด้วยเชื้อบริสุทธิ์ หากเกิดสีม่วงและค่อยๆเข้มขึ้นจนเป็นสีดำภายใน 5-10 วินาที ให้บันทึกผลเป็น บวก หากมองเห็นเป็นสีชมพู-ม่วงของน้ำยาให้บันทึกผลเป็น ลบ

**3.3 Decarboxylase test**

เป็นการตรวจหา amino enzyme แต่ละชนิดที่ต้องการตรวจสอบซึ่งแบคทีเรียสามารถสลายกรดอะมิโนได้ เอมีนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาหารที่ใช้ทดสอบคือ Moeller decarboxylase medium เป็นแหล่งอาหารที่มีอะมิโนที่ต้องการทดสอบ (lysine, ornithine หรือ arginine) เป็นองค์ประกอบ และมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังมี bromocresol purple เป็น pH indicator ในช่วงแรกเชื้อแบคทีเรียจะหมักกลูโคสได้กรด ทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลือง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะกับการทำงานของ decarboxylase ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถสลายกรดอะมิโนได้เอมีน (เบส) จะทำให้อาหารกลับมาเป็นสีม่วงอีกครั้ง แต่ถ้าไม่สามารถสลายกรดอะมิโนได้ อาหารจะยังคงสีเหลือง ทำการทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร Moellor decarboxylase medium ที่ปิดทับผิวหน้าด้วย mineral oil ถ้าสีอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง แล้วเปลี่ยนกลับมาเป็นสีม่วงอีกครั้ง ให้บันทึกผลเป็น บวก ถ้าสีอาหารยังเป็นสีเหลืองให้บันทึกผลเป็น ลบ

**3.4 Oxidation-fermentation (OF) test**

เป็นการตรวจดูความสามารถการใช้น้ำตาล glucose เพื่อแยกความแตกต่างของการสังเคราะห์พลังงานจากน้ำตาล glucose โดยกระบวนการ fermentation ของแบคทีเรียสามารถเกิดขึ้นได้ 2 ทาง คือ 1.ผ่านทาง Embden-Meyerhof pathway และ 2.pentose phosphate pathway ร่วมกับ Embden-Meyerhof pathway ส่วน oxidation ซึ่งจะใช้ ออกซิเจน (aerobic) หรือสารประกอบอนินทรีย์ (anaerobic) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย จึงมีกรดเกิดขึ้นน้อยกว่าการหมัก ทำการทดสอบโดยการ stab เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงในอาหาร OF medium 2 หลอด โดยปิดผิวหน้าด้วย mineral oil 1 หลอด เพื่อทดสอบการ fermentation และอีก 1 หลอด เพื่อทดสอบการ oxidation (ไม่ปิดทับด้วย mineral oil) หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองให้บันทึกผลเป็น A อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินให้บันทึกผลเป็น ลบ หากเกิดแก๊สให้บันทึกผลเป็น G

**3.5 Triple sugar iron (TSI) agar slant**

เป็นการตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลของเชื้อแบคทีเรีย โดยมีน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและมี sodium thiosulfate เป็นแหล่งกำมะถัน นอกจากนี้ยังมี phenol red เป็น pH indicator และมี ferrous sulfate เป็น $H_2S$ indicator ทำการทดลองโดยการ stab และ streak เชื้อบริสุทธิ์ลงบน TSI slant การบันทึกผลจะแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ slant/bottom โดยถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลืองให้บันทึกผลเป็น A ถ้าเกิดรอยแตกของวุ้นที่เกิดจากการหมักแก๊สให้บันทึกผลเป็น G ถ้าเกิด$H_2S$ (สีดำ) ให้บันทึกผล$H_2S$ หากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้บันทึกผลเป็น Alk

**3.6 Urease test**

Urease เป็น inducible enzyme ที่ต้องการ urea เป็นตัวชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน ซึ่งทำหน้าที่เร่งการสลาย urea เป็น ammonia และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ทำการทดสอบโดย streak เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงบน Christensen urea agar slant ถ้ามีการสังเคราะห์ urease จะเกิดเบสจากการสลาย urea หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูให้บันทึกผลเป็น บวก แต่ถ้าหากไม่มีการสังเคราะห์ urease จะเกิดกรดจากการหมัก glucose ทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองให้บันทึกผลเป็น ลบ

**3.7 Citrate utilization test**

การทดสอบนี้จะใช้อาหาร Simmon citrate agar ในการทดสอบโดยเป็นอาหารที่มี citrate เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน และมีเกลือแอมโมเนียม ($NH_4^+$) เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน และยังมี bromthymol blue เป็น pH indicator เนื่องจากอาหารชนิดนี้ไม่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดอื่น ดังนั้นถ้าแบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลาย citrate ได้ก็จะไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ได้ ทำการทดสอบโดยการ streak เชื้อบริสุทธิ์ลงบน Simmon citrate agar slant ถ้าแบคทีเรียสามารถใช้ citrate ได้ย่อมใช้เกลือแอมโมเนียมแล้วเกิดเป็น ammonia ($NH_3$) ได้ อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินให้บันทึกเป็น บวก ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสีหรือยังคงเป็นสีเขียวให้บันทึกผลเป็น ลบ

**3.8 Methyl red test and Voges-Proskauer test (MR-VP test)**

การทดสอบ MR test เป็นการทดสอบการหมักแบบ mixed acid fermentation ส่วนการทดสอบ VP test เป็นการทดสอบการหมักแบบ butanediol fermentation ซึ่งจะมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นมากกว่าในการหมักแบบ mixed acid fermentation และยังสามารถตรวจพบ acetoin และ butanediol ได้ ทำการทดสอบ MR test โดยการแบ่ง culture broth มาหยดด้วย methyl red ถ้า pH ของอาหาร <4.5 methyl red จะเปลี่ยนเป็นสีแดงให้บันทึกผลเป็น บวก ถ้า pH ของอาหาร >4.5 methyl red จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองให้บันทึกผลเป็น ลบ ส่วนการทดสอบ VP test ทำโดยการแบ่ง culture broth มาหยดด้วย 40%(w/v) KOH และ 1-naphthol โดย acetoin และ butanediol จะเปลี่ยนเป็น diacetyl แล้วรวมตัวกับ quinidine ใน peptone เกิดเป็นสารประกอบสีชมพู-แดง ภายในเวลา 15-30 นาที ให้บันทึกผลเป็น บวก หากการทดสอบใน 2 วันแรกไม่เกิดอะไรให้บ่ม culture broth ต่ออีกจนครบ 5 วันแล้วนำมาทดสอบซ้ำ หากยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บันทึกผลเป็น ลบ

**3.9 Indole production test**

นอกจากคาร์โบไฮเดรตแล้วแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถใช้กรดอะมิโน tryptophan โดย tryptophanase ซึ่งจะเปลี่ยน tryptophan ไปเป็น แอมโมเนีย และ indole pyruvic acid ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น indole และ pyruvic acid สะสมอยู่ในอาหาร ทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี peptone หรือ tryptone แล้วหยด Kovacs indole reagent ซึ่งมี p-

dimethylaminobenzaldehyde ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ indole เกิดเป็นวงแหวนสารประกอบสีม่วง-แดงให้บันทึกผลเป็น บวก หากไม่มี indole จะเกิดสีเหลืองของน้ำยาให้บันทึกผลเป็น ลบ

**3.10 Carbohydrate fermentation test**

กระบวนการหมัก (fermentation) จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไร้ออกซิเจน โดยใช้ตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งยังคงมีพลังงานเคมีในโมเลกุลอยู่สูง การหมักน้ำตาลกลูโคส จะได้ pyruvic acid ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ที่สำคัญในการสังเคราะห์สารอื่นๆ โดย pyruvic acid จะถูกสลายต่อไปเป็น organic acid, alcohol, $H_2$ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ pH ของอาหารลดลง แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน การสังเคราะห์พลังงานจาก pyruvic acid จะเกิดขึ้นผ่านทาง TCA cycle และ electron transport chain เกิดเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เป็นผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้าย จึงช่วยลดความเป็นกรดของอาหารลง (pH สูงขึ้น) ทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์โบไฮเดรต และ pH indicator ส่วนการตรวจหาแก๊สจะใช้หลอดแก้วเล็กๆ (durham tube) คว่ำลงในหลอดอาหารเพื่อใช้ดักแก๊ส หากอาหารเหลวเปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลืองให้บันทึกผลเป็น บวก หากไม่เปลี่ยนแปลงให้บันทึกผลเป็น ลบ

**4. แอคติโนมัยซีท**

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม โปรคาริโอต (prokaryotes) ลักษณะสัณฐานคือ มีเส้นใยคล้ายรา (hypha) พบได้ในดินและมีบทบาทในการย่อยสลายเนื้อเยื่อพืช (saprophytes) (Taechowisan et al., 2003) แอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือยาปฏิชีวนะใหม่ๆที่สำคัญในกลุ่ม β-lactams, tetracyclines, rifamycins, aminoglycoside, macrolides และ glycopeptides (Genilloud, 2017) ในปัจจุบันพบการติดเชื้อแบคที่เรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ในปัจจุบันในผู้ป่วยเป็นจำนวนมากจนกลายเป็นปัญหาการรักษาพยาบาลทั่วโลก ยาปฏิชีวนะใหม่ๆ จึงมีความจำเป็นสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแทนยาปฏิชีวนะเก่าที่ไม่สามารถใช้ในการรักษาได้ (Sangkanu et al., 2017) แอคติโนมัยซีทโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มจีนัส *Streptomyces* สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับใช้ในทางการแพทย์ เกษตรกรรม และสัตว์

แพทย์ มีสารหลายตัวที่มีการพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในการรักษา เช่น amphotericin, daptomycin, doxorubicin, rapamycin และ vancomycin (Bae et al., 2013) ป่าชายเลนจัดเป็นแหล่งธรรมชาติที่น่าสนใจสำหรับการค้นพบสารทุติยภูมิใหม่ๆจากแอคติโนมัยซีท (Sangkanu et al., 2017) เนื่องจากมีงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานการพบเชื้อแอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลนที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิเช่น งานวิจัยของ Hong et al. (2009) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลน 8 แห่งในประเทศจีนซึ่งสามารถแยกได้กว่า 2,000 ไอโซเลท ผลการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า 5,10 และ 20 % ของเชื้อที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albican* (เชื้อราในช่องคลอด) , *Staphylococcus aureus* (สาเหตุเชื้อแบคทีเรีย โรคติดเชื้อบนผิวหนัง) และ Human Colon Tumor 116 cells ตามลำดับ งานวิจัยของ Das et al. (2014) ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลน Valapattanam เมือง Kerala ประเทศอินเดีย ทำการแยกแอคติโนมัยซีทได้ 25 ไอโซเลท ผลการศึกษาการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าไอโซเลท หมายเลข I-1 สามารถยับยั้งการเจริญของกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus*, *S. citreus*, *Bacillus cereus* และ *Serratia marcescens* และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp., *Candida clbicans*, *C. parapsilosis*, และ *Cryptococcus neoformans* การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสจากยีน 16S rRNA พบว่า ไอโซเลท I-1 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces xiamensis* งานวิจัยของ Sangkanu et al. (2017) ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลนในสวนประวัติศาสตร์พลเอกเปรม ติณสูลานนท์ จังหวัดสงขลา พบว่าเชื้อแอคติมัยซีท 16 ไอโซเลทจาก 118 ไอโซเลท (13.6%) มีการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านต่อแบคทีเรียอย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์ โดยสารสกัด 5 ชนิดจาก ไอโซเลท AMA11, AMA12 และ AMA21 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแบบ broad spectrum ต่อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 35984, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) SK1, *Acinetobacter baumannii* NPRC004 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ผลการศึกษาลำดับเบสจากยีน 16S rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptomyces* จากงานวิจัยของ Srivibool et al. (2010) ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย โดยแยก CH54-4 ได้ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์อย่างมากในการต่อต้านเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยค่า IC50 ที่ 2.91 μg/ml ผลการศึกษาลำดับเบสจากยีน 16S rRNA มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces thermocarboxydus*

# บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 1.อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

| อุปกรณ์ | บริษัทผู้ผลิต(model) |
|---|---|
| 1.1 กล้องจุลทรรศน์ | Olympus (CX23LEDRFS1) |
| 1.2 ขวดรูปชมพู่ | Kima |
| 1.3 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม | Kima |
| 1.4 เครื่องเขย่าผสมสารให้เข้ากัน | Shelton Scientific (VSM-3) |
| 1.5 เครื่องชั่งสารละเอียดแบบดิจิตอล | Sartorius (BSA224S-CW) |
| 1.6 เครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวี | BIO-RAD |
| 1.7 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ | Hirayama (HVE-25/50) |
| 1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน | Thera trading (GP6000) |
| 1.9 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม | Eppendorf Mastercycler (nexus gradient,Germany) |
| 1.10 เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า | Horizon™ |
| 1.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง | Metrohm (827) |
| 1.12 เครื่องวัดค่าความนำไฟฟ้าในน้ำ | Suntex (SC-110) |
| 1.13 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง | Thermo Scientific (Nanodrop 2000C) |
| 1.14 เครื่องหมุนเหวี่ยง | Eppendorf model 5804R |

| | |
|---|---|
| 1.15 จานเพาะเชื้อชนิดแก้ว | Kima |
| 1.16 ตะเกียงแอลกอฮอลล์ | Kima |
| 1.17 ตะแกรงหลอดทดลอง | Kima |
| 1.18 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส | Sanyo |
| 1.19 ตู้บ่มเชื้อ | Gallenkamp |
| 1.20 ตู้บ่มเพาะเชื้อพร้อมเขย่า | N-Biotek (NB-202VL) |
| 1.21 ตู้ปลอดเชื้อ ระดับ 2 | Ehret (V-190) |
| 1.22 ตู้อบลมร้อน | Memmert (30-1060) |
| 1.23 เทอร์โมมิเตอร์ | Sato |
| 1.24 แท่งแก้วเขี่ยเชื้อแบบสามเหลี่ยม | Kima |
| 1.25 บีกเกอร์ | Kima |
| 1.26 ไมโครทิวป์ ขนาด 1,500 และ 200 µl | Tarsons |
| 1.27 ไมโครปิเปต ขนาด 1,000 และ 200 µl | Gilson |
| 1.28 ไมโครปิเปตทิป ขนาด 1,000 และ 200 µl | NEST |
| 1.29 หลอดเซนติฟิว ขนาด 15 และ 50 ml | Extragene |
| 1.30 หลอดทดลองแก้ว | Kima |
| 1.31 ห่วงเขี่ยเชื้อ | Kima |
| 1.32 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ | Julabo (TW20) |

**2.สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

| **สารเคมี** | **บริษัทผู้ผลิต** |
|---|---|
| 2.1 100 bp + 3K DNA ladder | SMOBIO |
| 2.2 Absolute ethanol | HIMEDIA |
| 2.3 Agar | HIMEDIA |
| 2.4 Agarose | Vivantis |
| 2.5 Arginine | HIMEDIA |
| 2.6 Chloroform | HIMEDIA |
| 2.7 Christensen urea agar | HIMEDIA |
| 2.8 Decarboxylase broth base | HIMEDIA |
| 2.9 Ethidium bromide | HIMEDIA |
| 2.10 Glucose | HIMEDIA |
| 2.11 Glucose OF medium | HIMEDIA |
| 2.12 Lactose | HIMEDIA |
| 2.13 Lysine | HIMEDIA |
| 2.14 Lysozyme | Vivantis |
| 2.15 Malt extract | HIMEDIA |
| 2.16 Mannitol | HIMEDIA |
| 2.17 Methyl red | HIMEDIA |

| | |
|---|---|
| 2.18 MR-VP broth | HIMEDIA |
| 2.19 Nutrient broth (NB) | HIMEDIA |
| 2.20 Oil emulsion | HIMEDIA |
| 2.21 Ornithine | HIMEDIA |
| 2.22 Peptone | HIMEDIA |
| 2.23 Phenol | Fisher |
| 2.24 Pronase | QUIGEN |
| 2.25 RNase A | Vivantis |
| 2.26 SDS | Vivantis |
| 2.27 Simmons citrate agar | HIMEDIA |
| 2.28 Sodium chloride (NaCl) | Qrec |
| 2.29 Sucrose | HIMEDIA |
| 2.30 Triple sugar iron agar | HIMEDIA |
| 2.31 Tryptone | HIMEDIA |
| 2.32 Yeast extract | HIMEDIA |

มหาวิทยาลัยศิลปากร

**3. วิธีการทดลอง**

**3.1 การเก็บตัวอย่าง**

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยเก็บตัวอย่างน้ำในหลอดปราศจากเชื้อ ขนาด 15 ml เก็บตัวอย่างดินตะกอนในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ตัวอย่างถูกเก็บไว้ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งหรือที่อุณหภูมิ 4°C ตลอดเวลาจนกระทั่งใช้ในการทดลอง (ไม่เกิน 10 ชั่วโมง) ทำการวัดค่าอุณหภูมิ ณ จุดเก็บตัวอย่าง ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างและค่าความเค็มทำการวัดค่าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

**3.2 การสำรวจ Heterotrophic bacteria ด้วยอาหาร Nutrient agar + 1% NaCl (NA+1% NaCl)**

ชั่งดินตะกอน 1 g ผสมกับ normal saline (0.85% NaCl) 9 ml ในหลอดปราศจากเชื้อขนาด 15 ml จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนด้วยเทคนิค 10-fold dilution ด้วย normal saline ให้มีค่าการเจือจางถึง $10^{-3}$ ก่อนนำตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนปริมาตร 0.1 ml ของแต่ละความเข้มข้น ($10^{0}$-$10^{-3}$) ไปเกลี่ยบนอาหาร NA ที่มีการเติม 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนและลักษณะโคโลนี คำนวณหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในหน่วย colony forming unit (CFU/ml) จากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์บนอาหาร NA+1% NaCl ก่อนทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม (Gram staining) บันทึกการติดสีและลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

**3.3 การสำรวจเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์โปรตีเอส**

**3.3.1 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส**

ชั่งดินตะกอน 1 g ผสมกับ normal saline (0.85% NaCl) 9 ml ในหลอดปราศจากเชื้อขนาด 15 ml จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนด้วยเทคนิค 10-fold dilution ด้วย normal saline ให้มีค่าการเจือจางถึง $10^{-4}$ ก่อนนำตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนปริมาตร 0.1 ml ของแต่ละความเข้มข้น ($10^{-1}$-$10^{-4}$) ไปเกลี่ยบนอาหาร Starch agar ที่มีการเติม 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 120 ชั่วโมง บันทึกจำนวนและลักษณะโคโลนี หลังจากบ่มทำการย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนจะเห็นเป็นบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนีบนพื้นสีน้ำเงินของเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตเอนเอนไซม์อะไมเลส บันทึกจำนวนโคโลนีที่มีการผลิตเอนไซม์ คำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหน่วย colony forming unit (CFU/ml) จากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์บนอาหาร NA+1% NaCl ก่อนทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม (Gram staining) บันทึกการติดสีและลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

**3.3.2 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส**

ชั่งดินตะกอน 1 g ผสมกับ normal saline (0.85% NaCl) 9 ml ในหลอดปราศจากเชื้อขนาด 15 ml จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนด้วยเทคนิค 10-fold dilution ด้วย normal saline ให้มีค่าการเจือจางถึง $10^{-4}$ ก่อนนำตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนปริมาตร 0.1 ml ของแต่ละความเข้มข้น ($10^{-1}$-$10^{-4}$) ไปเกลี่ยบนอาหาร Tween 80 agar ที่มีการเติม 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนและลักษณะโคโลนี สังเกต precipitation zone ของเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ไลเปส บันทึกจำนวนโคโลนีที่มีการผลิตเอนไซม์ คำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหน่วย colony forming unit (CFU/ml) จากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์บนอาหาร NA+1% NaCl ก่อนทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม (Gram staining) บันทึกการติดสีและลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.3.3 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

ชั่งดินตะกอน 1 g ผสมกับ normal saline (0.85% NaCl) 9 ml ในหลอดปราศจากเชื้อขนาด 15 ml จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนด้วยเทคนิค 10-fold dilution ด้วย normal saline ให้มีค่าการเจือจางถึง $10^{-4}$ ก่อนนำตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนปริมาตร 0.1 ml ของแต่ละความเข้มข้น ($10^{-1}$-$10^{-4}$) ไปเกลี่ยบนอาหาร NA+milk ที่มีการเติม 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนและลักษณะโคโลนี สังเกต clear zone ของเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส บันทึกจำนวนโคโลนีที่มีการผลิตเอนไซม์ คำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหน่วย colony forming unit (CFU/ml) จากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์บนอาหาร NA+1% NaCl ก่อนทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม (Gram staining) บันทึกการติดสีและลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.4 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทดสอบทางชีวเคมี

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์บนอาหาร NA+1%NaCl ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อบริสุทธิ์มาทำการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) เพื่อตามคุณลักษณะอ้างอิงใน The 8th edition of Bergy's manual of determinative bacteriology ดังนี้ Carbohydrate fermentation (Glucose, Lactose, Mannitol, Sucrose), Decarboxylase test (Arginine, Lysine, Ornithine), Urease test, Glucose OF medium, IMViC test, Triple sugar iron (TSI), Oxidase test, Catalase test และจำแนกเชื้อด้วยโปรแกรม Bacterial identification – ABIS online บนเว็บไซต์ http://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html

**3.5 การสำรวจและแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทให้บริสุทธิ์**

ชั่งดินตะกอน 1 g ผสมกับ normal saline (0.85% NaCl) 9 ml ในหลอดปราศจากเชื้อขนาด 15 ml จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนด้วยเทคนิค 10-fold dilution ด้วย normal saline ให้มีค่าการเจือจางถึง $10^{-4}$ ก่อนนำตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนปริมาตร 0.1 ml ของแต่ละความเข้มข้น ($10^{-1}$-$10^{-4}$) ไปเกลี่ยบนอาหาร ISP-2 ที่มีการเติม 1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-14 วัน บันทึกจำนวนและลักษณะโคโลนี สังเกตโคโลนีที่มีลักษณะฝุ่นคล้ายผงชอล์ค บันทึกจำนวนและลักษณะโคโลนีคำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหน่วย colony forming unit (CFU/ml) หลังจากนั้นทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร ISP-2+1% NaCl

