

การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนไมซีสที่แยกได้จากบริเวณชายหาดและป่าชายเลน



นายณัฐชัย เก่งพิพัฒน์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

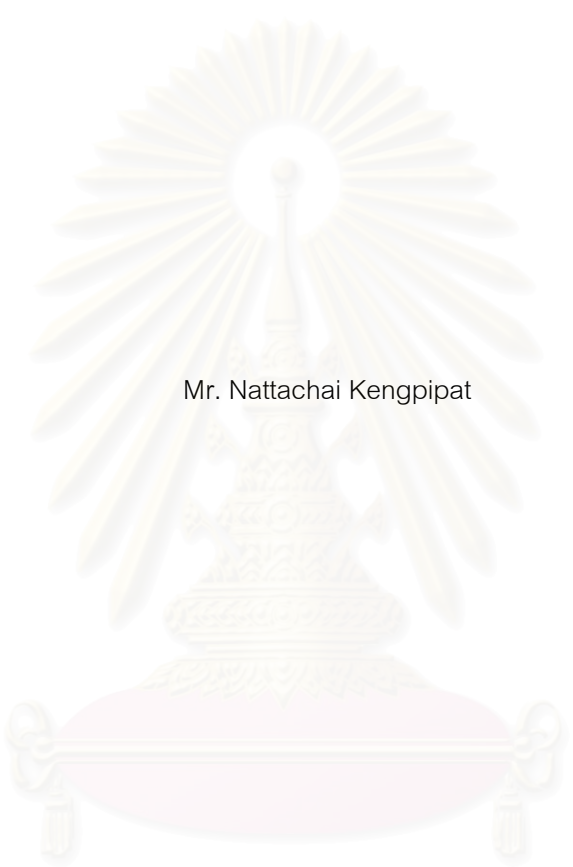
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INVESTIGATION OF BIOACTIVE SUBSTANCES FROM ACTINOMYCETES ISOLATED FROM  
BEACHES AND MANGROVES



Mr. Nattachai Kengpipat

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology  
Faculty of Science Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University


หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากบริเวณ  
ชายหาดและป่าชายเลน  
โดย นายณัฐชัย เก่งพิพัฒน์  
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีहनนท์  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เจริญสำราญ

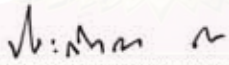
---

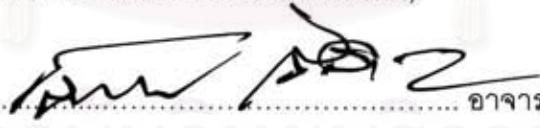
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

  
..... คณบดี คณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมณะเศวต)

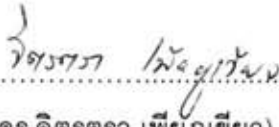
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีहनนท์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เจริญสำราญ)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)


  
..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว)

ณัฐชัย เก่งพิพัฒน์ : การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากบริเวณชายหาดและป่าชายเลน. (INVESTIGATION OF BIOACTIVE SUBSTANCES FROM ACTINOMYCETES ISOLATED FROM BEACHES AND MANGROVES)

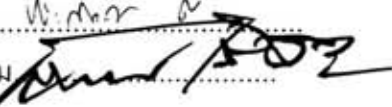
อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ประภคต์สินี สีนันทน์ , อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ.ดร.โสภณ เรืองสำราญ 146หน้า

สามารถแยกแอคติโนมัยซิสได้ทั้งหมด 77 สายพันธุ์ จากดิน และทรายตัวอย่างจำนวน 34 ตัวอย่างจากบริเวณชายหาด และป่าชายเลน 4 จังหวัดในประเทศไทย เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และ รา พบ แอคติโนมัยซิส 4 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด และเมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด พบว่ามีแอคติโนมัยซิส 14 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง ได้เลือกสายพันธุ์ J6.2 มาจำแนกสายพันธุ์ โดยตรวจสอบลำดับเบสของยีนประมวลดรหัส 16S rRNA ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และลักษณะทางชีวเคมีพบว่า แอคติโนมัยซิสสายพันธุ์ J6.2 คือ *Streptomyces parvulus* เมื่อนำมาศึกษาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไซโตเคียมเคซิเนตได้ดีที่สุด เมื่อนำสารสกัดเอทิลอะซิเตตมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนที่แยกได้ พบว่า ส่วนของสารที่แยกได้สามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* อีกทั้งสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 ได้ เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยเทคนิคต่างๆทางเคมี ได้แก่ NMR IR UV และ MS พบว่าในส่วนผสมที่ 4 ของสารที่แยกได้ ประกอบด้วยสารในกลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน มีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 25 และ 5 ppm ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Saccharomyces cerevisiae* และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 200 ppm