**3.6 การสกัดดีเอนเอของเชื้อแอคติโนมัยซีท**

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทใน ISP-2 broth +1%(w/v) NaCl แล้วนำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 7-14วัน ปิเปต culture broth ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนเชื้อก่อนบดในโกร่งด้วย liquid nitrogen ให้ละเอียดก่อน re-suspend ตะกอนด้วย lysozyme solution (2mg/ml) 0.4 ml ในหลอด eppendorf ดูดขึ้น-ลง ให้ตะกอนเซลล์กระจาย บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติม 25% (w/v) SDS 20 µl และ RNase A (100 mg/ml) 10 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เติม pronase (2 mg/ml) 40 µl (บ่มที่ 37°C 15 นาที ก่อนใช้งาน) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม phenol 1 volume ผสมสารโดยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และดูด aqueous phase (upper phase) ใส่หลอด eppendorf ใหม่ เติม phenol-chloroform (1:1) 1 volume ผสมสารโดยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และดูด aqueous phase (upper phase) ใส่หลอด eppendorf ใหม่ เติม absolute ethanol 2 volume และ 5 M NaCl (ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 M) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ทิ้ง เติม 70% ethanol 600 µl กลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ทิ้ง เปิดฝาหลอด eppendorf ให้ตะกอน DNA แห้งที่ อุณหภูมิห้องและละลาย ตะกอน DNA ใน TE buffer 50 µl และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

### 3.7 การระบุจำแนกเชื้อของแอคติโนมัยซีทโดยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มจีนัส *Streptomyces* sp. (A7-26f (5'-CCG TCG ACG AGC TCA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') และ B1523-1504r (5'-CCC GGG TAC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC GCA-3')) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็น DNA template ทำการเตรียม reaction mixture ดังตาราง

| สารเคมี | ปริมาตร (µl) |
|---|---|
| Ultrapure water | 15.30 |
| 10X PCR buffer | 2.50 |
| 10mM dNTP | 0.50 |
| 25mM $MgCl_2$ | 1.50 |
| Forward primer (10 pmole/µl) | 1.25 |
| Reward primer (10 pmole/µl) | 1.25 |
| 5 U/µl Taq polymerase | 0.20 |
| DNA template (100 ng/µl) | 2.50 |
| **Total volume** | 25.00 |

นำไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycle : Eppendorf master cycler nexus gradient โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| โปรแกรมที่ 1 | (initial denaturation) | ที่ 94°C | 4 นาที | 1 รอบ |
| โปรแกรมที่ 2 | (denaturation) | ที่ 94°C | 1 นาที | 35 รอบ |
| | (annealing) | ที่ 56°C | 30 วินาที | |
| | (extension) | ที่ 72°C | 1 นาที | |
| โปรแกรมที่ 3 | (final extension) | ที่ 72°C | 5 นาที | |
| | | ที่ 4°C | ∞ | |

นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1%(w/v) agarose gel เปรียบเทียบขนาด DNA กับ 100 bp + 3K DNA ladder marker หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบแล้วส่งไปที่บริษัท ยูทูไบโอ (ไทยแลนด์) จำกัด เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสแล้วนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล The Nation Center for Biotechnology โดยใช้อัลกอริทึม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Morgulis et al., 2008; Zhang et al., 2000) , Ribosomal Database Project (RDP)(Wang et al., 2007) และ EzBioCloud (Yoon et al., 2017)

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

## 4.1 ตำแหน่งที่ตั้งและลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากป่าชายเลน

### 4.1.1 ตำแหน่งที่ตั้ง

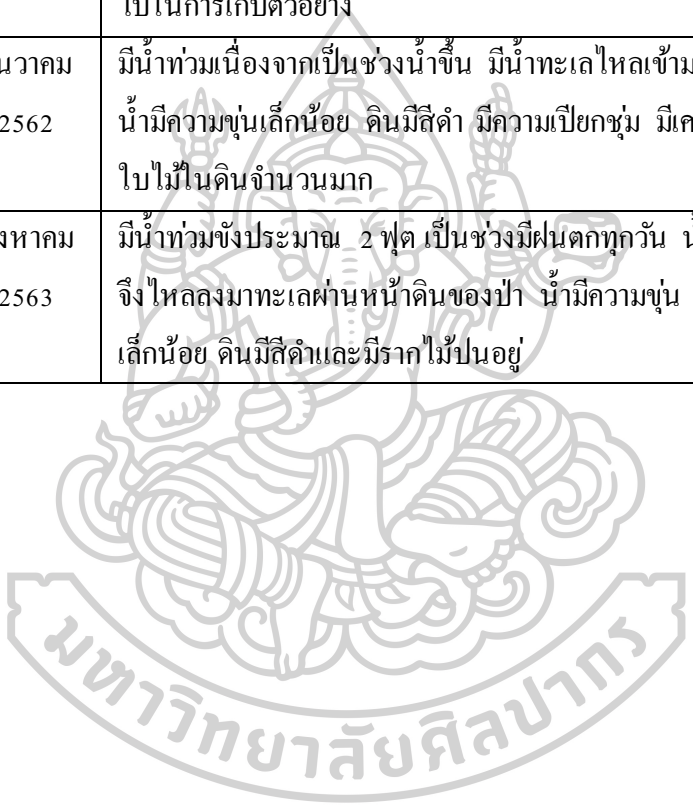
ป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เป็นป่าพื้นที่ขนาดเล็กซึ่งตั้งอยู่ในพื้นที่ของหน่วยบัญชาการต่อสู้อากาศยานและรักษาฝั่ง (Air and coastal defense command) มีบ้านพักข้าราชการ สนามกอล์ฟ บ้านพักตากอากาศสำหรับนักท่องเที่ยว และร้านอาหารอยู่บริเวณใกล้เคียง เป็นสถานที่ท่องเที่ยวเชิงธรรมชาติซึ่งอยู่ติดกับคลองถูป ประกอบด้วยต้นไม้หลากหลายชนิด ต้นไม้มีขนาดกลาง น้ำชุ่ม มีคลองน้ำไหลผ่าน มีขยะเล็กน้อยซึ่งเกิดจากการพัดพาของกระแสน้ำ ในป่าเป็นน้ำผสมระหว่างน้ำทะเลและน้ำจืด

ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ในบริเวณป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่างเดือนสิงหาคม 2562 ถึงเดือนสิงหาคม 2563 ดังรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 1 ลักษณะตัวอย่างและพิกัดที่ทำการเก็บตัวอย่าง

| ตำแหน่ง | เดือนที่เก็บตัวอย่าง | ลักษณะตัวอย่าง | พิกัด |
|---|---|---|---|
| 1 | สิงหาคม 2562 | มีลักษณะน้ำท่วมขัง สีของน้ำขุ่นเล็กน้อย ดินเปียกชุ่มมีสีดำ | 12°38'47.0"N 100°55'53.3"E |
| 2 | กันยายน 2562 | น้ำมีความขุ่นเล็กน้อย ช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างมีฝนตกพอดี ดินมีสีดำแห้งและเหนียว จึงต้องทำการขุดให้ลึกลงไปในการเก็บตัวอย่าง | 12°38'48.2"N 100°55'53.6"E |
| 3 | ธันวาคม 2562 | มีน้ำท่วมเนื่องจากเป็นช่วงน้ำขึ้น มีน้ำทะเลไหลเข้ามา น้ำมีความขุ่นเล็กน้อย ดินมีสีดำ มีความเปียกชุ่ม มีเศษใบไม้ในดินจำนวนมาก | 12°38'46.0"N 100°55'52.5"E |
| 4 | สิงหาคม 2563 | มีน้ำท่วมขังประมาณ 2 ฟุต เป็นช่วงมีฝนตกทุกวัน น้ำจืดจึงไหลลงมาทะเลผ่านหน้าดินของป่า น้ำมีความขุ่นเล็กน้อย ดินมีสีดำและมีรากไม้ปนอยู่ | 12°38'47.8"N 100°55'50.6"E |



ภาพที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (ที่มา : google map)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

**4.1.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเค็ม (Salinity) และอุณหภูมิ (Temperature) ของตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอน**

การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเค็ม (Salinity) และอุณหภูมิ (Temperature) ของตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 7-9 โดยสูงที่สุดพบในตำแหน่งที่ 1 และต่ำที่สุดพบในตำแหน่งที่ 3 ค่าความเค็ม (Salinity) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันในทุกตำแหน่ง ยกเว้นในตำแหน่งที่ 3 ที่มีค่าสูงจนเห็นได้ชัดเจน เนื่องจากช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลาน้ำขึ้นส่งผลให้มีน้ำทะเลไหลเข้ามาในบริเวณป่าเป็นจำนวนมาก และค่าอุณหภูมิมีค่าใกล้เคียงกันโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 26.8°C

ตารางที่ 2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเค็ม (Salinity) และอุณหภูมิ (Temperature) ของตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

| ตำแหน่ง | ตัวอย่างน้ำ | | | ตัวอย่างดิน | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ความเป็นกรด-ด่าง (pH) | ความเค็ม (ppt) | อุณหภูมิ (°C) | ความเป็นกรด-ด่าง (pH) | ความเค็ม (ppt) | อุณหภูมิ (°C) |
| 1 | 9.23 | 0.53 | 26.0 | 9.55 | 0.50 | 26.0 |
| 2 | 8.06 | 0.20 | 27.0 | 7.55 | 0.54 | 28.0 |
| 3 | 7.34 | 6.00 | 27.0 | 8.12 | 7.90 | 26.5 |
| 4 | 8.18 | 0.43 | 27.0 | 8.38 | 0.18 | 27.0 |

**4.2 ชนิดและปริมาณของ Heterotrophic bacteria บนอาหาร NA+ 1% NaCl**

จากการสำรวจชนิดและปริมาณของ Heterotrophic bacteria โดยใช้อาหาร NA ที่มีการเติม 1% NaCl จากผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างน้ำมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วง $5.8x10^{2}$ - $1.0x10^{4}$ CFU/ml และตัวอย่างดินตะกอนมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วง $1.0x10^{3}$ – $2.7x10^{5}$ (ตารางที่ 3 ) โดยตำแหน่งที่พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำมากที่สุดคือ ตำแหน่งที่ 3, 2, 1 และ 4 ตามลำดับ และตำแหน่งที่พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินตะกอนมากที่สุดคือ ตำแหน่งที่ 3, 2, 1 และ 4 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเชื้อในตัวอย่างดินตะกอนมีมากกว่าในตัวอย่างน้ำทุกตำแหน่ง

ตารางที่ 3 ปริมาณ Heterotrophic bacteria บนอาหาร NA + 1% NaCl

| ตำแหน่ง | ปริมาณ Heterotrophic bacteria บนอาหาร NA + 1% NaCl (CFU/ml) | |
|---|---|---|
| | ตัวอย่างน้ำ | ตัวอย่างดินตะกอน |
| 1 | $1.9x10^{3}$ | $3.6x10^{3}$ |
| 2 | $5.3x10^{3}$ | $9.2x10^{3}$ |
| 3 | $1.0x10^{4}$ | $2.7x10^{5}$ |
| 4 | $5.8x10^{2}$ | $1.0x10^{3}$ |

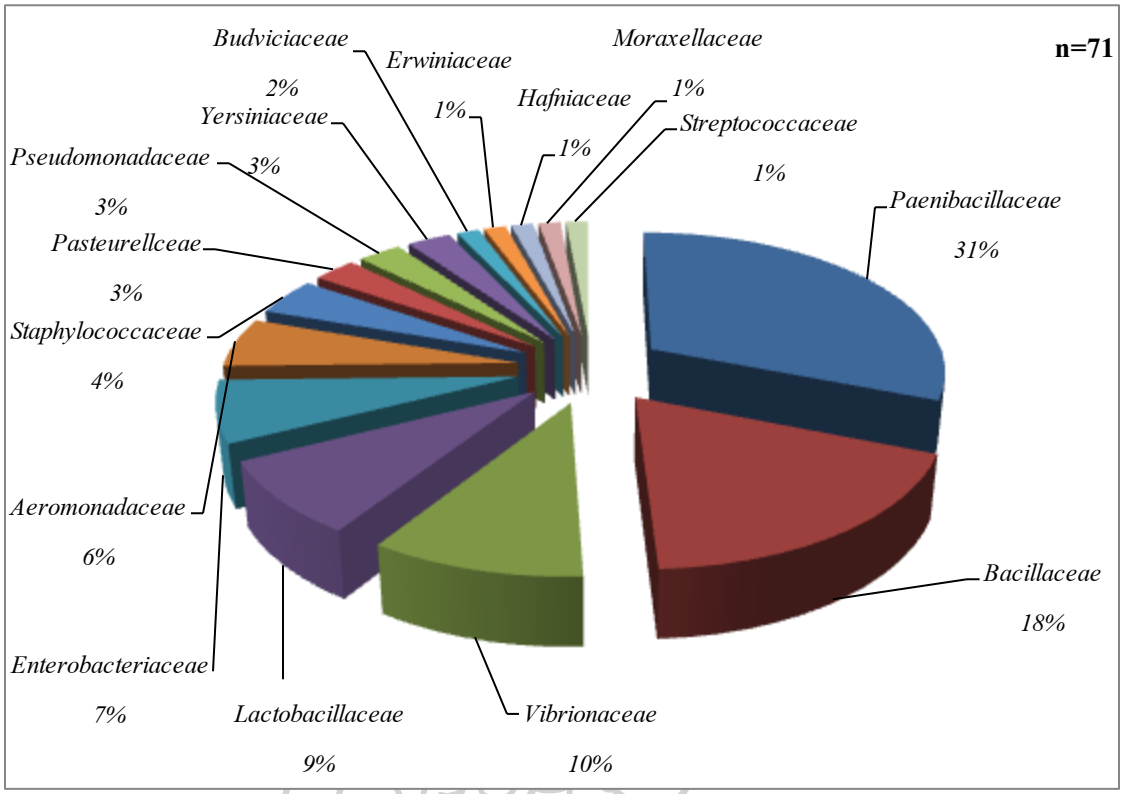
มหาวิทยาลัยศิลปากร

จากผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและโปรแกรม Bacterial identification – ABIS online ของ Heterotrophic bacteria จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนคลองกูปชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ทั้งหมด 71 ไอโซเลท

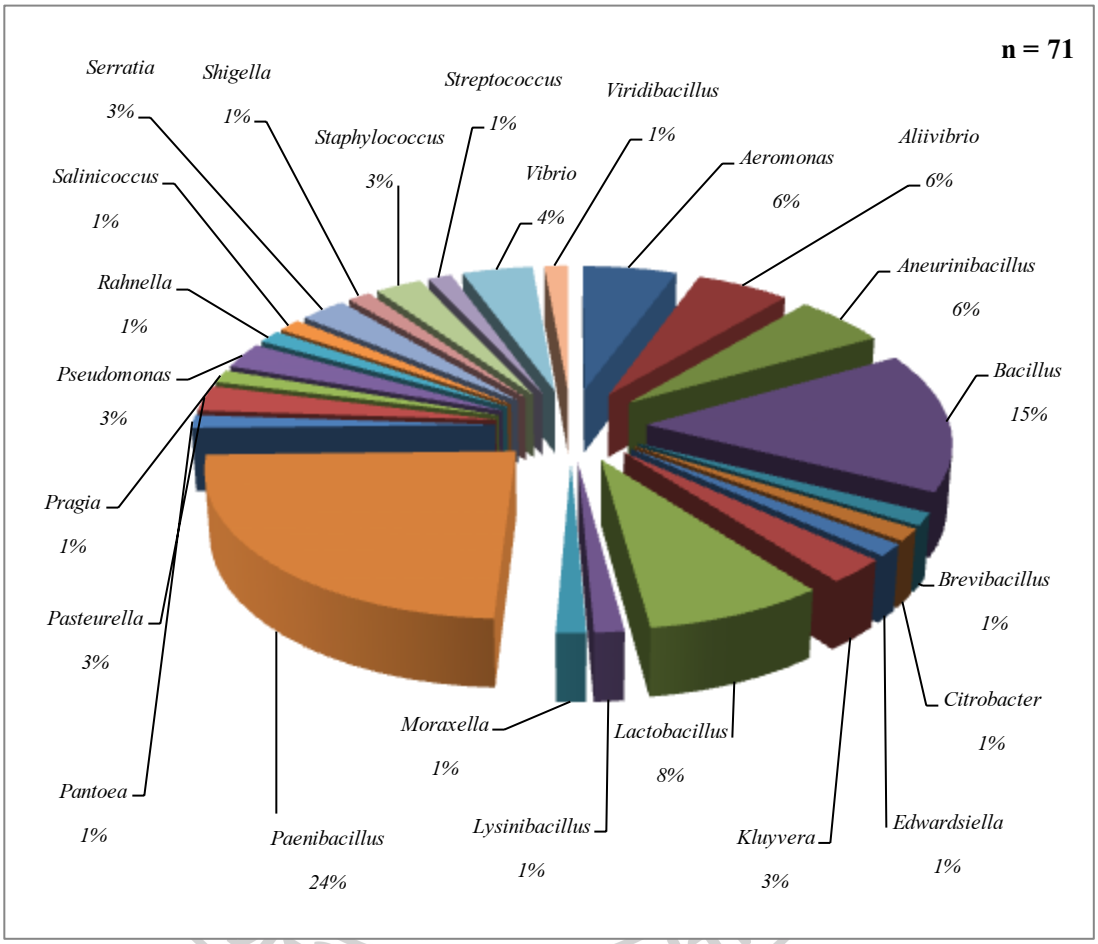
ทั้งนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 15 แฟมิลี่ (ภาพที่ 2) ดังนี้ *Aeromonadaceae, Bacillaceae, Budviciaceae, Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Hafniaceae, Lactobacillaceae, Moraxellaceae, Paenibacillaceae, Pasteurellceae, Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Vibrionaceae, Yersiniaceae*

ทั้งนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 24 จีนัส (ภาพที่ 3) ดังนี้ *Aeromonas, Aliivibrio, Aneurinibacillus, Bacillus, Brevibacillus, Citrobacter, Edwardsiella, Kluyvera, Lactobacillus, Lysinibacillus, Moraxella, Paenibacillus, Pantoea, Pasteurella, Pragia, Pseudomonas, Rahnella, Salinicoccus, Serratia, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, Vibrio, Viridibacillus*

โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Paenibacillaceae* พบ 22 ไอโซเลท (31%) อันดับสองคือแฟมิลี่ *Bacillaceae* พบ 13 ไอโซเลท (18%) และ *Vibrionaceae* พบ 7 ไอโซเลท (10%) และจีนัสที่พบมากที่สุด คือ *Paenibacillus* พบ 17 ไอโซเลท (24%) อันดับสองคือจีนัส *Bacillus* พบ 11 ไอโซเลท (15%) และ *Lactobacillus* พบ 6 ไอโซเลท (8%)




ภาพที่ 2 แฟมิลี่และร้อยละของ Heterotrophic bacteria ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท)



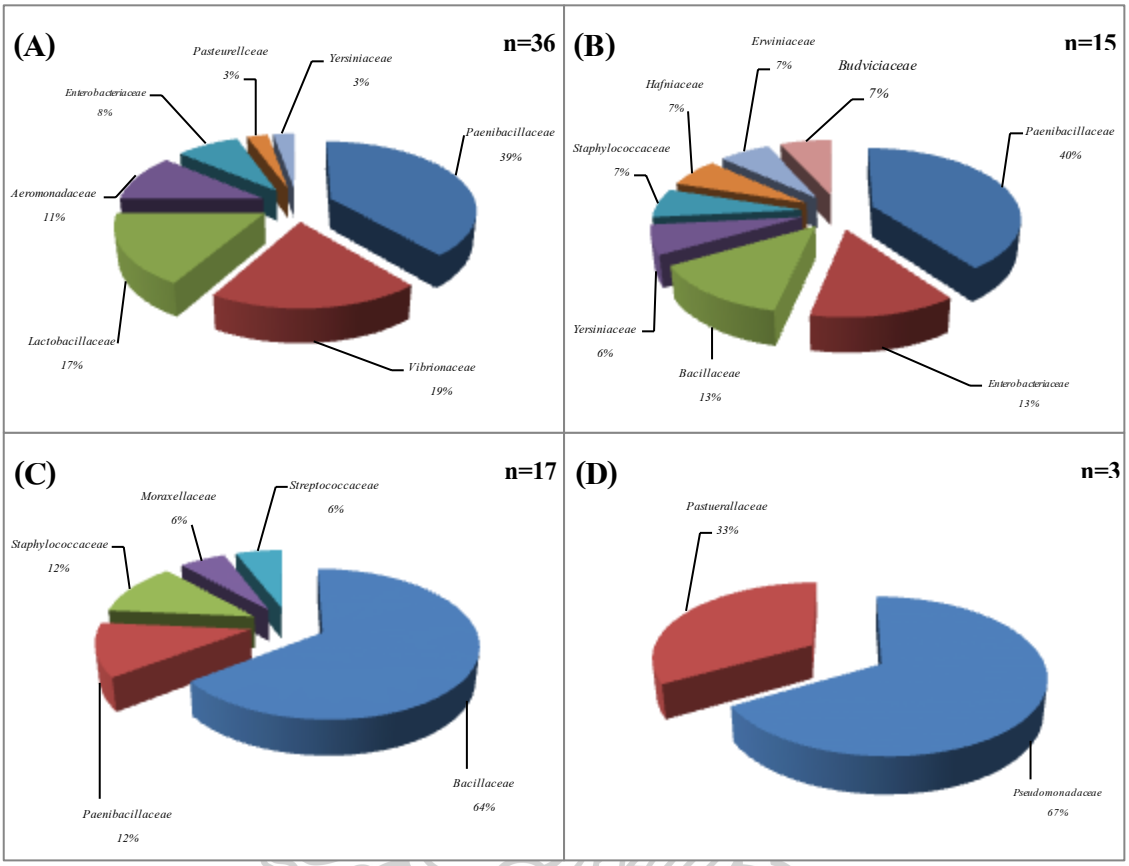

ภาพที่ 3 จีนัสและร้อยละของ Heterotrophic bacteria ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท)

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 1 ไอโซเลททั้งหมด 36 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 7 แฟมิลี่ (ภาพที่ 4A) และ10 จีนัส (ภาพที่ 5A) โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Paenibacillaceae* พบ 14 ไอโซเลท (39%) อันดับสองคือ *Vibrionaceae* พบ 7 ไอโซเลท (9%) และ *Lactobacillaceae* พบ 6 ไอโซเลท (17%) และจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Paenibacillus* พบ 13 ไอโซเลท (36%) อันดับสองคือ *Lactobacillus* พบ 6 ไอโซเลท (17%) และจีนัส *Aliivibrio, Aeromonas* พบจีนัสละ 4 ไอโซเลท (จีนัสละ 11%)