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4872277223: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ACTINOMYCETES / MANGROVE / ANTIBIOTIC / ANTITUMOR

NATTACHAI KENGPIPAT: INVESTIGATION OF BIOACTIVE SUBSTANCES FROM ACTINOMYCETES ISOLATED FROM BEACHES AND MANGROVES.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH

THESIS COADVISOR : PROF. SOPHON ROENGSUMRAN, 146 pp.

Thirty four soil and sand samples collected from the area of beach and mangrove in four provinces of Thailand were used for isolation of bioactive metabolites producing actinomycetes. Seventy seven isolates were tested for their ability to produce antibiotic compounds inhibiting 7 test microorganisms including for Gram positive bacteria, Gram negative bacteria, yeast and mold. They were also tested for antitumor activity against five human cell lines. Four isolates showed broad spectrum antimicrobial activities and fourteen isolates showed specific antitumor activity. Strain J6.2 was selected for morphological study. Physiology, cultural characteristics, biochemical properties and 16S rRNA gene sequencing analysis which lead to the identification as *Streptomyces parvulus*. Sodium caseinate broth was the best medium to produce bioactive metabolites. Ethyl acetate was used for extracting the bioactive metabolites from fermentation broth and crude extract was purified by passing through column chromatography. The purified elucidation was identified by several techniques including NMR, IR, UV and MS. The spectroscopic data showed that purified fraction consisted of aromatic hydrocarbons. It provided MIC to inhibit *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* at the concentration of 25 and 5 ppm, respectively. It can not inhibit *Saccharomyces cerevisiae* and liver cell line (HepG2) at concentration lower than 200 ppm.

Field of study Biotechnology

Academic year 2007

Student's signature..... Nattachai Kengpipat

Advisor's signature..... Prakitsin Sihanonth

Co-advisor's signature..... Sophon Roengsumran

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างดีของ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตดี สิ้น สีนนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และคณาจารย์ที่ให้ความเมตตา และให้คำปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว ที่ได้ให้ช่วยเหลือด้านการจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซิสด้วยวิธีทางอนุพันธุศาสตร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรหมกุล ที่ให้ให้ความช่วยเหลือด้านการพิสูจน์เอกลักษณ์สาร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านการทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเซลล์มะเร็ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เริงพิพัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว ได้กรุณาให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นายจตุพล เหลียงสกุล (พีโอม) ที่ช่วยเหลือด้านการวิเคราะห์สารโดยวิธีทางเคมี นางสาววันทนี ทาทอง (พีแจ่ง) ที่ช่วยเหลือด้านเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ นางสาวปิณ สุวรรณจุณี (พีสายพิณ) และ นางสาวชฎานิชฐ์ บุณรักษ์ (ผึ้ง) ที่ช่วยเหลือด้านการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง นางสาวพรรณรัตน์ สุวรรณประทุมเลิศ (น้องรัตน์) ที่ช่วยเหลือด้านการแยกเชื้อ นางสาวสุนัดดา โยมญาติ (พีน้อย) และ นางสาวทศนา นิธิสกุลกาญจน์ (พีขวัญ) ที่ช่วยเหลือด้านการหาข้อมูล และให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการเรียน และการทำวิจัยด้วยดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้อบรมสั่งสอน และให้ความเมตตาเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ร่วมเรียนร่วมทำกิจกรรมด้วยกันมา ทั้งยังให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ ด้วยดีเสมอมา

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่คอยให้ความรัก ความห่วงใย เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ และตลอดชีวิตของข้าพเจ้า