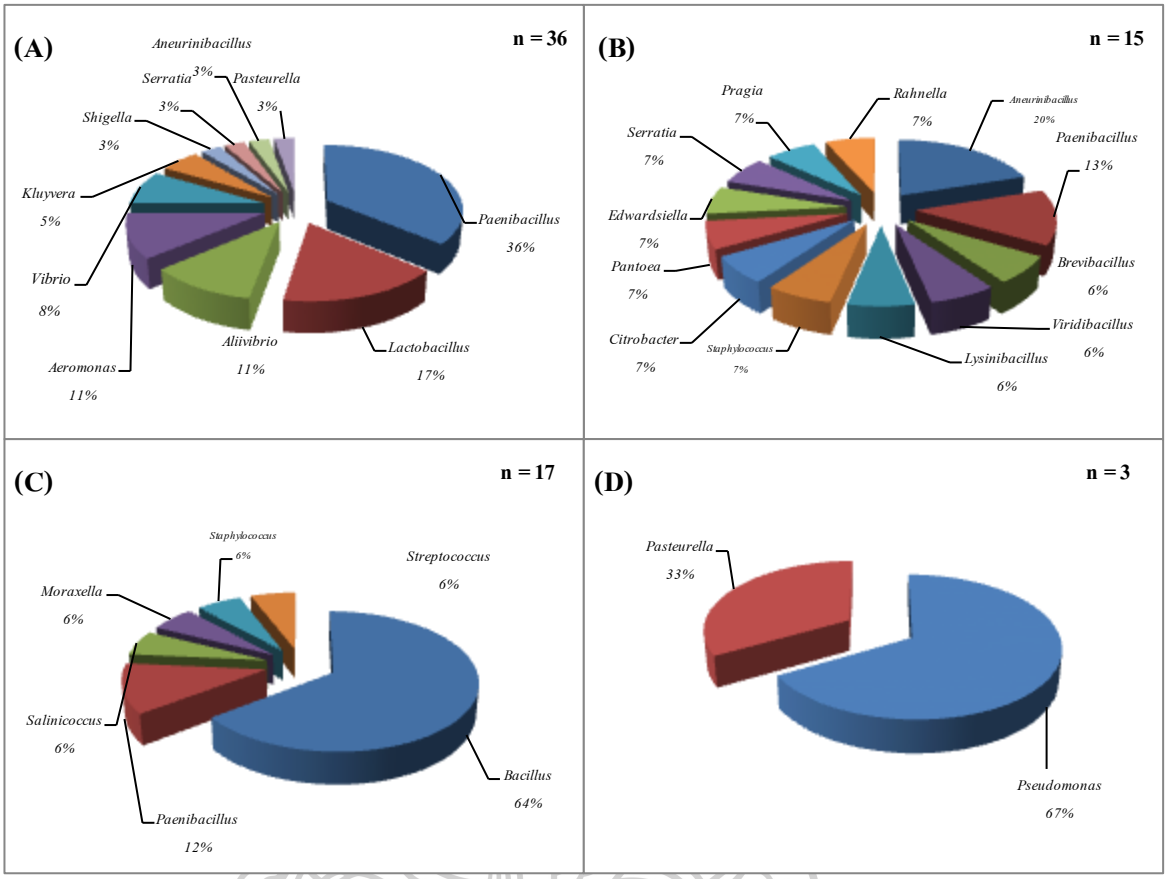
การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 2 ไอโซเลททั้งหมด 15 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 8 แฟมิลี่ (ภาพที่ 4B) และ 12 จีนัส (ภาพที่ 5B) โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Paenibacillaceae* พบ 6 ไอโซเลท (40%) รองลงมาคือ *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* พบแฟมิลี่ละ 2 ไอโซเลท (แฟมิลี่ละ 13%) และจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Aneurinibacillus* พบ 3 ไอโซเลท (20%) รองลงมาคือ *Paenibacillus* พบ 2 ไอโซเลท (13%)

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 3 ไอโซเลททั้งหมด 17 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 5 แฟมิลี่ (ภาพที่ 4C) และ 6 จีนัส (ภาพที่ 5C) โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Bacillaceae* พบ 11 ไอโซเลท (64%) รองลงมาคือ *Paenibacillacea* และ *Staphylococcacea* พบแฟมิลี่ละ 2 ไอโซเลท (แฟมิลี่ละ 12%) และจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Bacillus* พบ 11 ไอโซเลท (64%) รองลงมาคือ *Paenibacillus* พบ 2 ไอโซเลท (12%)

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 4 ไอโซเลททั้งหมด 3 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 2 แฟมิลี่ (ภาพที่ 4D) และ 2 จีนัส (ภาพที่ 5D) โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Pseudomonadaceae* พบ 2 ไอโซเลท (67%) รองลงมาคือ *Pasteurellaceae* พบ 1 ไอโซเลท (33%) และจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Pseudomonas* พบ 2 ไอโซเลท (67%) รองลงมาคือ *Pasteurella* พบ 1 ไอโซเลท (33%)



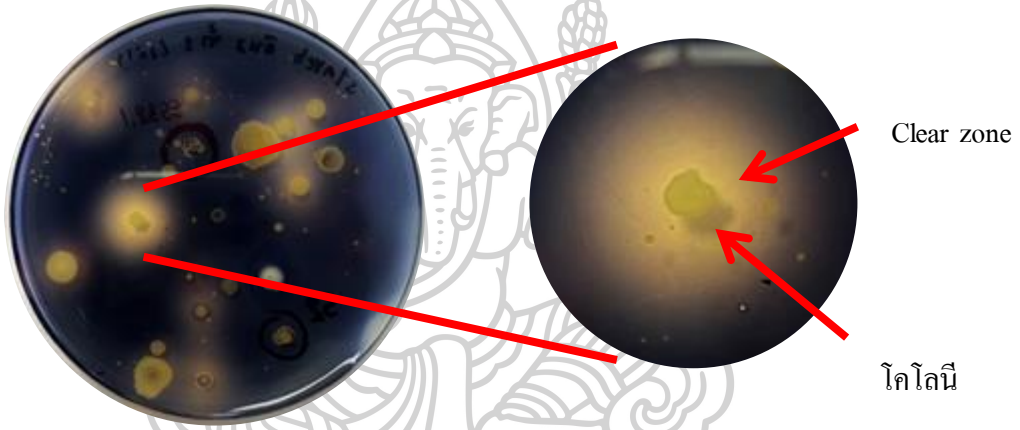

ภาพที่ 4 แฟมิลี่และร้อยละของ Heterotrophic bacteria ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 1 (B) ตำแหน่งที่ 2 (C) ตำแหน่งที่ 3 (D) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท)




ภาพที่ 5 จีนัสและร้อยละของ Heterotrophic bacteria ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 1 (B) ตำแหน่งที่ 2 (C) ตำแหน่งที่ 3 (D) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท)

**4.3 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส**

การสำรวจชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้อาหาร Starch ที่มีการเติม 1% NaCl ถ้าเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์ จะย่อยสลายโมเลกุลแป้งให้มีขนาดเล็กลงได้เป็น dextrin, oligosaccharide, maltose และ glucose ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะไม่เกิดสารเชิงซ้อนกับไอโอดีน ดังนั้นเมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนจึงเห็นเป็นบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนีบนพื้นสีน้ำเงิน (ภาพที่ 6)




ภาพที่ 6 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร Starch agar+1%NaCl โดยแบคทีเรียที่มีการผลิตและหลั่งเอนไซม์อะไมเลสออกมานอกเซลล์ จะเกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone)

จากผลการศึกษาพบว่าในตำแหน่งที่ 4 จากตัวอย่างน้ำพบเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์ 7.22% และในตัวอย่างดินตะกอนพบเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์ 47.22% (ตารางที่ 4) ขนาดของ amylolytic index อยู่ในช่วง 1.1-9.0 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์ที่คัดแยกได้จากตำแหน่งต่างๆ

| ตำแหน่ง | จำนวนโคโลนีที่เกิด clear zone (จำนวนโคโลนีทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ) | | ร้อยละของโคโลนีที่มีการผลิตเอนไซม์ | |
|---|---|---|---|---|
| | ตัวอย่างน้ำ | ตัวอย่างดินตะกอน | ตัวอย่างน้ำ | ตัวอย่างดินตะกอน |
| 1 | N/D | N/D | N/D | N/D |
| 2 | N/D | N/D | N/D | N/D |
| 3 | N/D | N/D | N/D | N/D |
| 4 | 7(97) | 17(36) | 7.22 | 47.22 |

หมายเหตุ N/D = not determined

ตารางที่ 5 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนในตำแหน่งที่ 4 และ amylolytic index

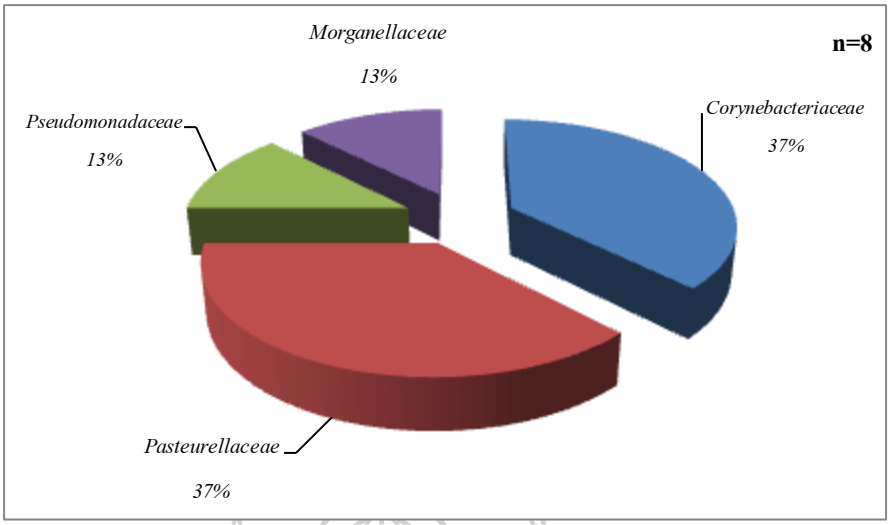
| กลุ่มเชื้อที่พบ(จีนัส) | จำนวนไอโซเลท (ร้อยละ) | ช่วงของ amylolytic index * |
|---|---|---|
| *Corynebacterium* | 3(36.5) | 1.1-2.0 |
| *Pseudomonas* | 1(12.5) | 1.4 |
| *Pasteurella* | 3(36.5) | 5.5-9.0 |
| *Photohabdus* | 1(12.5) | 1.7-2.0 |
| รวมจำนวนไอโซเลททั้งหมด | 8 ไอโซเลท | |

หมายเหตุ *คำนวณจากขนาดของ clear zone รวมขนาดโคโลนี(cm.)/ขนาดโคโลนี (cm.)

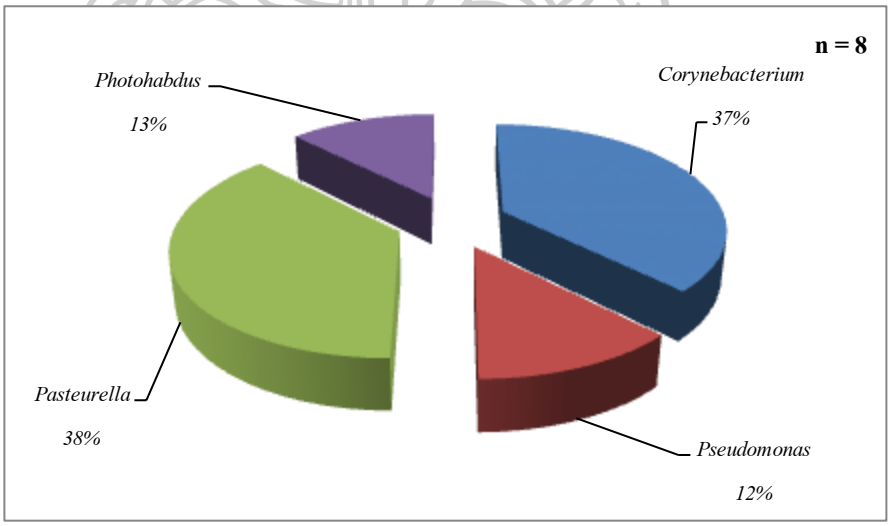
จากผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและโปรแกรม Bacterial identification – ABIS online ของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกนอกเซลล์ ทั้งหมด 8 ไอโซเลท

ทั้งนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 4 แฟมิลี่ (ภาพที่ 7) ดังนี้ *Corynebacteriaceae, Morganellaceae, Pasteurellaceae, Pseudomonadaceae* โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Corynebacteriaceae* , *Pasteurellceae* พบแฟมิลี่ละ 3 ไอโซเลท (แฟมิลี่ละ 37%) รองลงมาคือ *Pseudomonadaceae*, *Morganellaceae* พบแฟมิลี่ละ 1 ไอโซเลท (แฟมิลี่ละ 13%)

ทั้งนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 4 จีนัส (ภาพที่ 8) ดังนี้ *Corynebacterium, Pasteurella, Photohabdus, Pseudomonas* โดยจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Corynebacterium, Pasteurella* พบจีนัสละ 3 ไอโซเลท (จีนัสละ 37%) รองลงมาคือ *Photohabdus, Pseudomonas* พบจีนัสละ 1ไอโซเลท (จีนัสละ 13%)



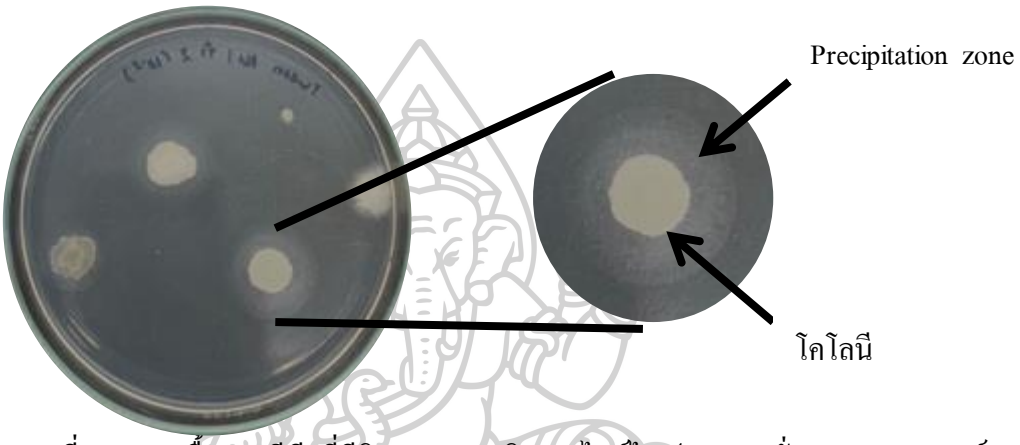

ภาพที่ 7 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร Starch agar+1% NaCl จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ในตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท)




ภาพที่ 8 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร Starch agar+1% NaCl จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ในตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท)

**4.4 ชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส**

การสำรวจชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้อาหาร Tween 80 ที่มีการเติม 1% NaCl ถ้าเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์จะย่อยสลายไขมันเกิดเป็นบริเวณใสรอบๆโคโลนีบนอาหารโดยขอบวงใสจะเกิดตะกอนขาวของเกลือแคลเซียมทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน เรียกว่า precipitation zone (ภาพที่ 9)



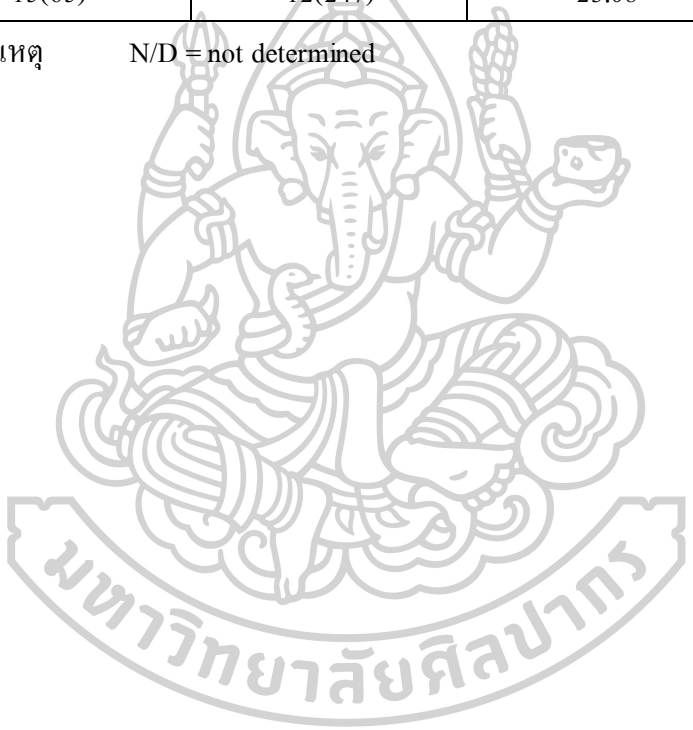

ภาพที่ 9 เชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร Tween80 agar+1% NaCl โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตและหลั่งเอนไซม์ไลเปส จะมีตะกอนขาวขุ่นล้อมรอบโคโลนี (precipitation zone)

จากผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างน้ำพบเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์มากที่สุดคือตำแหน่งที่ 4 (23.08%) รองลงมาคือตำแหน่งที่ 2 (21.28%) และน้อยที่สุดคือตำแหน่งที่ 3 (21.96%) (ตารางที่ 6) ในตัวอย่างดินตะกอนพบเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์มากที่สุดคือตำแหน่งที่ 1 (8.97%) รองลงมาคือตำแหน่งที่ 2 (5.26%) และน้อยที่สุดคือตำแหน่งที่ 3 (4.86%) ทั้งนี้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ในตัวอย่างน้ำสูงกว่าในตัวอย่างดินตะกอนทุกตำแหน่ง จากการศึกษาพบว่าขนาดของ lipolytic index สูงที่สุดในตำแหน่งที่ 2 อยู่ในช่วง 1.2-10.0 (ตารางที่ 7) รองลงมาคือตำแหน่งที่ 3 อยู่ในช่วง 2.0-5.0 และน้อยที่สุดในตำแหน่งที่ 4 อยู่ในช่วง 1.3-5.0

ตารางที่ 6 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ที่คัดแยกได้จากตำแหน่งต่างๆ

| ตำแหน่ง | จำนวนโคโลนีที่เกิด precipitation zone (จำนวนโคโลนีทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ) | | ร้อยละของโคโลนีที่มีการผลิตเอนไซม์ | |
|---|---|---|---|---|
| | ตัวอย่างน้ำ | ตัวอย่างดิน | ตัวอย่างน้ำ | ตัวอย่างดิน |
| 1 | N/D | N/D | N/D | N/D |
| 2 | 30(141) | 20(223) | 21.28 | 8.97 |
| 3 | 47(214) | 3(57) | 21.96 | 5.26 |
| 4 | 15(65) | 12(247) | 23.08 | 4.86 |

หมายเหตุ N/D = not determined



ตารางที่ 7 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนในตำแหน่งต่างๆและ lipolytic index

| ตำแหน่ง | กลุ่มเชื้อที่พบ(จีนัส) | จำนวนไอโซเลท (ร้อยละ) | ช่วงของ lipolytic index * |
|---|---|---|---|
| 1 | N/D | N/D | N/D |
| 2 | *Serratia* | 5(36) | 2.0-10.0 |
| | *Vibrio* | 2(15) | 2.5-3.3 |
| | *Paenibacillus* | 1(7) | 3.7 |
| | *Lysinibacillus* | 1(7) | 1.3 |
| | *Aeromonas* | 1(7) | 4.5 |
| | *Proteus* | 1(7) | 2.7 |
| | *Bacillus* | 1(7) | 3.5 |
| | *Shigella* | 1(7) | 3.0 |
| | *Photorhabdus* | 1(7) | 2.0 |
| | รวมไอโซเลททั้งหมด | 14 ไอโซเลท | |
| 3 | *Bacillus* | 6(86) | 2.0-3.5 |
| | *Paenibacillus* | 1(14) | 5.0 |
| | รวมไอโซเลททั้งหมด | 7 ไอโซเลท | |
| 4 | *Pseudomonas* | 4(40) | 5.0 |
| | *Pasteurella* | 3(30) | 1.3 |
| | *Lactobacillus* | 2(20) | 1.6 |
| | *Streptococcus* | 1(10) | 1.0 |
| | รวมไอโซเลททั้งหมด | 10 ไอโซเลท | |
| รวมไอโซเลททั้งหมดทุกตำแหน่ง | | 31 ไอโซเลท | |

หมายเหตุ *คำนวณจาก ขนาดของ precipitation zone รวมขนาดโคโลนี(cm.)/ขนาดโคโลนี(cm.)

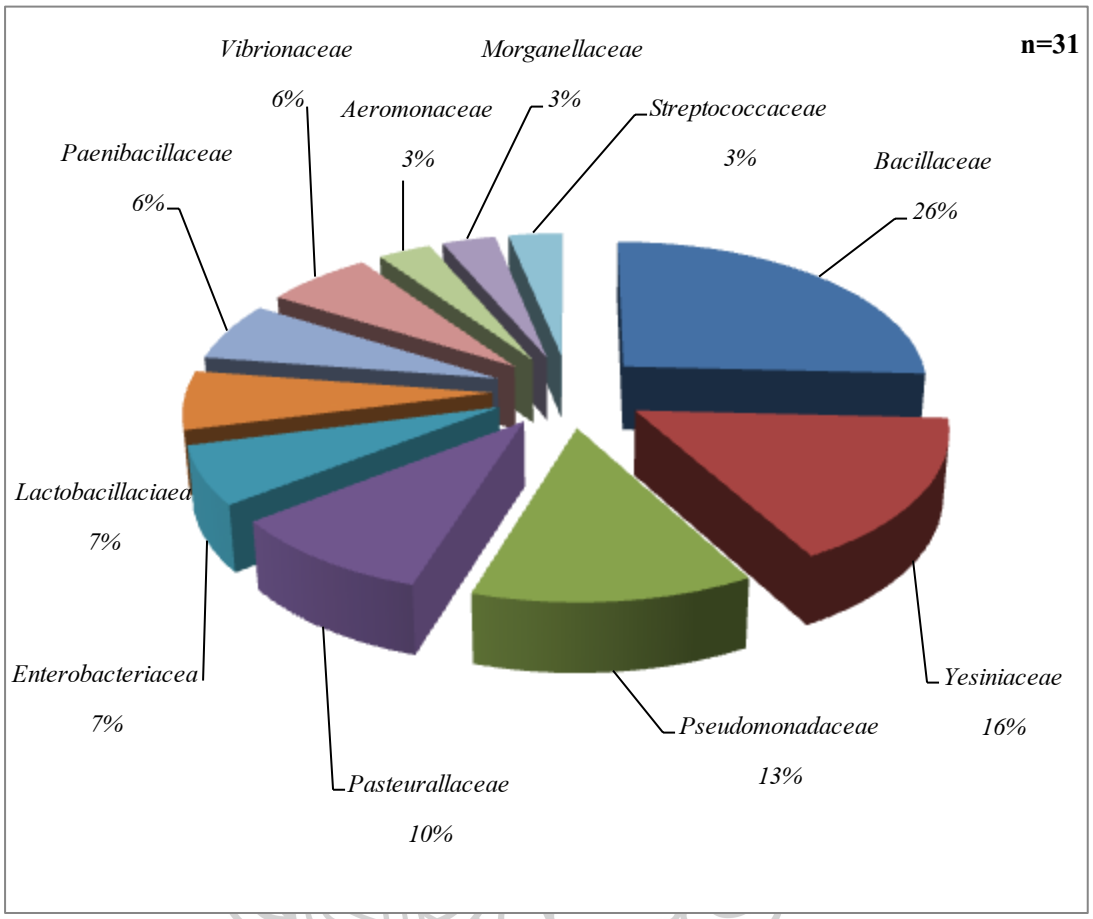
N/D = not determined

จากผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและโปรแกรม Bacterial identification – ABIS online ของแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอน บริเวณป่าชายเลนคลองกูปชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี คัดเลือกไอโซเลททั้งหมด 31 ไอโซเลท

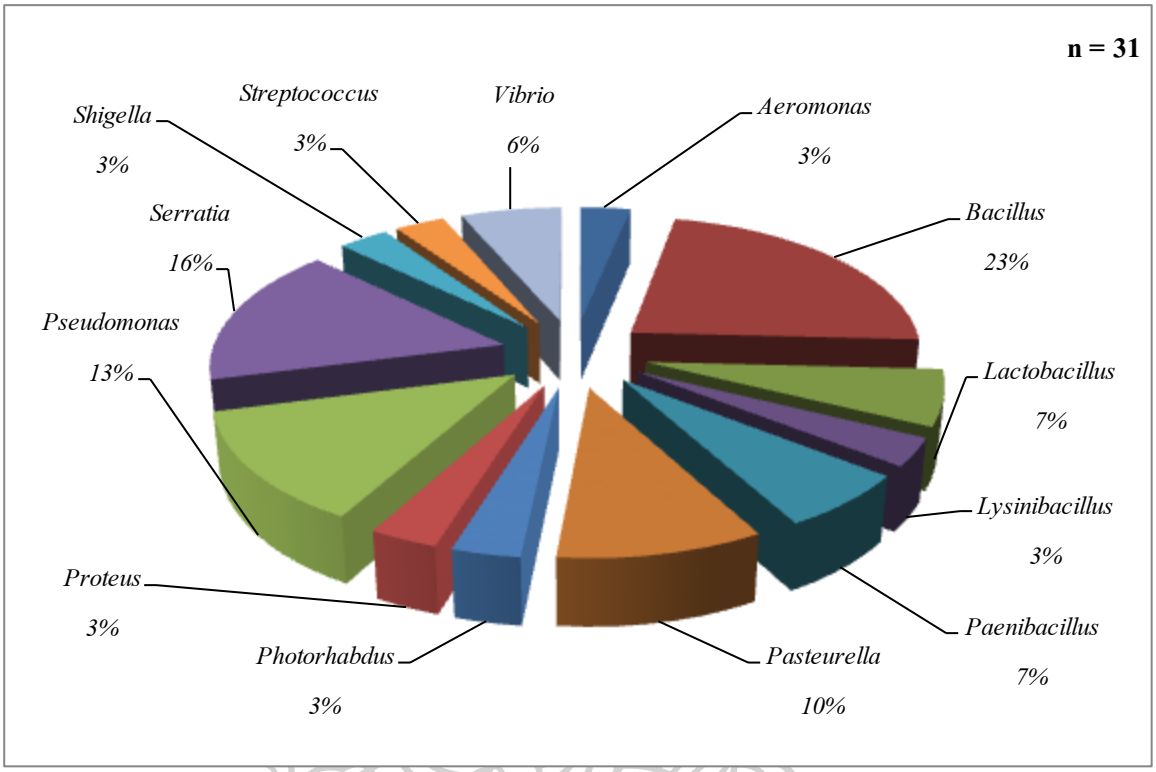
ทั้งนี้เป็นแบคทีเรียอยู่ใน 11 แฟมิลี่ (ภาพที่ 10) ดังนี้ *Aeromonaceae, Bacillaceae, Enterobacteriacea, Lactobacillaciaea, Morganellaceae, Paenibacillaceae, Pasteurallaceae, Pseudomonadaceae, Streptococcaceae, Vibrionaceae, Yesiniaceae* โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Bacillaceae* พบ 8 ไอโซเลท (26%) อันดับสองคือ *Yersiniaceae* พบ 5 ไอโซเลท (16%) และ *Pseudomonadaceae* พบ 4 ไอโซเลท (13%)

ทั้งนี้เป็นแบคทีเรียอยู่ใน 13 จีนัส (ภาพที่ 11) ดังนี้ *Aeromonas, Bacillus, Lactobacillus, Lysinibacillus, Paenibacillus, Pasteurella, Photorhabdus, Proteus, Pseudomonas, Serratia, Shigella, Streptococcus, Vibrio* โดยจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Bacillus* พบ 7 ไอโซเลท (23%) รองลงมาคือ *Serratia* พบ 5 ไอโซเลท (16%) และ *Pseudomonas* พบ 4 ไอโซเลท (13%)

มหาวิทยาลัยศิลปากร




ภาพที่ 10 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท)

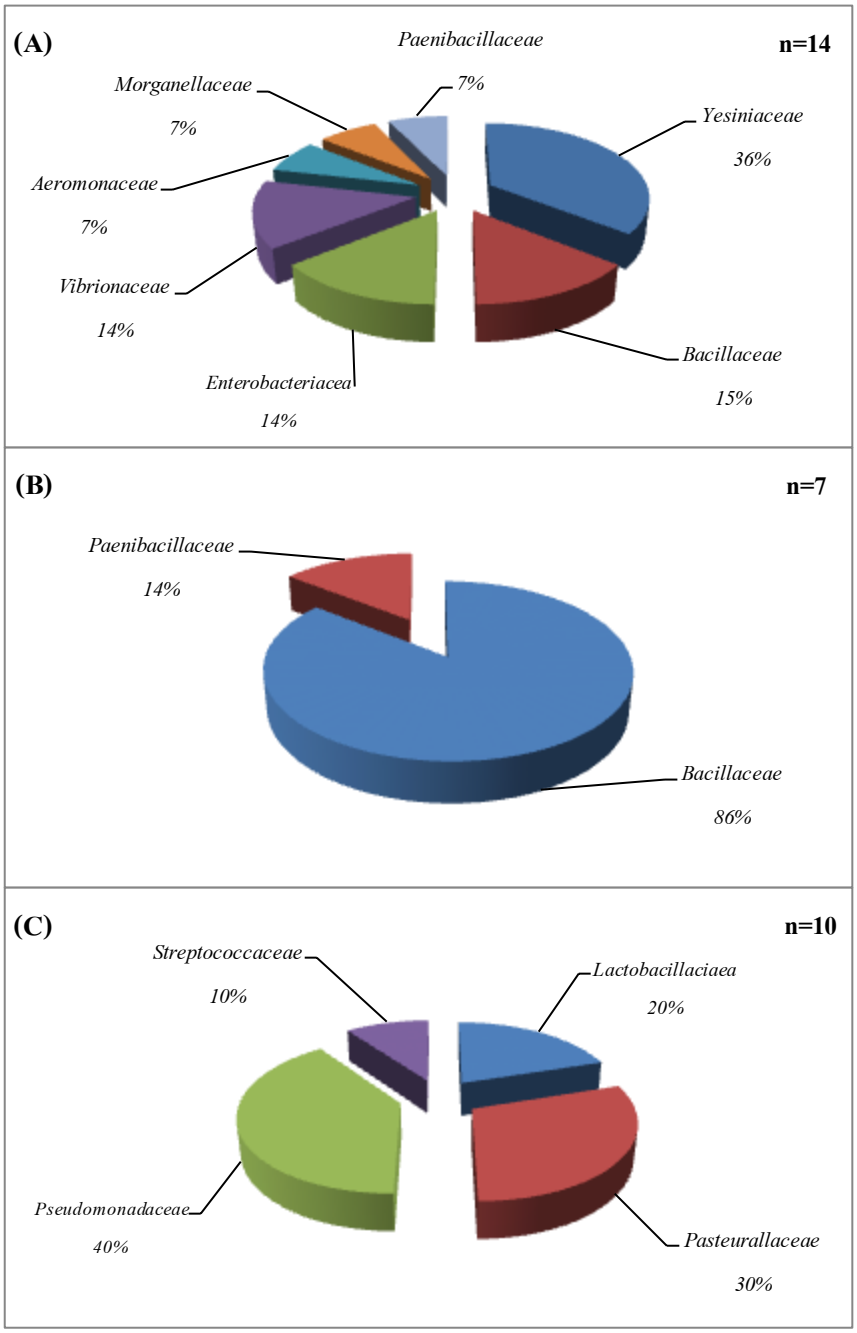



ภาพที่ 11 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท)

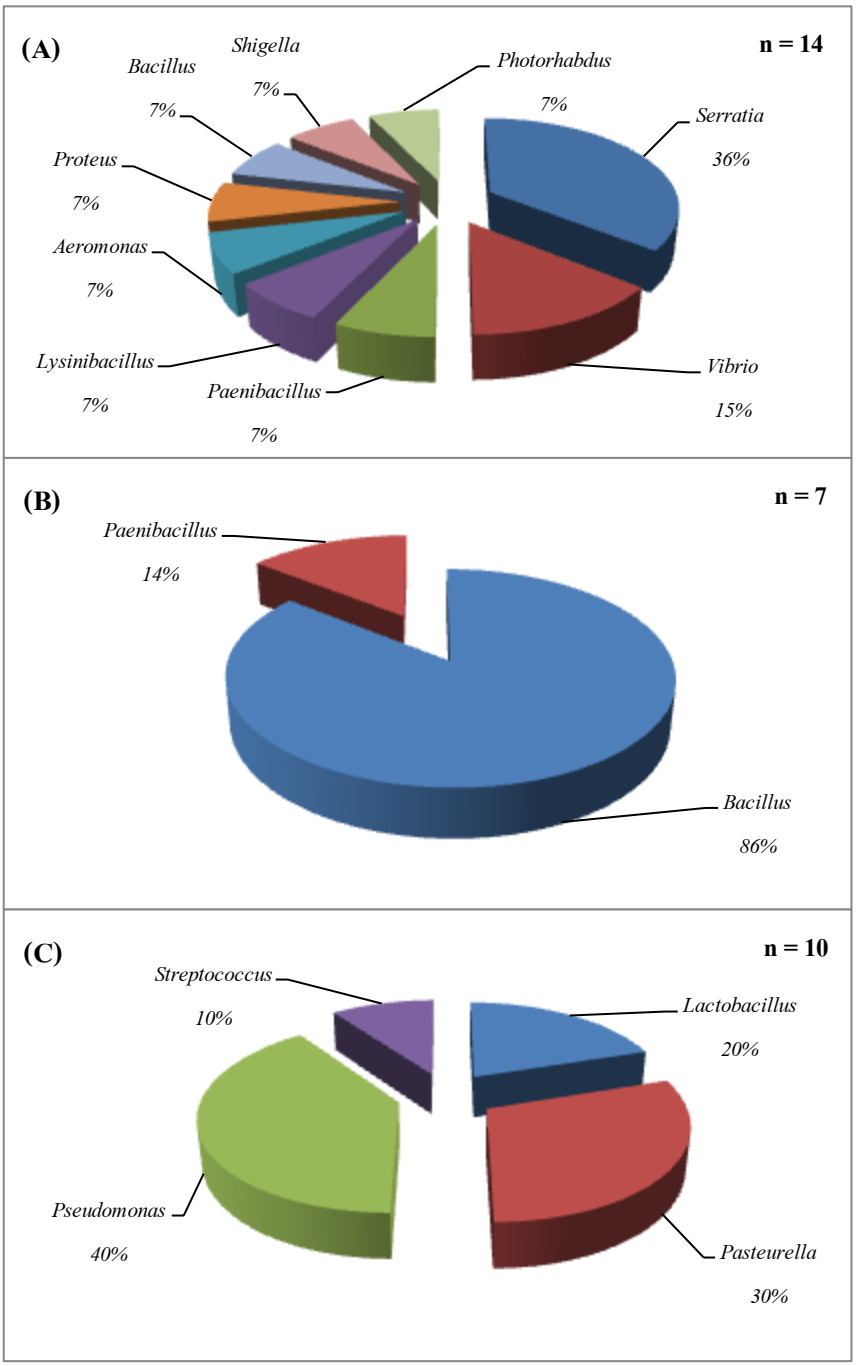
การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 2 คัดเลือกไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ทั้งหมด 14 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 7 แฟมิลี่ (ภาพที่ 12A) และ 9 จีนัส (ภาพที่ 13A) โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Yersiniaceae* พบ 5 ไอโซเลท (6%) รองลงมาคือ *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* พบแฟมิลี่ละ 2 ไอโซเลท (แฟมิลี่ละ 15%) และจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Serratia* พบ 5 ไอโซเลท (36%) รองลงมาคือ *Vibrio* พบ 2 ไอโซเลท (15%)

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 3 คัดเลือกไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ทั้งหมด 7 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 2 แฟมิลี่ (ภาพที่ 12B) และ 2 จีนัส (ภาพที่ 13B) โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Bacillaceae* พบ 6 ไอโซเลท (86%) และอันดับสองคือ *Paenibacillaceae* พบ 1 ไอโซเลท (14%) และจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Bacillus* พบ 6 ไอโซเลท (86%) รองลงมาคือ *Paenibacillus* พบ 1 ไอโซเลท (14%)

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 4 คัดเลือกไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ทั้งหมด 10 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 4 แฟมิลี่ (ภาพที่ 12C) และ 4จีนัส (ภาพที่ 13C) โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Pseudomonadaceae* พบ ไอโซเลท (40%) รองลงมาคือ *Pasteurellaceae* พบ 3 ไอโซเลท (30%) และ *Lactobacillaceae* พบ 2 ไอโซเลท (20%) และจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Pseudomonas* พบ 4 ไอโซเลท (40%) อันดับสองคือ *Pasteurella* พบ 3 ไอโซเลท (30%) และ *Lactobacillus* พบ 2 ไอโซเลท (20%)



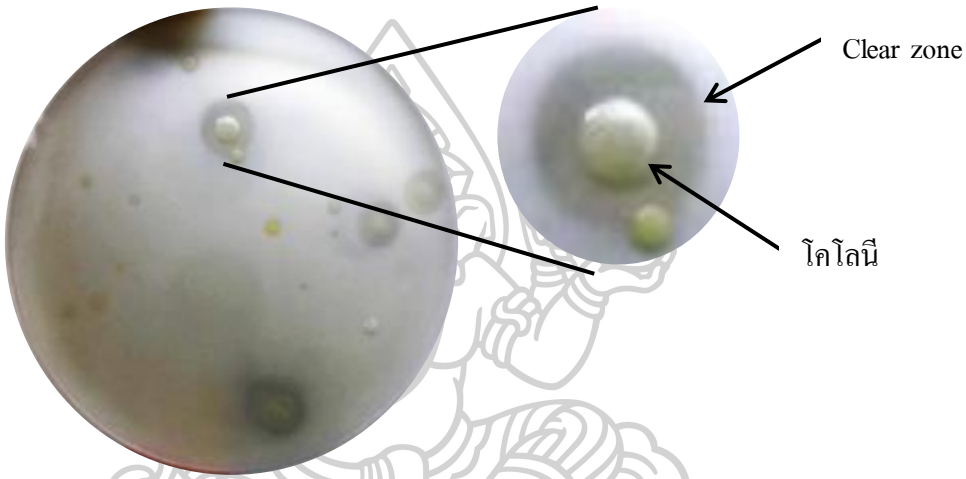

ภาพที่ 12 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 2 (B) ตำแหน่งที่ 3 (C) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท)




ภาพที่ 13 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 2 (B) ตำแหน่งที่ 3 (C) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท)

**4.5 ชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส**

การสำรวจชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้อาหาร NA+milk ที่มีการเติม 1% NaCl ถ้าแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ จะย่อยเคซีนในนมให้มีขนาดเล็กลงได้ proteose peptone, peptide และ amino acid (แสงผ่านได้) จึงเกิดเป็นบริเวณใสรอบๆโคโลนี(clear zone) (ภาพที่ 14)




ภาพที่ 14 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์บนอาหาร NA+milk+1% NaCl โดยเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตและหลั่งเอนไซม์โปรตีเอสออกมานอกเซลล์ จะเกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone)

จากผลการศึกษาพบว่าในตัวอย่างน้ำพบเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์มากที่สุดคือตำแหน่งที่ 4 (80.19%) รองลงมาคือตำแหน่งที่ 3 (24.52%) และน้อยที่สุดคือตำแหน่งที่ 2 (14.29%) (ตารางที่ 8) ในตัวอย่างดินตะกอนพบเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์มากที่สุดคือในตำแหน่งที่ 4 (97.14%) รองลงมาคือตำแหน่งที่ 2 (4.32%) ส่วนในตำแหน่งที่ 3 ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าในตำแหน่งที่ 2 และ 3 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ในตัวอย่างน้ำสูงกว่าในตัวอย่างดินตะกอน ซึ่งตรงกันข้ามกับในตำแหน่งที่ 4 ที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ในตัวอย่างดินตะกอนสูงกว่าในตัวอย่างน้ำ จากการศึกษาพบว่าขนาดของ proteolytic index สูงที่สุดในตำแหน่งที่ 2 อยู่ในช่วง 1.3-6.7 (ตารางที่ 9) รองลงมาคือตำแหน่งที่ 3 อยู่ในช่วง 1.4-4.5 และน้อยที่สุดในตำแหน่งที่ 4 อยู่ในช่วง 2.3-3.0

ตารางที่ 8 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ที่คัดแยกได้จากตำแหน่งต่างๆ

| ตำแหน่ง | จำนวนโคโลนีที่เกิด clear zone (จำนวนโคโลนีทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ) | | ร้อยละของโคโลนีที่มีการผลิตเอนไซม์ | |
|---|---|---|---|---|
| | ตัวอย่างน้ำ | ตัวอย่างดิน | ตัวอย่างน้ำ | ตัวอย่างดิน |
| 1 | N/D | N/D | N/D | N/D |
| 2 | 22(154) | 6(139) | 14.29 | 4.32 |
| 3 | 51(208) | 0 | 24.52 | 0 |
| 4 | 85(106) | 68(70) | 80.19 | 97.14 |

หมายเหตุ N/D = not determined

ตารางที่ 9 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนในตำแหน่งต่างๆและ proteolytic index

| ตำแหน่ง | กลุ่มเชื้อที่พบ(จีนัส) | จำนวนไอโซเลท (ร้อยละ) | ช่วงของ proteolytic index * |
|---|---|---|---|
| 1 | N/D | N/D | N/D |
| 2 | *Vibrio* | 8(21) | 1.1-4.5 |
| | *Aeromonas* | 5(13) | 2.8-3.5 |
| | *Citrobacter* | 3(8) | 3.0-5.5 |
| | *Lactobacillus* | 3(8) | 2.0-2.8 |
| | *Bacillus* | 3(8) | 1.2-6.7 |
| | *Streptococcus* | 3(8) | 2.3-3.5 |
| | *Macrococcus* | 3(8) | 1.3-3.0 |
| | *Gemella* | 2(5) | 2.3-4.5 |
| | *Photobacterium* | 1(3) | 2.3 |
| | *Paenibacillus* | 1(3) | 1.1 |
| | *Staphylococcus* | 1(3) | 4.0 |
| | *Klebsiella* | 1(3) | 4.5 |
| | *Brevibacterium* | 1(3) | 7.0 |
| | *Corynebacterium* | 1(3) | 3.0 |
| | *Xenohabdus* | 1(3) | 3.0 |
| | รวมไอโซเลททั้งหมด | 37 ไอโซเลท | |
| 3 | *Bacillus* | 8(61) | 1.4-4.5 |
| | *Aeromonas* | 2(15) | 3.3-5.0 |
| | *Pseudomonas* | 1(8) | 4.0 |
| | *Paenibacillus* | 1(8) | 3.0 |
| | *Staphylococcus* | 1(8) | 4.0 |
| | รวมไอโซเลททั้งหมด | 13 ไอโซเลท | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 4 | *Bacillus* | 1(50) | 2.3 |
| | *Neisseria* | 1(50) | 3.0 |
| | รวมไอโซเลททั้งหมด | 2 ไอโซเลท | |
| รวมไอโซเลททั้งหมดทุกตำแหน่ง | | 52 ไอโซเลท | |

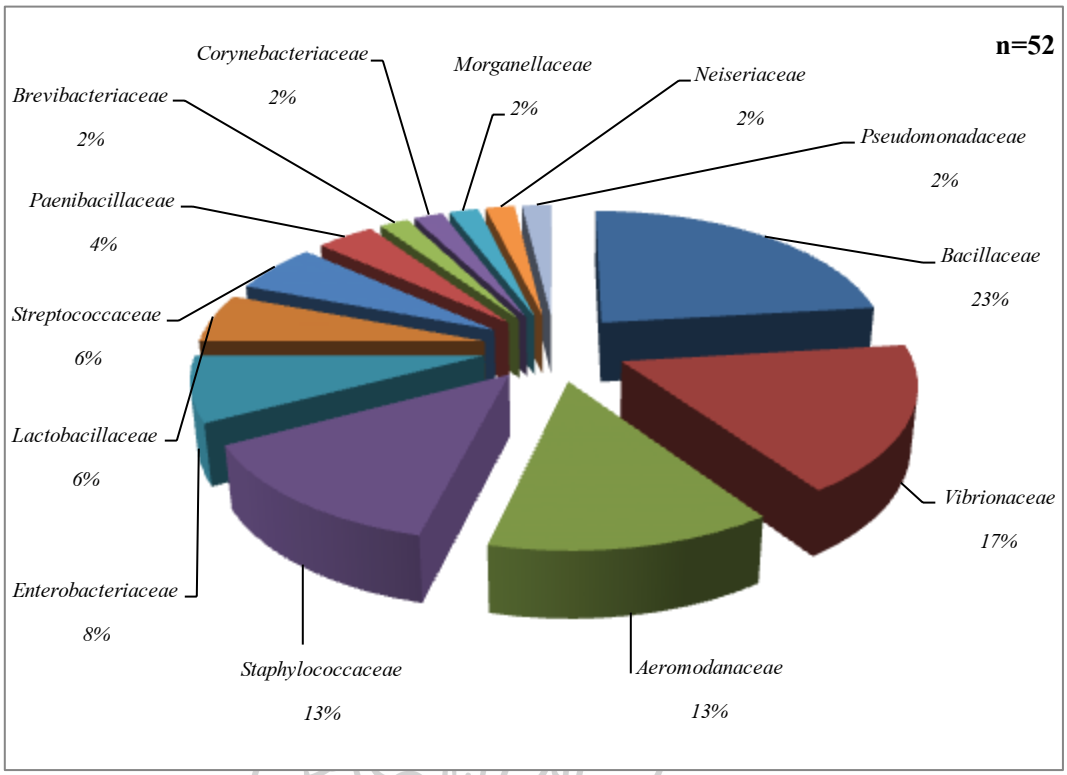
หมายเหตุ *คำนวณจาก ขนาดของ precipitation zone รวมขนาดโคโลนี(cm.)/ขนาดโคโลนี(cm.)