## สารบัญ

## หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทั่วไป และแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัยซิส.....	3
2.2 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซิส.....	4
2.3 วงจรชีวิตของแอกติโนมัยซิส.....	10
2.4 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซิส.....	11
2.5 การคัดแยก และการคัดเลือกแอกติโนมัยซิส.....	15
2.6 การประยุกต์ใช้แอกติโนมัยซิส.....	16
2.7 สารปฏิชีวนะ.....	18
2.8 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซิส.....	19
2.9 การพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแอกติโนมัยซิส.....	26
2.10 สารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง.....	29
2.11 การพบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดใหม่จากแอกติโนมัยซิส.....	31
2.12 แอกติโนมัยซิสจากทะเลที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	33
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	37
3.1 อุปกรณ์.....	37
3.2 สารเคมี.....	40
3.3 ตัวอย่างดิน และทราย.....	42
3.4 การแยกแอกติโนมัยซิสจากดินตัวอย่าง.....	42
3.5 การเก็บรักษาแอกติโนมัยซิส.....	43

3.6 การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซิส.....	43
3.7 การทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัด จากแอกติโนมัยซิส.....	44
3.8 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซิสที่แยกได้ ด้วยวิธีทางอนุพันธุศาสตร์.....	46
3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี.....	50
3.10 การสกัด และทดสอบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากแอกติโนมัยซิส.....	52
3.11 การหาอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากแอกติโนมัย-ซิส สายพันธุ์ J6.2.....	56
3.12 การแยก และทำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์.....	57
3.13 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้.....	58
3.14 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้.....	58
4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	60
4.1 ลักษณะดิน และทรายตัวอย่าง.....	60
4.2 แอกติโนมัยซิสจากดิน และทรายตัวอย่าง.....	62
4.3 การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะเบื้องต้น.....	66
4.4 การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเบื้องต้น.....	68
4.5 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของแอกติโนมัยซิส.....	70
4.6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้.....	72
4.7 การจำแนกแอกติโนมัยซิสสายพันธุ์ P1.1, J6.2 และ J15.4 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA.....	73
4.8 การศึกษาสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี ของแอกติโนมัยซิสสายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4.....	85
4.9 การทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอโทซิสของ <i>Streptomyces</i> sp. สายพันธุ์ J6.2 .....	96
4.10 การหาอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพจาก <i>Streptomyces</i> sp. สายพันธุ์ J6.2.....	97



บทที่	หน้า
4.11 การผลิต และการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	99
4.12 การทำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์ และ การพิสูจน์เอกลักษณ์ ของสารที่แยกได้.....	102
4.13 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้.....	103
5 สรุปผลการทดลอง.....	106
รายการอ้างอิง.....	111
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร สารเคมี และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	118
ภาคผนวก ข อาหาร สารเคมี และวิธีเตรียมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	128
ภาคผนวก ค สารเคมี และวิธีการเตรียมที่ใช้ในเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์.....	130
ภาคผนวก ง วิธีการทดลอง.....	132
ภาคผนวก จ ตารางแสดงผลการทดลอง.....	133
ภาคผนวก ฉ ข้อมูลสเปกโทรสโกปี.....	137
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	146

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซิสที่ไม่จัดอยู่ในสกุล <i>Streptomyces</i> .....	25
2.2	กลไกการทำงานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทะเล ที่ได้รับการพัฒนาเป็นยารักษาโรคมาเร็ง.....	30
2.3	สารชนิดใหม่ที่ผลิตจากแอกติโนมัยซิสในทะเลระหว่างปี 2003 ถึง 2005.....	33
4.1	ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิส ที่แยกได้จากอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี.....	60
4.2	ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิส ที่แยกได้จากอำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา.....	61
4.3	ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิส ที่แยกได้จากอำเภอหางาว จังหวัดระนอง.....	62
4.4	ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิส ที่แยกได้จากแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี.....	62
4.5	สายพันธุ์และลักษณะของแอกติโนมัยซิสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน และทราย.....	63
4.6	ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซิส.....	67
4.7	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารสกัดจากแอกติโนมัยซิส.....	68
4.8	การจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยซิสที่แยกได้.....	70
4.9	ระดับความเหมือนของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1, J6.2 และ J15.4 เทียบกับฐานข้อมูลยีนใน Gene Bank.....	82
4.10	การเจริญของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ International <i>Streptomyces</i> Project (ISP).....	87
4.11	การสร้างรงควัตถุเมลานิน การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ การรีดิวส์ไนเตรท และการเจริญที่ pH 4.3 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4.....	92
4.12	การเจริญของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	93
4.13	ความสามารถในการย่อยสลายสารต่างๆของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4.....	93
4.14	ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4.....	94