N/D = not determined

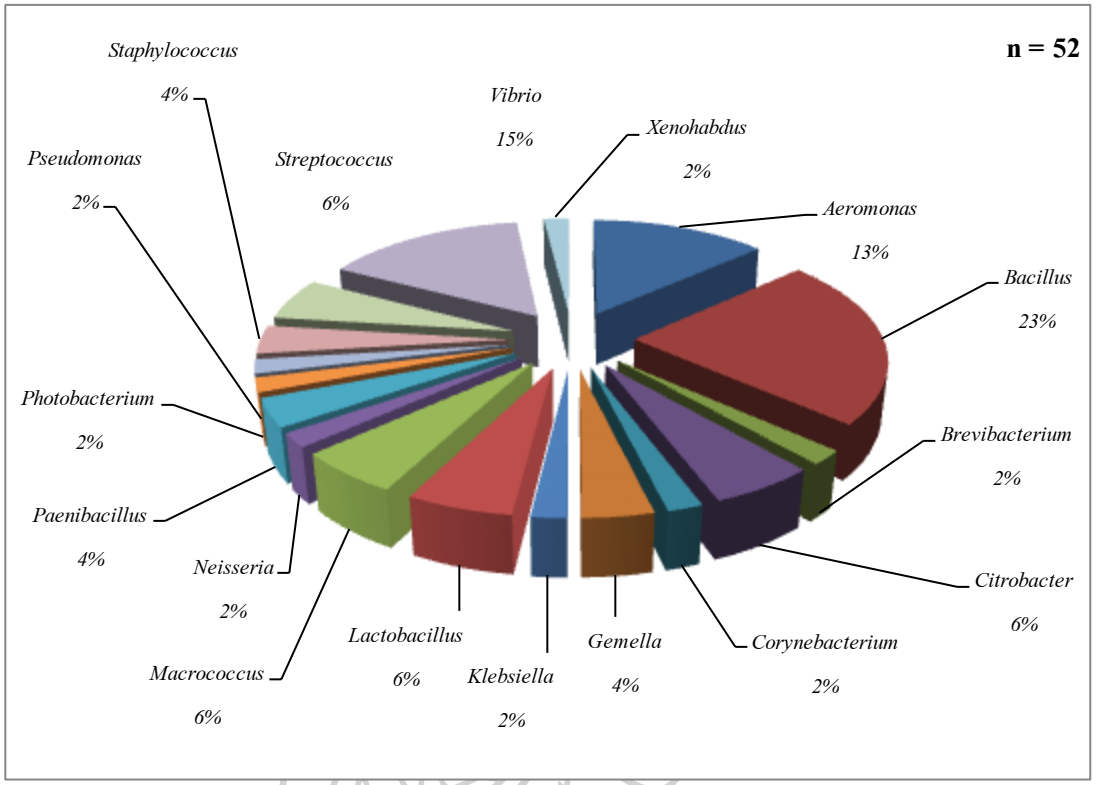
จากผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและโปรแกรม Bacterial identification – ABIS online ของแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนคลองถูปชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ทั้งหมด 52 ไอโซเลท

ทั้งนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 13 แฟมิลี่ (ภาพที่ 15) ดังนี้ *Aeromodanaceae, Bacillaceae, Brevibacteriaceae, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillacea, Morganellaceae, Neiseriaceae, Paenibacillaceae, Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae, Vibrionaceae* โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Bacillaceae* พบ 12 ไอโซเลท (23%) อันดับสองคือ *Vibrionaceae* พบ 9 ไอโซเลท (17%) และ *Aeromonaceae, Staphylococcaceae* พบแฟมิลี่ละ 7 ไอโซเลท (แฟมิลี่ละ13%)

ทั้งนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 17 จีนัส (ภาพที่ 16) ดังนี้ *Aeromonas, Bacillus, Brevibacterium, Citrobacter, Corynebacterium, Gemella, Klebsiella, Lactobacillus, Macrococcus, Neisseria, Paenibacillus, Photobacterium, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Vibrio, Xenohabdus* โดยจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Bacillus* พบ 12 ไอโซเลท (23%) รองลงมาคือ *Vibrio* พบ 8 ไอโซเลท (15%) และ *Aeromonas* พบ 7 ไอโซเลท (13%)




ภาพที่ 15 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร NA+milk+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท)

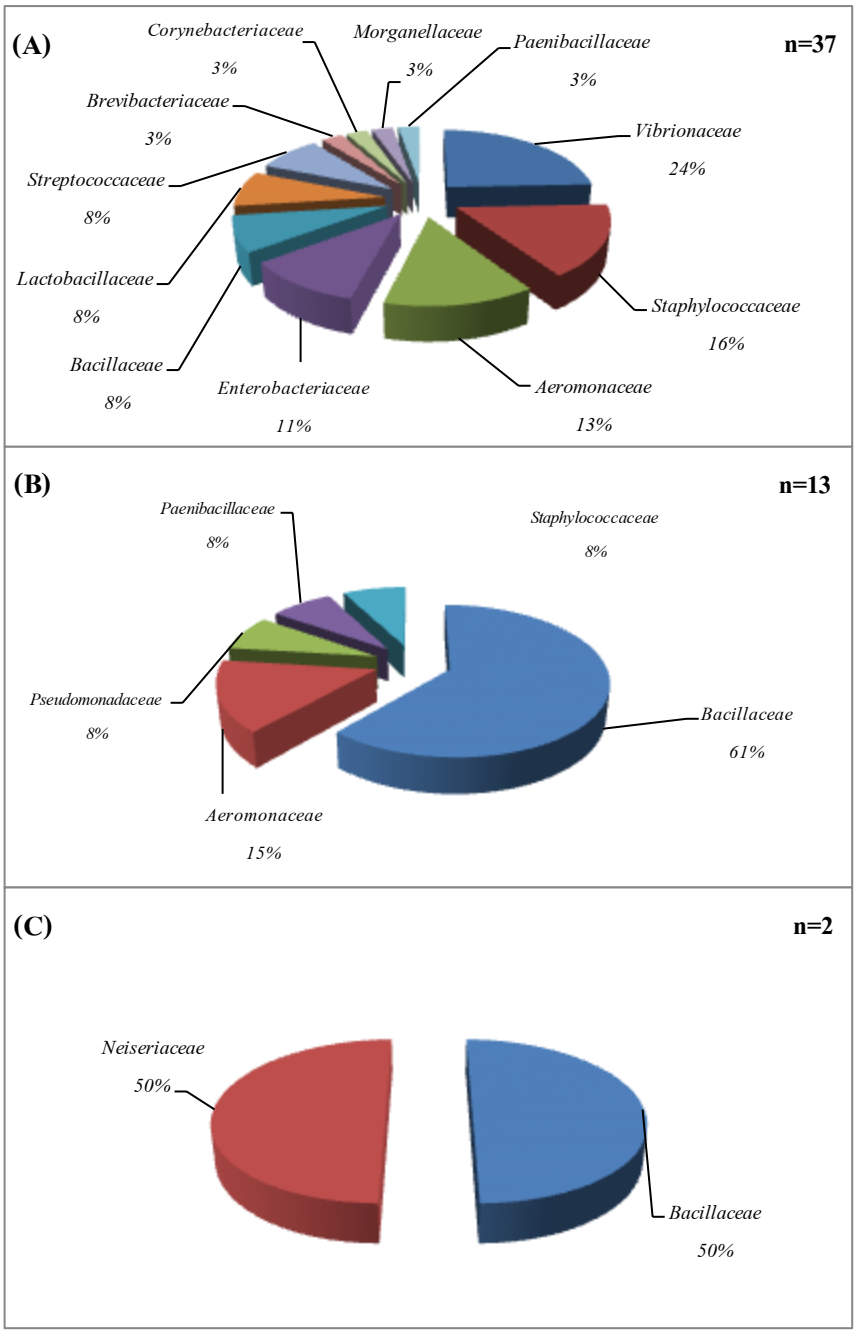



ภาพที่ 16 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร NA+milk+1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (n= จำนวนไอโซเลท)

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 2 คัดเลือกไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ทั้งหมด 37 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 11 แฟมิลี่ (ภาพที่ 17A) และ 15 จีนัส (ภาพที่ 18A) โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Vibrionaceae* พบ 9 ไอโซเลท (24%) อันดับสองคือ *Staphylococcaceae* พบ 6 ไอโซเลท (16%) และ *Aeromonaceae* พบ 5 ไอโซเลท (13%) และจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Vibrio* พบ 8 ไอโซเลท (21%) อันดับสองคือ *Aeromonas* พบ 5 ไอโซเลท (13%) และ *Citrobacter, Lactobacillus, Bacillus, Streptococcus, Macrococcus* พบจีนัสละ 3 ไอโซเลท (จีนัสละ 8%)

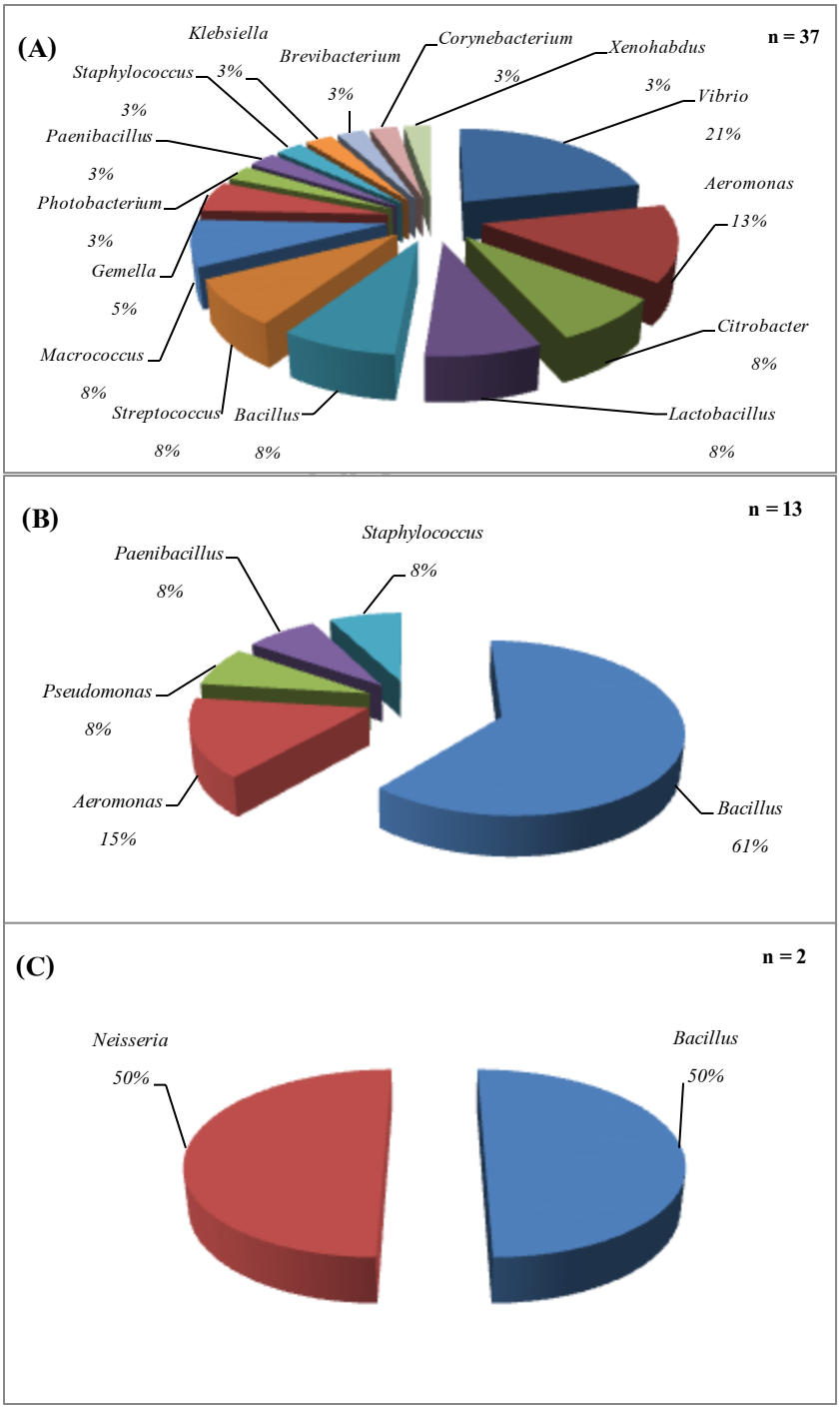
การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 3 คัดเลือกไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ทั้งหมด 13 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 5 แฟมิลี่ (ภาพที่ 17B) และ 5 จีนัส (ภาพที่ 18B) โดยแฟมิลี่ที่พบมากที่สุดคือ *Bacillaceae* พบ 8 ไอโซเลท (61%) รองลงมาคือคือ *Aeromonaceae* พบ 2 ไอโซเลท (15%) และจีนัสที่พบมากที่สุดคือ *Bacillus* พบ 8 ไอโซเลท (61%) รองลงมาคือ *Aeromonas* พบ 2 ไอโซเลท (15%)

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียตำแหน่งที่ 4 คัดเลือกไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ทั้งหมด 2 ไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียอยู่ใน 2 แฟมิลี่ (ภาพที่ 17C) และ 2 จีนัส (ภาพที่ 18C) โดยพบ *Bacillaceae*, *Neiseriaceae* พบแฟมิลี่ละ 1 ไอโซเลท (แฟมิลี่ละ 50%) และจีนัสที่พบคือ *Bacillus, Neisseria* พบจีนัสละ 1 ไอโซเลท (จีนัสละ 50%)




ฯ

ภาพที่ 17 แฟมิลี่และร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร NA+milk +1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 2 (B) ตำแหน่งที่ 3 (C) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท)




ภาพที่ 18 จีนัสและร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและหลั่งออกมานอกเซลล์ บนอาหาร NA+milk +1% NaCl ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (A) ตำแหน่งที่ 2 (B) ตำแหน่งที่ 3 (C) ตำแหน่งที่ 4 (n= จำนวนไอโซเลท)

**4.6 ศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียในป่าชายเลนต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์โปรตีเอส**

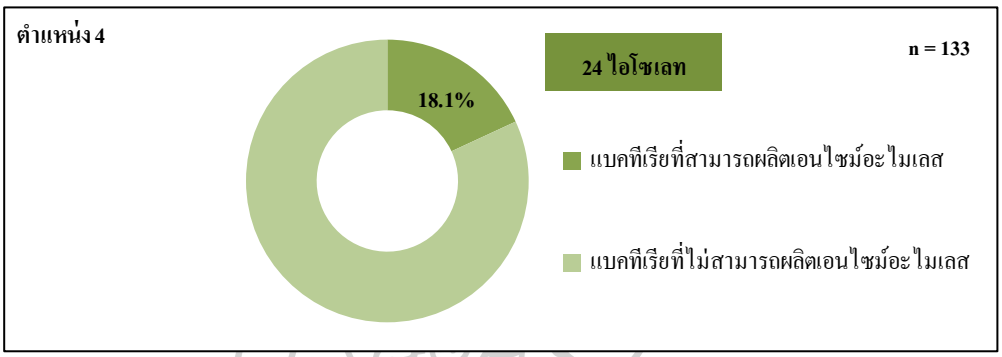
จากการศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองถูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสามชนิดได้ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาร้อยละของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดในป่าชายเลนแต่ละตำแหน่ง พบว่ามีสัดส่วนของเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันออกไป ดังนี้

ศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ในตำแหน่งที่ 4 พบจำนวนแบคทีเรีย 133 ไอโซเลทโดยมีแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส 24 ไอโซเลท คิดเป็น 18.1% (ภาพที่ 19)

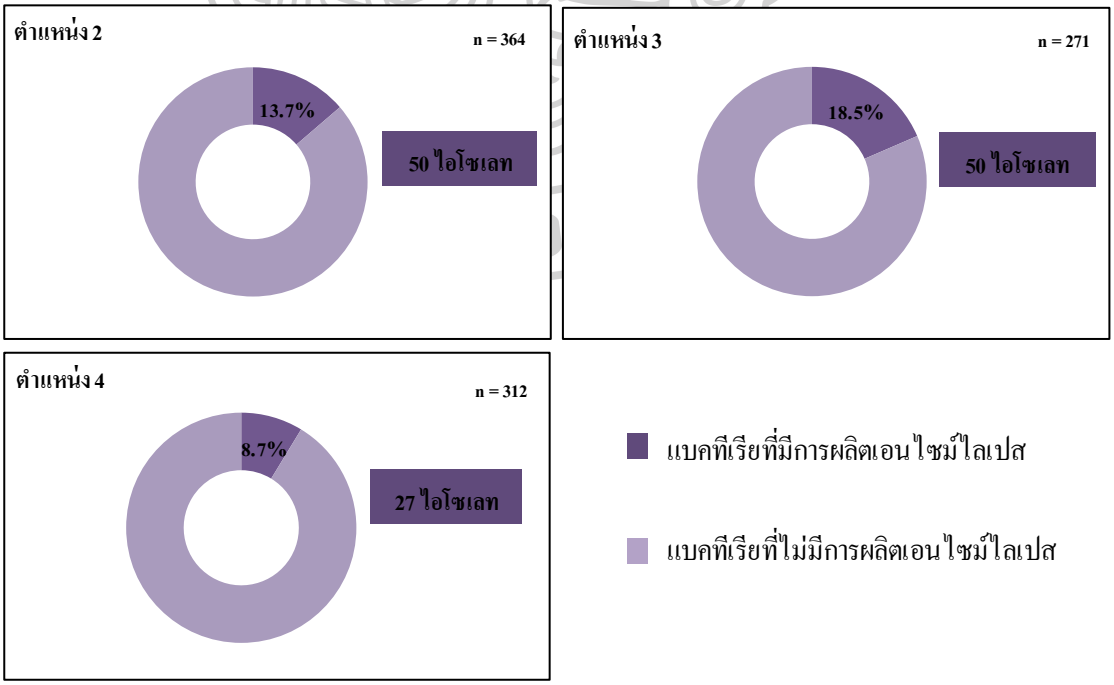
ศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส ในตำแหน่งที่ 2 พบแบคทีเรียจำนวน 364 ไอโซเลทโดยมีแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส 50 ไอโซเลท คิดเป็น 13.7% ในตำแหน่งที่ 3 พบแบคทีเรียจำนวน 271 ไอโซเลทโดยมีแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส 50 ไอโซเลท คิดเป็น 18.5% ในตำแหน่งที่ 4 พบแบคทีเรียจำนวน 312 ไอโซเลทโดยมีแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส 27 ไอโซเลท คิดเป็น 8.7% (ภาพที่ 20)

ศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ในตำแหน่งที่ 2 พบแบคทีเรียจำนวน 293 ไอโซเลทโดยมีแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส 28 ไอโซเลท คิดเป็น 9.6% ในตำแหน่งที่ 3 พบแบคทีเรียจำนวน 208 ไอโซเลทโดยมีแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส 51 ไอโซเลท คิดเป็น 24.5% ในตำแหน่งที่ 4 พบแบคทีเรียจำนวน 176 ไอโซเลทโดยมีแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส 153 ไอโซเลท คิดเป็น 86.9% (ภาพที่ 21)

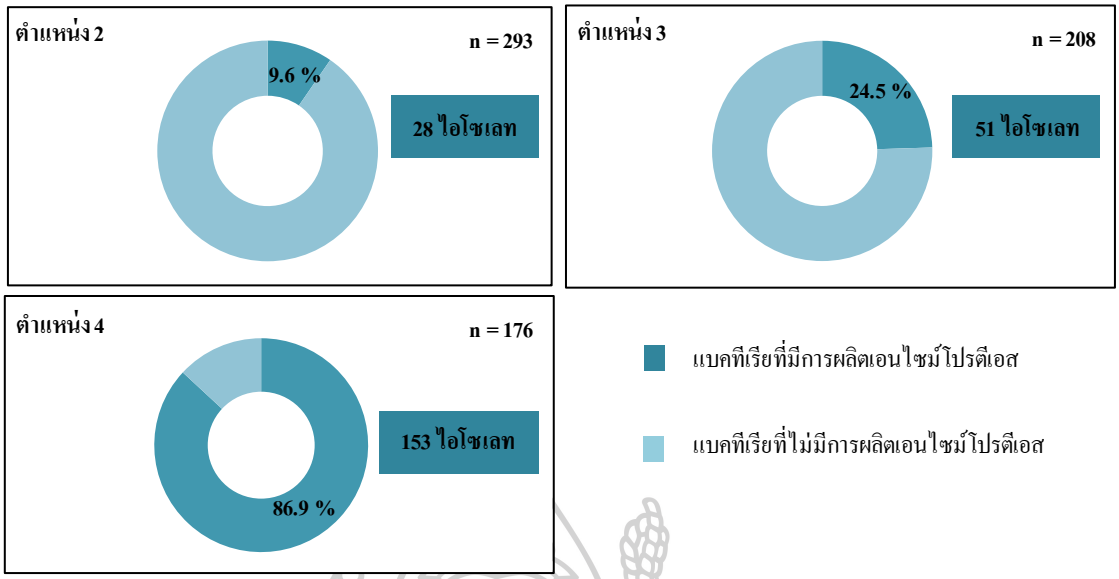
ศักยภาพเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์สำคัญในอุตสาหกรรม ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอน ในแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบแบคทีเรีย 133 ไอโซเลท โดยพบแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ 24 ไอโซเลท คิดเป็น 18.1% ในแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบแบคทีเรีย 947 ไอโซเลท โดยพบแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 127 ไอโซเลท คิดเป็น 13% และในแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส พบแบคทีเรีย 677 ไอโซเลท พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ 232 ไอโซเลท คิดเป็น 32.3% (ภาพที่ 22)



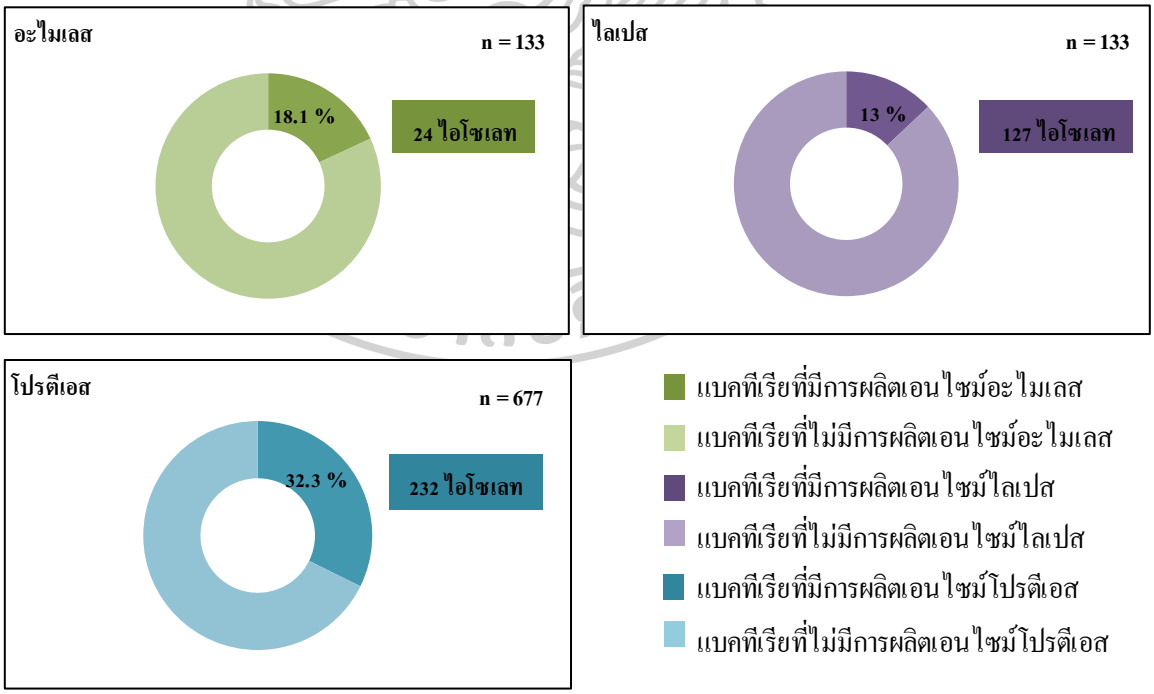

ภาพที่ 19 ร้อยละของไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส




ภาพที่ 20 ร้อยละของไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส




ภาพที่ 21 ร้อยละของไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส




ภาพที่ 22 ร้อยละของไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์สำคัญในอุตสาหกรรม ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอน

จากการสำรวจ พบว่าความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์มากที่สุด คือเอนไซม์โปรตีเอส อันดับสองคือเอนไซม์ไลเปส และน้อยที่สุดคือเอนไซม์อะไมเลส จากผลการทดลองพบว่า ในการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ ในตำแหน่งที่ 4 พบปริมาณเชื้อที่มากที่สุดคือจีนัส *Corynebacterium* และ *Pasteurella* ในการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เปสได้ พบปริมาณเชื้อมากที่สุด ในตำแหน่งที่ 2 คือจีนัส *Serratia* ในตำแหน่งที่ 3 คือจีนัส *Bacillus* และในตำแหน่งที่ 4 คือจีนัส *Paeudomonas* และแบคทเรียที่มี lipolytic index สูงที่สุดคือจีนัส *Serratia* ในตำแหน่งที่ 2 ในการศึกษาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ พบปริมาณเชื้อมากที่สุด ในตำแหน่งที่ 2 คือจีนัส *Vibrio* ในตำแหน่งที่ 3 คือจีนัส *Bacillus* และในตำแหน่งที่ 4 คือจีนัส *Bacillus* และแบคทเรียที่มี proteolytic index สูงที่สุดคือจีนัส *Bacillus* ในตำแหน่งที่ 2

ตารางที่ 10 เชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์สำคัญในอุตสาหกรรมที่พบในแต่ละตำแหน่ง

| ตำแหน่ง | เอนไซม์อะไมเลส | เอนไซม์ไลเปส | เอนไซม์โปรตีเอส |
|---|---|---|---|
| 2 | 0 | (n=14)<br>*Aeromonas, Bacillus*<br>*Lysinibacillus*<br>*Paenibacillus*<br>*Photorhabdus*, *Proteus,*<br>*Serratia*, *Shigella,*<br>*Vibrio* | (n=37)<br>*Aeromonas, Bacillus*<br>*Brevibacterium*<br>*Citrobacter*<br>*Corynebacterium*<br>*Gemella, Klebsiella*<br>*Lactobacillus*<br>*Macrococcus*<br>*Paenibacillus*<br>*Photobacterium*<br>*Staphylococcus*<br>*Streptococcus*<br>*Vibrio, Xenohabdus* |
| 3 | 0 | (n=7)<br>*Bacillus, Paenibacillus* | (n=13)<br>*Aeromonas*, *Bacillus*<br>*Paenibacillus*<br>*Pseudomonas*<br>*Staphylococcus* |
| 4 | (n=8)<br>*Corynebacterium*<br>*Pasteurella,Photohabdus*<br>*Pseudomonas* | (n=10)<br>*Lactobacillus,*<br>*Pasteurella*<br>*Pseudomonas*<br>*Streptococcus* | (n=2)<br>*Bacillus, Neisseria* |

หมายเหตุ n= จำนวนไอโซเลท

มหาวิทยาลัยศิลปากร

**4.7 การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจากสวนป่าชายเลนคลองกูปชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี**

จากการสำรวจชนิดและปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยใช้อาหาร ISP-2 ที่มีการเติม 1% NaClและศึกษาสัณฐานวิทยาโดยสังเกตโคโลนีที่มีลักษณะฝุ่นคล้ายผงชอล์ค สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท ผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล The Nation Center for Biotechnology โดยใช้อัลกอริทึม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Ribosomal Database Project (RDP) และ EzBioCloud พบว่าเป็น *Streptomyces* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท *Bacillus* sp. 1 ไอโซเลท และพบ rare actinomycetes 1 ไอโซเลท คือ *Micromonospora* sp.(ตารางที่ 11)

Isolate A โคโลนีมีลักษณะ สีขาวทึบ ไมโปร่งใส ขอบขรุขระและมีสปอร์สีดำขึ้นบริเวณผิวหน้าและขอบของโคโลนี ซึ่งผลจากการจำแนกชนิดคือ *Streptomyces platensis* (ภาพที่ 20A)

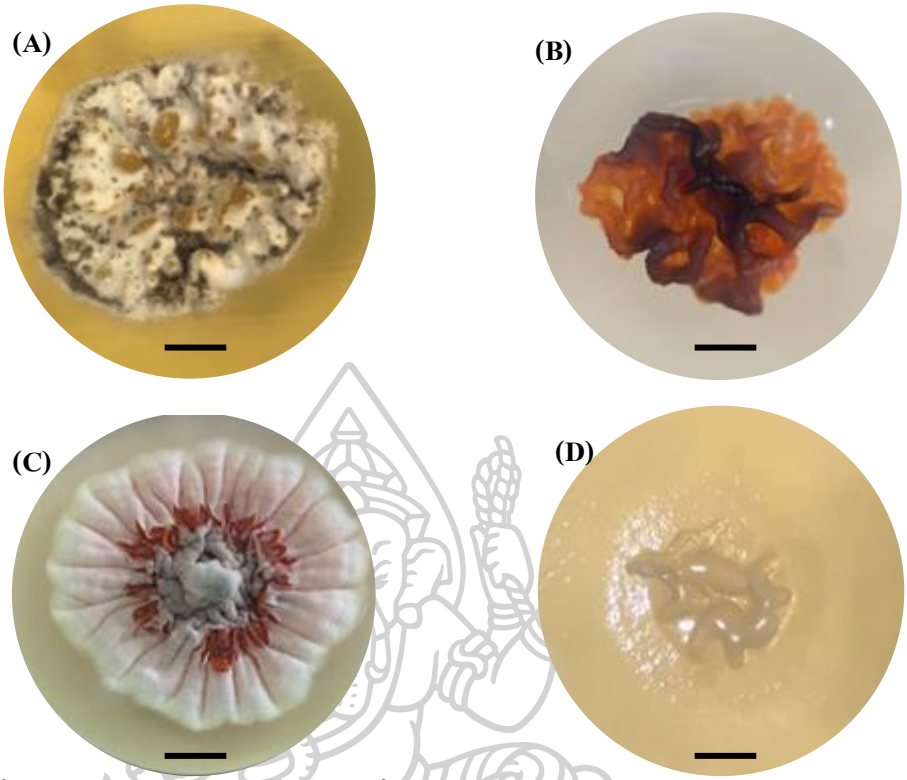
Isolate B โคโลนีมีขนาดเล็กสีส้ม ขรุขระเป็นรอยหยัก ขอบขรุขระ มีสีดำเกิดขึ้นบ้างส่วนของบริเวณโคโลนี ซึ่งผลจากการจำแนกชนิดคือ *Micromonospora* sp A38. (ภาพที่ 20B)

Isolate C โคโลนีมีขนาดใหญ่สีขาวและสีแดง ตรงกลางมีกลุ่มสปอร์สีเทา ขอบขรุขระเป็นรอยหยัก เมื่อมีอายุมากขึ้นตรงกลางมีรอยแตกของโคโลนีทำให้เห็นสีแดงชัดเจนขึ้น ซึ่งผลจากการจำแนกชนิดคือ *Streptomyces* sp. NA03103 (ภาพที่ 20C)

Isolate D โคโลนีขนาดเล็ก มีสีขาวเกือบโปร่งใส ตรงกลางมีลักษณะรอยหยัก ขอบกลมและเรียบ ซึ่งผลจากการจำแนกคือ *Bacillus velezensis* strain KKLW (ภาพที่ 20D)

ตารางที่ 11การจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยเปรียบเทียบความเหมือนของยีนส่วน 16S rRNA ในฐานข้อมูล BLAST database , EzBiocloud และ RDP classifier

| **Isolate** | **Best blast match with known taxa by BLAST (% identity)** | **Top-hit taxon by EzBioCloud (% similarity)** | **Genus predicted by RDP classifier at 95% confidence threshold (% probability)** |
|---|---|---|---|
| A | *Streptomyces plantensis* strain ATCC 23948 (100.00%) | *Streptomyces platensis* JCM 4662 (99.93%) | *Streptomyces* (100%) |
| B | *Micromonospora* sp. A38 (100.00%) | *Micromonospora fluminis* A38 (100.00%) | *Micromonospora* (100%) |
| C | *Streptomyces* sp. NA03103 (100.00%) | *Streptomyces ardesiacus* (99.65%) | *Streptomyces* (100%) |
| D | *Bacillus velezensis* strain KKLW (100.00%) | *Bacillus velezensis* CR-502 (99.86%) | *Bacillus* (100%) |




ภาพที่ 23 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่มีการสร้าง aerial mycelium บนอาหาร ISP-2 +1% NaCl อายุ 7 วัน ที่แยกได้จากน้ำและดินตัวอย่างบริเวณสวนป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยแสดงลักษณะโคโลนีของ (A) *Streptomyces platensis* (B) *Micromonospora* sp. A38 (C) *Streptomyces* sp. NA03103 (d) *Bacillus velezensis* strain KKLW

(━━ = 0.1 mm)

# บทที่ 5

## สรุปและอภิปรายผลทดลอง

การศึกษานี้ทำการสำรวจสถานะด้านจุลชีววิทยาของป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ซึ่งตั้งอยู่ใกล้กับบริเวณแหล่งท่องเที่ยวชื่อดังอย่างพัทยาและยังตั้งอยู่ในโครงการเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก (EEC) โดยป่าชายเลนนี้ยังตั้งอยู่ในบริเวณรอยต่อระหว่างพื้นที่ชุ่มน้ำที่มีต้นธูปฤาษี(*Typga angustifolia* L.)กับอ่าวสัตหีบ โดยในงานวิจัยของเราใช้อาหาร NA ที่มีการเติม 1% NaCl เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนต่อความเค็มได้ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ามีความแตกต่างของกลุ่มแบคทีเรียในแต่ละตำแหน่ง และยังพบความแตกต่างของกลุ่มแบคทีเรียในแต่ละตำแหน่งโดยในตำแหน่งที่ 1(n=36) พบแบคทีเรียที่โดดเด่นได้แก่ *Paenibacillus* (36%), *Lactobacillus* (17%), *Aeromonas* (11%) และ*Aliivibrio*(11%) ในตำแหน่งที่ 2 (n=66)พบแบคทีเรียที่โดดเด่นคือ *Vibrio* (15%), *Aeromonas* (9%), *Serratia* (9%), *Bacillus* (6%), *Citrobacter* (6%) และ *Paenibacillus* (6%) ซึ่งในตำแหน่งที่ 1 และ 2 ยังเป็นพื้นที่ในบริเวณใกล้กับพื้นที่ชุมน้ำที่มีต้นธูปฤาษี โดยมีการรายงานว่าสามารถแยกเชื้อจีนัส *Paenibacillus* และจีนัส *Aeromonas* ได้จากบริเวณพื้นชุมน้ำที่มีต้นธูปฤาษีอยู่ (Kong et al., 2013; Li et al., 2013) ในตำแหน่งที่ 3 (n=37)พบแบคทีเรียที่โดดเด่นได้แก่ *Bacillus* (67%), *Paenibacillus* (11%), *Aeromonas* (5%) และ *Staphylococcus* (5%) ในตำแหน่งที่ 4 (n=23)พบแบคทีเรียที่โดดเด่นได้แก่ *Pasteurella* (31%), *Pseudomonas* (31%), *Corynebacterium* (13%) และ *Lactobacillus* (9%) ซึ่งในตำแหน่งที่ 3 และ 4 เป็นบริเวณที่อยู่ใกล้กับปากแม่น้ำกับทะเลของป่าชายเลนแห่งนี้ และได้มีการรายงานว่าแบคทีเรียเหล่านี้มักพบในสภาพแวดล้อมทางทะเลและปากแม่น้ำ (Evangelista-Barreto et al., 2010; Frette et al., 2004; Gunn and Colwell, 1983)ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนจำนวนมากอยู่ในกลุ่ม phosphate-solubilizing bacteria เช่นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus, Kluyvera, Paenibacillus, Pseudomonas* และ *Vibrio* (Teymouri et al., 2016; Thatoi et al., 2013; Vazquez et al., 2000)

จากการสำรวจของผู้วิจัยระหว่างการเก็บตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนพบการอาศัยของสัตว์น้ำ เช่น ปูและปลาชนิดต่างๆเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นหลักฐานที่บ่งชี้ถึงสถานะของป่าชายเลนในด้านความหลากหลายทางชีวภาพที่ยังค่อนข้างสูง จากข้อมูลลักษณะทางกายภาพของป่าชาย

เลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี พบว่ามีตำแหน่งอยู่ใกล้หรืออยู่ในแหล่งชุมชนที่มีการตั้งบ้านเรือน ร้านอาหาร หรือใกล้กับสถานที่ท่องเที่ยวที่มีนักท่องเที่ยวเป็นจำนวนมาก ผลการสำรวจด้วยอาหาร Eosin methylene blue (EMB) และการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ผลปรากฏว่าไม่พบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มได้แก่ enterococci และ *Escherichia coli* แสดงให้เห็นว่าป่าชายเลนแห่งนี้มีการปนเปื้อนของน้ำทิ้งจากครัวเรือนหรือจากชุมชนน้อย (Abbu and Lyimo, 2007)

จากการสำรวจชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อจีนัส *Pseudomoas* โดยมีค่า amylolytic index อยู่ที่ 1.4 มีวิจัยของ Klingfoong et al. (2022) ทำการคัดแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากป่าชายเลนพระเจดีย์กลางน้ำ จังหวัดระยอง พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น จีนัส *Pseudomonas* โดยมีค่า amylolytic index อยู่ที่ 3.79 นอกจากนี้มีงานวิจัยที่คัดแยกเชื้อจาก Luang-In et al. (2019) จำแนกเชื้อในป่านาสีนวน จังหวัดมหาสารคาม โดยสามารถจำแนกเชื้อได้เป็นเชื้อจีนัส *Bacillus* โดยมีช่วง amylolytic index อยู่ในช่วง 1.18-.171 นอกจากนี้งานวิจัยของ Castro et al. (2014) คัดแยกเชื้อในป่าชายเลนประเทศบราซิล โดยสามารถจำแนกเชื้อได้เป็นจีนัส *Novosphingobium* ซึ่งมีค่า amylolytic index สูงสุดอยู่ที่ 2.78 แต่ในงานวิจัยของเรานั้นสามารถคัดแยกและจำแนกเชื้อได้คือ เชื้อจีนัส *Pasteurella* โดยมีค่า amylolytic index สูงสุดอยู่ที่ 9.0

จากการสำรวจชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อจีนัส *Serratia* โดยมีค่า lipolytic index อยู่ที่ 10.0 มีงานวิจัยของ Kumar and Thakur (2020) ที่ทำการคัดแยกเชื้อจากป่าชายเลนในประเทศบราซิล โดยสามารถจำแนกเชื้อได้เป็นเชื้อจีนัส *Erwinia* โดยมีค่า lipolytic index สูงที่สุดอยู่ที่ 6.83

จากการสำรวจชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อจีนัส *Bacillus* โดยมีค่า proteolytic index สูงสุดอยู่ที่ 6.7 มีงานวิจัยของ Castro et al. (2014) ที่ทำการคัดแยกเชื้อจากป่าชายเลนในประเทศบราซิล โดยสามารถจำแนกเชื้อได้เป็นจีนัส *Curtobacterium* โดยมีค่า proteolytic index สูงที่สุดอยู่ที่ 2.75 นอกจากนี้ในประเทศไทยมีงานวิจัยที่ศึกษาศักยภาพของ *Bacillus* spp. จากป่าชายเลน เช่น *Bacillus aquimaris* strain TF-12 และ *B.*

*arabhattai* strain B8W22 ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ปริมาณสูง (clear zone > 10 mm.) (Foophow and Tangjitaroenkun, 2014)

จากการสำรวจเชื้อแอคติโนมัยซีทพบว่าไอโซเลท A มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces platensis* ได้มีการรายงานว่าสามารถผลิตสาร iso-migrastation เป็นผลิตภัณฑ์หลัก รวมถึงกลุ่มสารต้านจุลชีพอื่นๆ ได้แก่ oxytetracyclin, platensimycin, magrastatin, isomigrastatin, platencin, dorrigocin A&B และ terramycine การทดสอบฤทธิ์การทำงานของ platencin พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม Gram-positive ได้หลายชนิด (Ju et al., 2005; Smanski et al., 2012) และยังสามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotinia sclerotiorum* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในต้นข้าวและผักกาดก้านขาว อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในสตรอเบอร์รี่ (Wan et al., 2008)

จากการสำรวจเชื้อแอคติโนมัยซีทพบว่าไอโซเลท B มีความใกล้เคียงกับ *Micromonospora* sp.A38 ถูกจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่คือ *Micromonospora fluminis* sp. nov. (Camacho Pozo et al., 2020) เชื้อแบคทีเรียนี้ถูดแยกได้ครั้งแรกจากแม่น้ำ Carpintero ประเทศคิวบา แต่ในการศึกษานี้ค้นพบจากสภาพแวดล้อมทางทะเล ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อชนิดนี้มีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ต่างกันได้ดี อย่างไรก็ตามยังไม่พบการรายงานถึงการศึกษาเกี่ยวกับการศึกษายีโนมของแบคทีเรียหรือการผลิตสารทุติยภูมิของแบคทีเรีย จึงจัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจเป็นอย่างมากที่อาจจะพบสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ

จากการสำรวจเชื้อแอคติโนมัยซีทพบว่าไอโซเลท C มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces* sp. NA03103 พบorphan nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene cluster (asm) ที่ให้ผลผลิตภัณฑ์เป็น ashimides A และ B ที่เป็นสารกลุ่ม cyclopeptides ชนิดใหม่ซึ่งมีฤทธิ์ cytotoxicity (Shi et al., 2019) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ยีโนมของแบคทีเรียด้วยโปรแกรม antiSMASH v5.2.0 ยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิอื่นๆ เช่น nonribosomal peptides, terpenes, lathipeptides และสารต้านจุลชีพชนิด pluramycin ซึ่งอยู่ในกลุ่ม polyketides ทั้งนี้ *Streptomyces* sp. NA03103 ถูกจัดว่าเป็น potential rich producer สำหรับ marine natural product ที่น่าจับตาอีกสายพันธุ์หนึ่ง

จากการจำแนกชนิดพบว่าไอโซเลท D มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus velezensis* โดยมีรายงานหลายฉบับรายงานถึงผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจที่ผลิตโดย *B. velezensis* เช่น สารที่มีฤทธิ์เป็น surfactant สารต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคในพืช สารเร่งการเจริญเติบโตของพืช สารต้านจุลชีพ สารประกอบ iron chelators สารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านมะเร็ง (Aloo et al., 2019; Meena et al., 2018; Rabbee et al., 2019; Ruiz-Garcia et al., 2005)

จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า แม้ว่าจะมีตำแหน่งห่างจากพัทยา 36 กิโลเมตร แต่ป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ยังมีสถานะที่บริสุทธิ์ กล่าวคือไม่พบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่เป็นสาเหตุจากการปนเปื้อนของน้ำทิ้งจากครัวเรือนหรือจากชุมชนน้อย ซึ่งสามารถส่งเสริมนโยบายการพัฒนาแหล่งท่องเที่ยว โดยเป็นไปตามแนวทางแผนพัฒนาเศรษฐกิจภาคตะวันออก (EEC) นอกจากนี้ ป่าชายเลนคลองกูป ชุมชนจุกเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี ยังมีศักยภาพของจุลินทรีย์ในเชิงเทคโนโลยีชีวภาพ ในด้านการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์โปรตีเอส ที่มีศักยภาพ และการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ที่อาจจะมีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

# รายการอ้างอิง


Abbu, A., Lyimo, T.J., 2007. Assessment of fecal bacteria contamination in sewage and non-sewage impacted mangrove ecosystems along the coast of Dar Es Salaam. Tanzania Journal of Science 33.