ตารางที่	หน้า
4.15 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4.....	95
4.16 การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ของ <i>Streptomyces</i> sp. สายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ.....	97
4.17 ส่วนที่แยกได้จากซิลิโคแลคโตน เมื่อใช้ระบบตัวทำละลายต่างๆ.....	102
4.18 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อใช้ส่วนผสมของสาร ที่แยกได้ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่างๆ.....	104
4.19 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เมื่อทดสอบด้วยส่วนผสม ของสารที่แยกได้.....	105
5.1 สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และความสามารถในการเจริญ ที่อุณหภูมิต่างๆ และการเจริญที่พีเอช 4.3 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4.....	107

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	การเจริญของแอกติโนมัยซิส.....4
2.2	องค์ประกอบภายในสายใยของแอกติโนมัยซิส.....5
2.3	เทคนิคการทำสไลด์ (slide culture).....5
2.4	เทคนิคการทำสไลด์ โดยการเสียบแผ่นกระจก cover slip ลงในชั้นวุ้น.....6
2.5	การสร้างสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ และ สปอร์สายสั้น.....6
2.6	การสร้างสปอร์สายยาว.....7
2.7	รูปร่างสปอร์ของแอกติโนมัยซิส.....7
2.8	อับสปอร์ และก้านชูสปอร์ของแอกติโนมัยซิส.....8
2.9	การสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์.....9
2.10	วงชีวิตของ <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) .....10
2.11	แผนภาพระดับความสัมพันธ์กันทางพันธุศาสตร์ของแอกติโนมัยซิส และแบคทีเรียกลุ่มอื่น โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของยีนประมวลรหัส 16S rRNA.....14
2.12	Streptomycin.....19
2.13	Neomycin B.....19
2.14	Chloramphenicol .....20
2.15	Tetracyclin และ Chlorotetracyclin .....20
2.16	Oxytetracyclin.....20
2.17	Erythromycin.....21
2.18	Lincomycin.....21
2.19	Rifamycin B.....21
2.20	Rifamycin SV.....21
2.21	Nystatin.....22
2.22	Azomycin.....22
2.23	Vancomycin.....23
2.24	Teicoplanin A2 -3.....23

รูปที่	หน้า
2.25	Thienamycin.....24
2.26	Clavulanic acid.....24
2.27	สารปฏิชีวนะที่สร้างจาก <i>Streptomyces lipmanii</i> สายพันธุ์ TN97.....27
2.28	สารปฏิชีวนะกลุ่ม flavomycin.....28
2.29	resistoflavin.....32
2.30	โครงสร้างโมเลกุลของ lupinacidin A และ B.....32
2.31	โครงสร้างสารที่พบจากแอคติโนมัยซิสในทะเล .....35
2.32	โครงสร้างโมเลกุลของ neomarinone และอนุพันธ์ของสารกลุ่ม marinone.....36
3.1	แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดสาร.....53
4.1	แสดงการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ของแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1.....66
4.2	แสดงการยับยั้งยีสต์ และราทดสอบของแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2.....66
4.3	ขนาดของ PCR product เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ บนอะกาโรสเจล.....74
4.4	ลำดับเบสขึ้นส่วนของดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1.....76
4.5	ลำดับเบสของขึ้นส่วนของดีเอ็นเอ ของแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2.....79
4.6	ลำดับเบสของขึ้นส่วนของดีเอ็นเอ ของแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ J15.4.....81
4.7	สายสปอร์ของแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....85
4.8	สายสปอร์ของแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....85
4.9	สายสปอร์ของแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ J15.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....86
4.10	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 1.....89
4.11	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 2.....89
4.12	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 3.....90
4.13	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 4.....90
4.14	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 5.....91
4.15	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 6.....91
4.16	เซลล์มะเร็งตับ HepG2 เมื่อสัมผัสกับสารสกัดจาก <i>Streptomyces</i> sp. สายพันธุ์ J6.2..96
4.17	เซลล์มะเร็งตับ HepG2 เมื่อสัมผัสกับยา SS.....96
4.18	เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่ไม่เกิดการอะพ็อบโทซิส.....96