Aloo, B.N., Makumba, B., Mbega, E.R., 2019. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. Microbiological Research 219, 26-39.

Bae, M., Kim, H., Shin, Y., Kim, B.Y., Lee, S.K., Oh, K.-B., Shin, J., Oh, D.-C., 2013. Separacenes A–D, novel polyene polyols from the marine actinomycete, Streptomyces sp. Marine drugs 11, 2882-2893.

Bharathi, D., Rajalakshmi, G., Komathi, S., 2019. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. Journal of King Saud University-Science 31, 898-901.

Camacho Pozo, M.I., Wieme, A.D., Rodríguez Pérez, S., Llauradó Maury, G., Peeters, C., Snauwaert, C., Lescaylle Veranes, Y., Peña Zamora, L., Schumann, P., Vandamme, P.A., 2020. Micromonospora fluminis sp. nov., isolated from mountain river sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 70, 6428-6436.

Castro, R.A., Quecine, M.C., Lacava, P.T., Batista, B.D., Luvizotto, D.M., Marcon, J., Ferreira, A., Melo, I.S., Azevedo, J.L., 2014. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. SpringerPlus 3, 1-9.

Chandra, P., Singh, R., Arora, P.K., 2020. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. Microbial Cell Factories 19, 1-42.

Das, A., Bhattacharya, S., Mohammed, A.Y.H., Rajan, S.S., 2014. In vitro antimicrobial activity and characterization of mangrove isolates of streptomycetes effective against bacteria and fungi of nosocomial origin. Brazilian Archives of Biology and Technology 57, 349-356.

Dias, A.C., Andreote, F.D., Rigonato, J., Fiore, M.F., Melo, I.S., Araújo, W.L., 2010. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. Antonie Van Leeuwenhoek 98, 541-551.

Evangelista-Barreto, N.S., Carvalho, F.C.T.d., Vieira, R.H.S., Dos Reis, C.M.F., Macrae, A., Rodrigues, D.d.P., 2010. Characterization of Aeromonas species isolated from an estuarine

environment. Brazilian Journal of Microbiology 41, 452-460.

Foophow, T., Tangjitaroenkun, J., 2014. Screening and identification of protease producing halophilic bacteria isolated from mangrove forest sediments in Chanthaburi, Proceedings of the 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, pp. 26-29.

Frette, L., Johnsen, K., Jørgensen, N.O., Nybroe, O., Kroer, N., 2004. Functional characteristics of culturable bacterioplankton from marine and estuarine environments. International Microbiology 7, 219-227.

Genilloud, O., 2017. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. Natural product reports 34, 1203-1232.

Ghanem, E.H., Al-Sayed, H.A., Saleh, K.M., 2000. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of Bacillus alcalophilus. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16, 459-464.

Gunn, B., Colwell, R., 1983. Numerical taxonomy of Staphylococci isolated from the marine environment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 33, 751-759.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry 38, 1599-1616.

Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology 64, 763-781.

Hong, K., Gao, A.-H., Xie, Q.-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H.-P., Yu, H.-P., Li, J., Yao, X.-S., Goodfellow, M., 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. Marine drugs 7, 24-44.

Ju, J., Lim, S.-K., Jiang, H., Seo, J.-W., Shen, B., 2005. Iso-migrastatin congeners from Streptomyces platensis and generation of a glutarimide polyketide library featuring the dorrigocin, lactimidomycin, migrastatin, and NK30424 scaffolds. Journal of the American Chemical Society 127, 11930-11931.

Kanimozhi, M., Johny, M., Gayathri, N., Subashkumar, R., 2014. Optimization and production of alpha-amylase from halophilic *Bacillus* species isolated from mangrove soil sources. Applied and Environmental Microbiology 2, 70-73.

Klingfoong, R., Thummasorn, C., Ungwiwatkul, S., Boontanom, P., Chantarasiri, A., 2022.

Diversity and activity of amylase-producing bacteria isolated from mangrove soil in Thailand. Biodiversitas Journal of Biological Diversity 23.

Kong, B.H., Liu, Q.F., Liu, M., Liu, Y., Liu, L., Li, C.L., Yu, R., Li, Y.H., 2013. Paenibacillus typhae sp. nov., isolated from roots of Typha angustifolia L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63, 1037-1044.

Kumar, V., Thakur, I.S., 2020. Biodiesel production from transesterification of Serratia sp. ISTD04 lipids using immobilised lipase on biocomposite materials of biomineralized products of carbon dioxide sequestrating bacterium. Bioresource Technology 307, 123193.

Li, Y.H., Zhu, J.N., Liu, Q.F., Liu, Y., Liu, M., Liu, L., Zhang, Q., 2013. Comparison of the diversity of root-associated bacteria in Phragmites australis and Typha angustifolia L. in artificial wetlands. World Journal of Microbiology and Biotechnology 29, 1499-1508.

Liang, J.-B., Chen, Y.-Q., Lan, C.-Y., Tam, N.F., Zan, Q.-J., Huang, L.-N., 2007. Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. Marine Biology 150, 739-747.

Luang-In, V., Yotchaisarn, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S., Maneewan, K., 2019. Isolation and identification of amylase-producing bacteria from soil in Nasinuan Community Forest, Maha Sarakham, Thailand. Biomedical and Pharmacology Journal 12, 1061-1068.

Mamangkey, J., Suryanto, D., Munir, E., Mustopa, A.Z., Sibero, M.T., Mendes, L.W., Hartanto, A., Taniwan, S., Ek-Ramos, M.J., Harahap, A., Verma, A., Trihatmoko, E., Putranto, W.S., Pardosi, L., Rudia, O.A.P., 2021. Isolation and enzyme bioprospection of bacteria associated to *Bruguiera cylindrica*, a mangrove plant of North Sumatra, Indonesia. Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands) 30, e00617.

Mamo, J., Assefa, F., 2018. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. Journal of Food Quality 2018.

Meena, K.R., Tandon, T., Sharma, A., Kanwar, S.S., 2018. Lipopeptide antibiotic production by Bacillus velezensis KLP2016. Journal of Applied Pharmaceutical Science 8, 091-098.

Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T.L., Agarwala, R., Schäffer, A.A., 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. Bioinformatics 24, 1757-1764.

My, N.T.H., Loan, T.T., Van Thuoc, D., 2021. High amylase production by a novel strain of Bacillus amyloliquefaciens M37 isolated from Can Gio Mangrove Forest, Vietnam. Biointerface

Research in Applied Chemistry 12, 4675.

Naidu, K.S., 2011. Characterization and purification of protease enzyme. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 107-112.

Rabbee, M.F., Ali, M.S., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C., Baek, K.-h., 2019. Bacillus velezensis: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. Molecules 24, 1046.

Ramsay, M.A., Swannell, R.P.J., Shipton, W.A., Duke, N.C., Hill, R.T., 2000. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. Marine Pollution Bulletin 41, 413-419.

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf, M., 2019. Microbial proteases applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 7, 110.

Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I., Quesada, E., 2005. Bacillus velezensis sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 191-195.

Sahoo, K., Dhal, N., 2009. Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: a review.

Sangkanu, S., Rukachaisirikul, V., Suriyachadkun, C., Phongpaichit, S., 2017. Evaluation of antibacterial potential of mangrove sediment-derived actinomycetes. Microbial pathogenesis 112, 303-312.

Shi, J., Zeng, Y.J., Zhang, B., Shao, F.L., Chen, Y.C., Xu, X., Sun, Y., Xu, Q., Tan, R.X., Ge, H.M., 2019. Comparative genome mining and heterologous expression of an orphan NRPS gene cluster direct the production of ashimides. Chemical Science 10, 3042-3048.

Singh, S., Sharma, V., Soni, M., Das, S., 2011. Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2, 486-496.

Smanski, M.J., Peterson, R.M., Shen, B., 2012. Platensimycin and platencin biosynthesis in Streptomyces platensis, showcasing discovery and characterization of novel bacterial diterpene synthases, Methods in enzymology. Elsevier, pp. 163-186.

Srivibool, R., Jaidee, K., Sukchotiratana, M., Tokuyama, S., Pathom-Aree, W., 2010. Taxonomic characterization of Streptomyces strain CH54-4 isolated from mangrove sediment. Annals of Microbiology 60, 299-305.

Taechowisan, T., Peberdy, J.F., Lumyong, S., 2003. Isolation of endophytic actinomycetes

from selected plants and their antifungal activity. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19, 381-385.

Teymouri, M., Akhtari, J., Karkhane, M., Marzban, A., 2016. Assessment of phosphate solubilization activity of Rhizobacteria in mangrove forest. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 5, 168-172.

Thangaraj, M., Ramesh, T., Kumaran, R., Annadurai, D., 2018. Production and preliminary optimization of lipase produced by Pseudomonas sp AA1 strain Isolated from mangrove sediment. International Journal of Research and Analytical reviews 5, 157-160.

Thatoi, H., Behera, B.C., Mishra, R.R., Dutta, S.K., 2013. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. Annals of Microbiology 63, 1-19.

Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio, M., Oliveira, J.V., 2010. A review on microbial lipases production. Food and Bioprocess Technology 3, 182-196.

Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M., Lopez-Cortes, A., Bashan, Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biology and Fertility of Soils 30, 460-468.

Venugopal, M., Saramma, A., 2006. Characterization of alkaline protease from Vibrio fluvialis strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. Process Biochemistry 41, 1239-1243.

Venugopal, M., Saramma, A., 2007. An alkaline protease from Bacillus circulans BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. Indian Journal of Microbiology 47, 298-303.

Wan, M., Li, G., Zhang, J., Jiang, D., Huang, H.-C., 2008. Effect of volatile substances of Streptomyces platensis F-1 on control of plant fungal diseases. Biological Control 46, 552-559.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology 73, 5261-5267.

Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 67, 1613.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7, 203-214.

ดินแดนท่องเที่ยวถิ่นทหารเรือ, 2020. สวนป่าชายเลน สอ.รฝ. ความหลากหลายแห่งสายพันธุ์. http://www.thainavyland.com/mangrove-forest-park01/ สืบค้นเมื่อ 14 ธันวาคม,2565

สำนักงานคณะกรรมการนโยบายเขตพัฒนาพิเศษภาคตะวันออก, 2019. แผนปฏิบัติการพัฒนาและส่งเสริมการท่องเที่ยว. https://www.eeco.or.th/th/government-initiative สืบค้นเมื่อวันที่ 14 ธันวาคม, 2565

## ภาคผนวก ก

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium)

**1. Carbohydrate fermentation broth**

A. Phenol red broth base, pH 7.2-7.6

| | |
|---|---|
| Peptone | 10 g |
| Beef extract | 1 g |
| Sodium chloride | 5 g |
| Phenol red | 0.018 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 900 ml ปรับ pH เป็น 7.4

B. Carbohydrates

เตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้น (10% w/v) ชนิดละ 100 ml ได้แก่ Glucose (Dextrose), Lactose, Sucrose และ Mannitol หรือคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.45 µm

ผสม A (900 ml) กับ B (100 ml) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดเป็น 1.0%เตรียมเป็น broth ในหลอดทดลองหลอดละ 3-5 ml ที่มีหลอดดักแก๊ส (durham tube) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 20 นาที ที่ความดัน 15 psi

**2. Christensen urea agar, pH 6.6-7.0**

A. Urea broth base

| | |
|---|---|
| Peptone | 1 g |
| Sodium chloride | 5 g |
| Monopotassium hydrogen phosphate ($KH_2PO_4$) | 2 g |
| Glucose | 1 g |
| Phenol red | 0.012 g |
| Agar | 15 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 900 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

B. 2% Urea solution

ละลาย urea 2 g ในน้ำกลั่น 100 ml แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรู 0.45 μm

ผสม B (100 ml) และ A (900 ml) จนเข้ากันดีแล้วเทใส่หลอดปลอดเชื้อ (3-4 ml/หลอด) ด้วย aseptic technique เอียงเป็น agar slant ทันที

**3.Decarboxylase broth base (Moller), pH 6.0**

| | |
|---|---|
| Peptone | 5 g |
| Beef extract | 5 g |
| Glucose | 0.5 g |
| Pyridoxal | 5.0 g |
| Bromocresol purple | 0.1 g |
| Cresol red | 0.005 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 ml (ทุก 100 ml ของ base เติมกรดอะมิโนที่ใช้ทดสอบ (L-lysine, L-ornithine หรือ L-arginine) ชนิดละ 1 g (1%)) ปรับ pH เป็น 6.0 หรือจนอาหารมีสีเหลืองอมม่วง เตรียมเป็น broth ในหลอดทดลองหลอดละ 3 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

มหาวิทยาลัยศิลปากร

**4.Glucose OF medium (semisolid agar tall), pH 6.6-7.0**

| | |
|---|---|
| Peptone | 2 g |
| Glucose | 10 g |
| Sodium chloride | 5 g |
| Dipotassium hydrogen phosphate | 0.3 g |
| Bromothymol blue | 0.03-0.08 g |
| Agar | 2-3 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 ml เตรียมเป็น semisolid agar tall ในหลอดทดลอง หลอดละ 5 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 20 นาที ที่ความดัน 15 psi

**5.International *Streptomyces* Project-2 (ISP-2) agar**

| | |
|---|---|
| Yeast extract | 4 g |
| Malt extract | 10 g |
| Glucose | 4 g |
| Agar | 15 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 ml เตรียมเป็น agar plate(20 ml) ในกรณีที่ต้องการเติม NaCl ควรเติมให้มีความข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 1% (w/v) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

**6.MR-VP broth, pH 6.9**

| | |
|---|---|
| Polypeptone หรือ buffer peptone | 7 g |
| Glucose | 5 g |
| Dipotassium hydrogen phosphate | 5 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 ml เตรียมเป็น broth ในหลอดทดลองหลอดละ 5-7 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

**7.NA+milk**

| | |
|---|---|
| NA | 1 l |
| U.H.T.milk (low fat) | 250 ml |
| Agar | 4.5 g |
| Distilled water | 150 ml |

เตรียมเป็น agar plate 2 ชั้น โดย :

i. เตรียม NA แล้วเทอาหารใส่จานเพาะเชื้อ 15-20 ml/จาน ปล่อยให้อาหารแข็งตัว

ii. ละลายวุ้น 4.5 g ในน้ำกลั่น 150 ml แล้ว autoclave ที่ อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

iii. ผสม U.H.T 250 ml ลงในวุ้นเปล่าปลอดเชื้อ แล้วนำไปเทบน NA ข้างต้น 8-10 ml/จาน จะได้อาหารที่มีชั้นของนมอยู่บนชั้นของ NA

ในกรณีที่ต้องการเติม NaCl ควรเติมให้มีความข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 1% (w/v)

**8.Nutrient agar (NA)**

| | |
|---|---|
| Nutrient broth | 13 g |
| Agar | 15 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 ml เตรียมเป็น agar plate (20 ml)หรือ agar slant (7 ml) ในกรณีที่ต้องการเติม NaCl ควรเติมให้มีความข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 1% (w/v) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

**9.Peptone หรือ tryptone broth (indole production medium), pH 7.0-7.4**

| | |
|---|---|
| Peptone หรือ tryptone | 15 g |
| Sodium chloride | 5 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 ml เตรียมเป็น broth ในหลอดทดลองหลอดละ 3 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

**10.Simmons citrate agar, pH 6.6-7.0**

| | |
|---|---|
| Magnesium sulfate | 0.2 g |
| Monoammonium phosphate | 1 g |
| Dipotassium hydrogen phosphate | 1 g |
| Sodium chloride | 2 g |
| Sodium citrate | 2 g |
| Bromothymol blue | 0.08 g |
| Agar | 15 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 ml เตรียมเป็น agar slant ในหลอดทดลองหลอดละ 5 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

**11.Starch agar**

| | |
|---|---|
| Soluble starch | 20 g |
| NA | 1 l |

เตรียมเป็น agar plate (20 ml) ในกรณีที่ต้องการเติม NaCl ควรเติมให้มีความข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 1% (w/v) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

**12.Triple sugar iron agar (TSI) agar, pH 7.2-7.6**

| | |
|---|---|
| Beef extract | 3 g |
| Yeast extract | 3 g |
| Peptone | 15 g |
| Protease peptone | 5 g |
| Lactose | 10 g |
| Sucrose | 10 g |
| Glucose | 1 g |
| Ferrous sulfate | 0.2 g |
| Sodium thiosulfate | 0.3 g |
| Sodium chloride | 5 g |
| Phenol red | 0.024 g |
| Agar | 12 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 ml เตรียมเป็น agar bottom slant ในหลอดทดลอง หลอดละ 7 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

**13.Tween 80 agar, pH 6.8-7.2**

| | |
|---|---|
| Peptone | 10 g |
| Sodium chloride | 5 g |
| Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$) | 0.1 g |
| Tween 80 | 10 ml |
| Agar | 15 g |

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 1,000 ml เตรียมเป็น agar plate (20 ml) ในกรณีที่ต้องการเติม NaCl ควรเติมให้มีความข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 1% (w/v) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

มหาวิทยาลัยศิลปากร

# ภาคผนวก ข

## การเตรียมสารเคมี (Reagent)

1. **0.5 M EDTA, pH 8.0**

| | |
|---|---|
| $Na_2EDTA$ | 18.6 g |
| น้ำกลั่น | 80 ml |

กวนให้ละลายโดยใช้ magnetic stirrer บน hot plate เติม NaOH 1 g ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายกรด HCl เจือจางหรือสารละลายด่าง NaOH เจืองจาง ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ใส่ขวดฝาเกลียวขนาด 250 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

2. **1 M Tris-HCl, pH 7.6**

| | |
|---|---|
| Tris base | 12.1 g |
| น้ำกลั่น | 80 ml |
| HCl (conc.) | 6 ml |
| | (ทำในตู้ดูดควัน) |

ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.6 ด้วยสารละลายกรด HCl เจือจาง หรือสารละลายด่าง NaOH เจือจาง ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ใส่ขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 250 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

3. **1 M Tris-HCl, pH 8.0**

| | |
|---|---|
| Tris base | 12.1 g |
| น้ำกลั่น | 80 ml |
| HCl (conc.) | 6 ml |
| | (ทำในตู้ดูดควัน) |

ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลายกรด HCl เจือจาง หรือสารละลายด่าง NaOH เจือจาง ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ใส่ขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 250 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

4. **1.0% (w/v) Agarose**

| | |
|---|---|
| Agarose | 0.5 g |
| 1X TAE buffer | 50 ml |

ผสมสารละลายให้เข้ากันต้มให้เดือด รอให้เย็นถึงประมาณ 60°C แล้วจึงนำมาเทใส่บล็อกเซ็ตเจล

5. **1X TAE buffer**

| | |
|---|---|
| 50X TAE buffer | 20 ml |
| น้ำกลั่น | 950 ml |

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 ml ใส่ขวดฝาเกลียว 1,000 ml

6. **6X agarose gel-loading dye**

| | |
|---|---|
| Bromophenol blue | 0.25% |
| Sucrose | 40% |

ละลาย sucrose ในน้ำกลั่น จากนั้นจึงละลาย bromophenol blue ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 μm ใส่ในขวดที่ปลอดเชื้อแล้วในตู้ปลอดเชื้อ

7. **25% SDS (sodium dodecyl sulfate)**

| | |
|---|---|
| Sodium dodecyl sulfate (SDS) | 25 g |
| น้ำกลั่น | 80 ml |

อุ่นให้ละลายที่ 65°C ใน water bath ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ใส่ขวดฝาเกลียวขนาด 250 ml

8. **5 M NaCl**

| | |
|---|---|
| Sodium chloride (NaCl) | 29.2 g |
| น้ำกลั่น | 80 ml |

ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ใส่ขวดฝาเกลียวขนาด 250 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

9. **50X TAE buffer**

| | |
|---|---|
| Tris base | 48.4 g |
| น้ำกลั่น | 100 ml |
| 0.5M EDTA, pH 8.0 | 20 ml |
| Glacial acetic acid | 11.42 ml |

(ทำในตู้ดูดควัน)

ปรับปริมาตรเป็น 200 ml ใส่ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 psi

10. **Barritt's VP-Reagent**

Napthol reagent

| | |
|---|---|
| 1-Napthol | 5 g |
| Absolute ethanol | 100 ml |

40% Potassium hydroxide

| | |
|---|---|
| Potassium hydroxide | 40 g |
| น้ำกลั่น | 100 ml |

11. **Catalase reagent**

| | |
|---|---|
| 3% Hydrogen peroxide | 100 ml |

12. **Ethidium bromide (10 mg/ml)**

| | |
|---|---|
| Ethidium bromide | 1 g |
| น้ำกลั่น | 100 ml |

ผสมโดยการใช้ magnetic stirrer บน hot plate เป็นเวลาหลายชั่วโมง เพื่อให้แน่ใจว่าสีละลาย ห่อภาชนะบรรจุด้วยอะลูมิเนียมฟอล์ยหรือชวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ข้อควรระวัง Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ใส่ถุงมือเมื่อทำงานกับสารละลายนี้

13. **Gram crystal violet**

Solution A

| | |
|---|---|
| Crustal violet (90% dye content) | 10 g |
| 95% Ethanol | 100 ml |

Solution B

| | |
|---|---|
| Ammonium oxalate | 4 g |
| น้ำกลั่น | 400 ml |

ผสม solution A กับ B เข้าด้วยกัน ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วกรองก่อนใช้งาน

มหาวิทยาลัยศิลปากร

14. **Gram iodine (mordant)**

| | |
|---|---|
| Iodine | 2 g |
| Potassium iodide (KI) | 4 g |
| น้ำกลั่น | 600 ml |

ละลาย KI ในน้ำกลั่น บด iodine แล้วละลายในสารละลาย KI กวนจนละลายหมดและเก็บในขวดสีชา

15. **Gram safranin O (counter stain)**

| | |
|---|---|
| Safranin O | 0.25 g |
| 95% Ethanol | 10 ml |
| น้ำกลั่น | 100 ml |

ละลายสีใน ethanol (กวนด้วยแท่งแก้วหรือ magnatic bar) แล้วเติมน้ำกลั่น กรองแล้วเก็บไว้ในขวด

16. **Kovac indole reagent**

| | |
|---|---|
| Pure amyl หรือ isoamyl alcohol | 150 ml |
| p-Dimethylaminobenzaldehyde | 10 g |
| HCl (conc.) | 50 ml |

ละลาย aldehyde ใน alcohol แล้วค่อยๆเติม HCl เก็บในขวดสีชา 4-10°C

17. **Lysozyme solution** (50mM glucose, 25mM Tris, 10mM EDTA, lysozyme 2 mg/ml)

| | |
|---|---|
| 1M Glucose | 500 µl\ |
| 1M Tris HCl, pH 8.0 | 250 µl |
| 0.5M EDTA, pH 8.0 | 200 µl |
| Lysozyme (100 mg/ml) | 200 µl |

ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกันในหลอดที่ปลอดเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

18. **Methyl red indicator**

| | |
|---|---|
| Methyl red | 0.1 g |
| 95% Ethanol | 200 ml |

19. **Normal saline** (0.85% NaCl)

| | |
|---|---|
| Sodium chloride | 0.85 g |
| น้ำกลั่น | 100 ml |

มหาวิทยาลัยศิลปากร

20. **Oxidase reagent (Carpenter,Suhrland and Morrison)**

| | |
|---|---|
| p-Aminodimethylaniline oxalate | 0.3 g |
| น้ำกลั่น | 30 ml |

ละลายสารในน้ำกลั่น อุ่นจนไม่มีตะกอน เก็บไว้ในขวดสีชา (เกลือ oxalate จะเสถียรกว่าเกลือ chloride) ควรเตรียมสดใช้ภายใน 2-3 วัน

21. **Phenol**

หลอม phenol โดยแช่ขวดใน water bath ที่ 60°C รอให้ละลายหมด เติม Tris-base 1 g ต่อ phenol 100 ml เทน้ำกลั่นปลอดเชื้อทับผิวหน้า

22. **Phenol : Chloroform** (1:1)

ผสม phenol และ chloroform ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร (100 ml : 100 ml) เก็บในขวดสีชา

23. **Pronase หรือ proteinase** (2 mg/ml ใน TEN buffer)

| | |
|---|---|
| Pronase หรือ proteinase | 0.02 g |
| TEN buffer | 10 ml |

ผสมสารในหลอดปลอดเชื้อขนาด 15 ml vortex ให้สารละลายหมด แบ่งใส่หลอด eppendorf ละ 1 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

24. **Rnase A** (100 mg/ml)

| | |
|---|---|
| Rnase A | 1 g |
| Rnase buffer | 10 ml |

ผสมสารในหลอดปลอดเชื้อขนาด 15 ml vortex ให้สารละลายหมด แบ่งใส่ eppendorf ละ 1 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

25. **TE buffer** (10mM Tris-HCl, pH 7.6, 1mM EDTA)

| | |
|---|---|
| 1M Tris-HCl, pH 7.6 | 1 ml\ |
| 0.5M EDTA, pH 8.0 | 0.2 ml |

ผสมสารให้เข้ากันในขวดแก้วปลอดเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

## ภาคผนวก ค

## ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ 12 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA+1% NaCl

| ตำแหน่ง | ตัวอย่าง | ซ้ำ | จำนวนโคโลนี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ระดับความเข้มข้น (serieal dilution) | | | | |
| | | | $10^{0}$ | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | CFU/ml |
| 1 | น้ำ | 1 | 147 | 10 | 0 | 0 | $1.9x10^{3}$ |
| | | 2 | 223 | 42 | 0 | 0 | |
| | ดิน | 1 | >300 | 32 | 7 | 0 | $3.6x10^{3}$ |
| | | 2 | >300 | 39 | 3 | 2 | |
| 2 | น้ำ | 1 | >300 | 64 | 4 | 3 | $5.3x10^{3}$ |
| | | 2 | >300 | 42 | 8 | 0 | |
| | ดิน | 1 | >300 | >300 | 10 | 1 | $9.2x10^{3}$ |
| | | 2 | >300 | 84 | 9 | 6 | |
| 3 | น้ำ | 1 | >300 | 183 | 6 | 0 | $1.0x10^{4}$ |
| | | 2 | 173 | 10 | 3 | 1 | |
| | ดิน | 1 | >300 | >300 | 288 | 45 | $2.7x10^{5}$ |
| | | 2 | >300 | >300 | 245 | 13 | |
| | | 2 | 121 | 7 | 1 | 0 | |
| 4 | น้ำ | 1 | 56 | 25 | 1 | 0 | $5.8x10^{2}$ |
| | | 2 | 60 | 26 | 10 | 0 | |
| | ดิน | 1 | 157 | 14 | 1 | 0 | $1.0x10^{3}$ |
| | | 2 | 51 | 22 | 1 | 0 | |

ตารางที่ 13 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Starch agar+1% NaCl

| ตำแหน่ง | ตัวอย่าง | ซ้ำ | จำนวนโคโลนี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ระดับความเข้มข้น (serieal dilution) | | | | |
| | | | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | CFU/ml |
| 1 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 2 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 3 | น้ำ | 1 | 139 | 9 | ND | ND | $9.4x10^3$ |
| | | 2 | 48 | 2 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | >300 | 183 | ND | ND | $1.9x10^5$ |
| | | 2 | >300 | 188 | ND | ND | |
| | | 2 | 125 | 23 | 20 | 3 | |
| 4 | น้ำ | 1 | 32 | 32 | 5 | 0 | $3.0x10^3$ |
| | | 2 | 28 | 0 | 0 | 0 | |
| | ดิน | 1 | 15 | 1 | 0 | 4 | $1.4x10^3$ |
| | | 2 | 12 | 4 | 0 | 0 | |

ND = ไม่ได้เก็บตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 14 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหาร Starch agar+1% NaCl

| ตำแหน่ง | ตัวอย่าง | ซ้ำ | จำนวนโคโลนี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ระดับความเข้มข้น (serieal dilution) | | | | |
| | | | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | CFU/ml |
| 1 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 2 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 3 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 4 | น้ำ | 1 | 2 | 0 | 5 | 0 | $2.0x10^{2}$ |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | ดิน | 1 | 15 | 0 | 0 | 0 | $1.5x10^{3}$ |
| | | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | |

ND = ไม่ได้เก็บตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 15 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl

| ตำแหน่ง | ตัวอย่าง | ซ้ำ | จำนวนโคโลนี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ระดับความเข้มข้น (serieal dilution) | | | | |
| | | | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | CFU/ml |
| 1 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 2 | น้ำ | 1 | 70 | 1 | ND | ND | $6.7x10^3$ |
| | | 2 | 63 | 7 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | 183 | 3 | ND | ND | $1.1x10^4$ |
| | | 2 | 37 | 0 | ND | ND | |
| 3 | น้ำ | 1 | 65 | 0 | ND | ND | $1.1x10^4$ |
| | | 2 | 148 | 1 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | 52 | 1 | ND | ND | $5.2x10^3$ |
| | | 2 | >300 | 4 | ND | ND | |
| | | 2 | 59 | 20 | 2 | 0 | |
| 4 | น้ำ | 1 | 32 | 3 | 0 | 0 | $5.2x10^3$ |
| | | 2 | 27 | 3 | 0 | 0 | |
| | ดิน | 1 | 147 | 0 | 0 | 0 | $7.9x10^3$ |
| | | 2 | 10 | 2 | 0 | 88 | |

ND = ไม่ได้เก็บตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 16 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tween 80 agar+1% NaCl

| ตำแหน่ง | ตัวอย่าง | ซ้ำ | จำนวนโคโลนี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ระดับความเข้มข้น (serieal dilution) | | | | |
| | | | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | CFU/ml |
| 1 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 2 | น้ำ | 1 | 15 | 0 | ND | ND | $1.5x10^{3}$ |
| | | 2 | 14 | 1 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | 12 | 1 | ND | ND | $9.5x10^{2}$ |
| | | 2 | 7 | 0 | ND | ND | |
| 3 | น้ำ | 1 | 9 | 0 | ND | ND | $2.4x10^{3}$ |
| | | 2 | 38 | 0 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | 3 | 0 | ND | ND | $3.0x10^{2}$ |
| | | 2 | >300 | 0 | ND | ND | |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 4 | น้ำ | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | $7.5x10^{2}$ |
| | | 2 | 10 | 0 | 0 | 0 | |
| | ดิน | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | $6.0x10^{2}$ |
| | | 2 | 8 | 0 | 0 | 0 | |

ND = ไม่ได้เก็บตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 17 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA+milk+1% NaCl

| ตำแหน่ง | ตัวอย่าง | ซ้ำ | จำนวนโคโลนี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ระดับความเข้มข้น (serieal dilution) | | | | |
| | | | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | CFU/ml |
| 1 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 2 | น้ำ | 1 | 100 | 5 | ND | ND | $6.9x10^{3}$ |
| | | 2 | 39 | 10 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | 116 | 23 | ND | ND | $1.2x10^{4}$ |
| | | 2 | >300 | 0 | ND | ND | |
| 3 | น้ำ | 1 | 125 | 31 | ND | ND | $8.8x10^{3}$ |
| | | 2 | 50 | 2 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | >300 | 116 | ND | ND | $1.2x10^{5}$ |
| | | 2 | >300 | 114 | ND | ND | |
| | | 2 | >300 | 22 | 1 | 1 | |
| 4 | น้ำ | 1 | 24 | 4 | 0 | 54 | $2.1x10^{3}$ |
| | | 2 | 18 | 4 | 0 | 2 | |
| | ดิน | 1 | 10 | 3 | 0 | 0 | $8.5x10^{2}$ |
| | | 2 | 7 | 2 | 5 | 43 | |

ND = ไม่ได้เก็บตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 18 จำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสบนอาหาร NA+milk+1% NaCl

| ตำแหน่ง | ตัวอย่าง | ซ้ำ | จำนวนโคโลนี ระดับความเข้มข้น (serieal dilution) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | CFU/ml |
| 1 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 2 | น้ำ | 1 | 12 | 0 | ND | ND | $9.0x10^{2}$ |
| | | 2 | 6 | 4 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | 0 | 6 | ND | ND | $6.0x10^{2}$ |
| | | 2 | ปื้น | 0 | ND | ND | |
| 3 | น้ำ | 1 | 28 | 5 | ND | ND | $2.4x10^{3}$ |
| | | 2 | 20 | 1 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | >300 | ปื้น | ND | ND | - |
| | | 2 | >300 | ปื้น | ND | ND | |
| | | 2 | ปื้น | 1 | 1 | 1 | |
| 4 | น้ำ | 1 | 23 | 2 | 0 | 40 | $1.9x10^{3}$ |
| | | 2 | 15 | 3 | 0 | 2 | |
| | ดิน | 1 | 9 | 3 | 0 | 0 | $8.0x10^{2}$ |
| | | 2 | 7 | 1 | 5 | 43 | |

ND = ไม่ได้เก็บตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 19 จำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร ISP-2 +1% NaCl

| ตำแหน่ง | ตัวอย่าง | ซ้ำ | จำนวนโคโลนี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ระดับความเข้มข้น (serieal dilution) | | | | |
| | | | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | CFU/ml |
| 1 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 2 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 3 | น้ำ | 1 | 65 | 3 | ND | ND | $6.5x10^3$ |
| | | 2 | 7 | 1 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | >300 | >300 | ND | ND | $1.5x10^5$ |
| | | 2 | >300 | 154 | ND | ND | |
| | | 2 | 66 | 29 | 26 | 0 | |
| 4 | น้ำ | 1 | 19 | 1 | 0 | 0 | $1.7x10^3$ |
| | | 2 | 15 | 0 | 42 | 0 | |
| | ดิน | 1 | 12 | 22 | 0 | 0 | $1.0x10^3$ |
| | | 2 | 8 | 1 | 3 | 1 | |

ND = ไม่ได้เก็บตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 20 จำนวนโคโลนีเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP-2 +1% NaCl

| ตำแหน่ง | ตัวอย่าง | ซ้ำ | จำนวนโคโลนี | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ระดับความเข้มข้น (serieal dilution) | | | | |
| | | | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | CFU/ml |
| 1 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 2 | น้ำ | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | ND | ND | ND | ND | - |
| | | 2 | ND | ND | ND | ND | |
| 3 | น้ำ | 1 | 0 | 0 | ND | ND | 0 |
| | | 2 | 0 | 0 | ND | ND | |
| | ดิน | 1 | 1 | 0 | ND | ND | $1.0x10^{2}$ |
| | | 2 | 0 | 0 | ND | ND | |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 4 | น้ำ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| | ดิน | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | $1.0x10^{2}$ |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

ND = ไม่ได้เก็บตัวอย่างทดสอบ

ตารางที่ 21 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดิน ตะกอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA+ 1% NaCl ในแต่ละตำแหน่ง

| ตำแหน่ง | กลุ่มเชื้อที่พบ (จีนัส) | จำนวนไอโซเลท (ร้อยละ) | จำนวนทั้งหมด (ไอโซเลท) |
|---|---|---|---|
| 1 | *Paenibacillus* | 13(36) | 36 |
| | *Lactobacillus* | 6(17) | |
| | *Aliivibrio* | 4(11) | |
| | *Aeromonas* | 4(11) | |
| | *Vibrio* | 3(8) | |
| | *Kluyvera* | 2(5) | |
| | *Shigella* | 1(3) | |
| | *Serratia* | 1(3) | |
| | *Aneurinibacillus* | 1(3) | |
| | *Pasteurella* | 1(3) | |
| 2 | *Aneurinibacillus* | 3(20) | 15 |
| | *Paenibacillus* | 2(13) | |
| | *Brevibacillus* | 1(6) | |
| | *Viridibacillus* | 1(6) | |
| | *Lysinibacillus* | 1(6) | |
| | *Staphylococcus* | 1(7) | |
| | *Citrobacter* | 1(7) | |
| | *Pantoea* | 1(7) | |
| | *Edwardsiella* | 1(7) | |
| | *Serratia* | 1(7) | |
| | *Pragia* | 1(7) | |
| | *Rahnella* | 1(7) | |
| 3 | *Bacillus* | 11(64) | 17 |
| | *Paenibacillus* | 2(12) | |
| | *Salinicoccus* | 1(6) | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | *Moraxella* | 1(6) | |
| | *Staphylococcus* | 1(6) | |
| | *Streptococcus* | 1(6) | |
| 4 | *Pseudomonas* | 2(67) | 3 |
| | *Pasteurella* | 1(33) | |

ตารางที่ 22 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA+ 1% NaCl (ภาพรวมทั้งหมด)

| กลุ่มเชื้อที่พบ (จีนัส) | จำนวนไอโซเลท (ร้อยละ) | จำนวนทั้งหมด (ไอโซเลท) |
|---|---|---|
| *Aeromonas* | 4(6) | 71 |
| *Aliivibrio* | 4(6) | |
| *Aneurinibacillus* | 4(6) | |
| *Bacillus* | 11(15) | |
| *Brevibacillus* | 1(1) | |
| *Citrobacter* | 1(1) | |
| *Edwardsiella* | 1(1) | |
| *Kluyvera* | 2(3) | |
| *Lactobacillus* | 6(8) | |
| *Lysinibacillus* | 1(1) | |
| *Moraxella* | 1(1) | |
| *Paenibacillus* | 17(24) | |
| *Pantoea* | 1(1) | |
| *Pasteurella* | 2(3) | |
| *Pragia* | 1(1) | |
| *Pseudomonas* | 2(3) | |
| *Rahnella* | 1(1) | |
| *Salinicoccus* | 1(1) | |
| *Serratia* | 2(3) | |
| *Shigella* | 1(1) | |
| *Staphylococcus* | 2(3) | |
| *Streptococcus* | 1(1) | |
| *Vibrio* | 3(4) | |
| *Viridibacillus* | 1(1) | |

ตารางที่ 23 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar+1% NaCl (ภาพรวมทั้งหมด)

| กลุ่มเชื้อที่พบ(จีนัส) | จำนวนไอโซเลท (ร้อยละ) | จำนวนทั้งหมด (ไอโซเลท) |
|---|---|---|
| *Aeromonas* | 1(3) | 31 |
| *Bacillus* | 7(23) | |
| *Lactobacillus* | 2(7) | |
| *Lysinibacillus* | 1(3) | |
| *Paenibacillus* | 2(7) | |
| *Pasteurella* | 3(10) | |
| *Photorhabdus* | 1(3) | |
| *Proteus* | 1(3) | |
| *Pseudomonas* | 4(13) | |
| *Serratia* | 5(16) | |
| *Shigella* | 1(3) | |
| *Streptococcus* | 1(3) | |
| *Vibrio* | 2(6) | |

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 24 ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินตะกอนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA+milk agar+1% NaCl (ภาพรวมทั้งหมด)

| กลุ่มเชื้อที่พบ(จีนัส) | จำนวน (ไอโซเลท) | จำนวนทั้งหมด (ไอโซเลท) |
|---|---|---|
| *Aeromonas* | 7(13) | 52 |
| *Bacillus* | 12(23) | |
| *Brevibacterium* | 1(2) | |
| *Citrobacter* | 3(6) | |
| *Corynebacterium* | 1(2) | |
| *Gemella* | 2(4) | |
| *Klebsiella* | 1(2) | |
| *Lactobacillus* | 3(6) | |
| *Macrococcus* | 3(6) | |
| *Neisseria* | 1(2) | |
| *Paenibacillus* | 2(4) | |
| *Photobacterium* | 1(2) | |
| *Pseudomonas* | 1(2) | |
| *Staphylococcus* | 2(4) | |
| *Streptococcus* | 3(6) | |
| *Vibrio* | 8(15) | |
| *Xenohabdus* | 1(2) | |

**ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ Isolate A**

GCTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG

ATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTC

ACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACTACCGACCGCATGGTCTGGT

GGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCC

TACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG

CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCG

ACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTG

ACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGC

AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGATGTGAAAG

CCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGA

ATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCT

GGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT

CCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAGCTAACG

CATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC

GCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT

ACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCG

TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCCA

GCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGG

GACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAT

GAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGC

AACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTT

CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCA

ACCCCTTGTGGGAGGGAATCGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTA

GCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTAAGCT

**ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ Isolate B**

AGCTTAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTACGACTTCGTCCCAATCG
CCAGCCCCACCTTCGACGGCTCCCTCCACAAGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTGCCGACTTT
CGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCG
ATTACTAGCGACTCCGACTTCACGGGGTCGAGTTGCAGACCCCGATCCGAACTGAGACCGGCTTTT
TGGGATTCGCTCCACCTCACGGTATCGCAGCCCATTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCC
TGGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTT
CGATGAGTCCCCGCCATAACGCGCTGGCAACATCGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA
CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTGACCGCCCCCGAAGGACCT
GCCATCTCTGACAGTTTTGCGGCCATGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAA
TCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACT
CCCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACAGGGAACCGGAGAGGCCCCCCACACCTAG
CGCCCAACGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCC
TCAGCGTCAGTATCGGCCCAGAGACCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTT
CACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGGCC
CGCAGTTGAGCTGCGGGTTTTCACAGTCGACGCGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATA
AATCCGGACAACGCTCGCGCCCTACGTCTTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGCGCTTCT
TCTGCAGGTACCGTCACTTACGCTTCGTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATC
CCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTCCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGT
AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTC
GCCTTGGTAGGCCATCACCCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGCCCATCCCAAGCCGAAAAAC
TTTCCACCACCAACCATGCGATCGGAGGTCATATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGGGTTATCC
CAAAGCCTGGGGCAGGTTGCTCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCGCTCGAGTACCCCGAAGGGCCT
TTCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAACTCTGA
GCT

**ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ Isolate C**

AGCTTAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTACGACTTCGTCCCAATCG
CCAGTCCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACT
TTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTG
CGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCGGCT
TTTTGAGATTCGCTCCACCTTGCGGTATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAG
CCCAAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGT
CTCCCGTGAGTCCCCAACCTCCGAAGAGTTGCTGGCAACACGGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCAC
AAGGGGGGCACCATCTCTGATGCTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCG
TCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC
GGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCC
CACACCTAGTGCCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGC
TTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCTCCTGATATCT
GCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGAC
TGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGCGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTA
CGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCC
GGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAG
GCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCT
GCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTA
CCCGTCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCAC
CGCCGGAGCTTTCGACCCGCCAAGATGCCTTGGCAGGTCAGTATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCA
GGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCACTAATCCCCAC
CCGAAGGTGGTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGG
ATCAAACTCTGAGCT

**ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ Isolate D**

AGCTTAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGATACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCA
TCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCT
CGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGA
TTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGT
GGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAG
GTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT
TAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGT
CCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAA
CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTC
CCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCA
CTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCA
GCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCAC
CGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCG
GTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTC
CGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGT
TAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACG
ATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCC
CTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAG
GTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCA
TCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTTCAGACAACCATCCGGTAT
TAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
GCCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCA
GCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAACTC

# ประวัติผู้เขียน

| | |
|---|---|
| **ชื่อ-สกุล** | ปพน กาญจนศิริพงศ์ |
| **วัน เดือน ปี เกิด** | 17 กุมภาพันธ์ 2538 |
| **สถานที่เกิด** | สุราษฎร์ธานี |
| **วุฒิการศึกษา** | ปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร |
| **ที่อยู่ปัจจุบัน** | 329 หมู่6 หมู่บ้านนฤมล5 ตำบลหนองกอมเกาะ อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย 43000 |
| **ผลงานตีพิมพ์** | Bacterial Community of Klong Tub Mangrove Forest in Chonburi Province, Thailand. DOI :10.32526/ennrj/20/202200058. Environment and Natural Resources Journal. 2022 Aug 24;20(6):575-84. |

มหาวิทยาลัยศิลปากร