รูปที่	หน้า
4.19	กราฟแสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบ เมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซิสสายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ.....98
4.20	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ.....98
4.21	NMR spectra ของสารสกัดส่วนเอทิลอะซิเตตของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2.....100
4.22	NMR spectra ของสารสกัดส่วนเมทานอลของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2.....101
5.1	โครงสร้างโมเลกุลของ borrelidin.....108
5.2	โครงสร้างโมเลกุลของ manumycin.....109

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

แอกติโนมัยซิสเป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างเส้นใย มีเซลล์เป็นชนิดโพคาริโอต เนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีส่วนประกอบของผนังเซลล์เช่นเดียวกับแบคทีเรียแกรมบวก สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ทำลายรา แต่ไวต่อสารปฏิชีวนะที่ทำลายแบคทีเรีย ดีเอ็นเอของแอกติโนมัยซิสมีปริมาณของเบสกวานีน และไซโตซีน (%G+C) สูงกว่าดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั่วไป ลักษณะเส้นใยของแอกติโนมัยซิสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าเส้นใยของรา (Skyles และ Skinner, 1973) แอกติโนมัยซิสสืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ (sporangiospore) ที่บรรจุอยู่ในอับสปอร์ (sporangium) อาจเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือมีลักษณะเป็นสาย โคโลนีของแอกติโนมัยซิสมีหลากหลายสี ประกอบด้วยสายใยอาหาร (substrate mycelium) และ สายใยอากาศ (aerial mycelium) (Holt และคณะ, 1994)

แอกติโนมัยซิสอาศัยอยู่ทั่วไปในดิน และสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ได้แก่ น้ำโคลน เนื้อเยื่อพืช และอากาศ แอกติโนมัยซิสมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลาย (saprophyte) ใช้แหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อน เช่น ลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ไคติน และเพคติน เป็นต้น มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของแอกติโนมัยซิสทั้งหมดที่สามารถยับยั้งราได้ คือ *Streptomyces* spp. (Lee และ Hwang, 2002)

แอกติโนมัยซิสสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ได้ โดยหลายชนิดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive metabolite) ได้แก่ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) Kieser และคณะ (2002) ได้รายงานว่สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิส่วนใหญ่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยซิส โดยผลิตได้ 61 % ของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิทั้งหมดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ในขณะที่แบคทีเรียผลิตได้ 11 % และ ราผลิตได้ 28% ยิวดี มหาศักดิ์ศิริ (2003) แยกแอกติโนมัยซิสจากดินร่วนปนทรายในประเทศไทย ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะทำลายแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และราที่ก่อให้เกิดโรคพืช Igarashi (2003) รายงานว่า แอกติโนมัยซิสที่เจริญในใบพืช (endophytic actinomycetes) สร้างสารที่ช่วยในการเจริญ และการอยู่รอดของพืช โดยมีสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต และยังช่วยให้พืชต้านทานต่อโรคพืช นอกจากนี้ สารปฏิชีวนะจากแอกติโนมัยซิสบางชนิดได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร เช่น fungichomin ที่ผลิตโดย *Streptomyces padanus* ใช้ควบคุมโรคเน่าคอดินในกระหล่ำปลี ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Rhizotonia solani* (Shih และคณะ, 2003)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยซิสที่สำคัญ นอกจากสารปฏิชีวนะแล้ว ได้มีการค้นหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (antitumor) จากแอคติโนมัยซิส ซึ่งได้มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคมะเร็งในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา (Mayer และ Gustafson, 2006) ทะเลเป็นแหล่งที่น่าสนใจในหาค้นหาแอคติโนมัยซิส ที่มีความสามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง Burkhard (2003) ได้รายงานสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งต่างๆในทะเล ที่ได้รับการพัฒนาเป็นยารักษาโรค รวมถึงสารที่ได้รับการพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งด้วย

ดังนั้นการแยกหาแอคติโนมัยซิสจากบริเวณชายหาด และป่าชายเลน ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จึงจะเป็นโอกาสที่สามารถค้นพบแอคติโนมัยซิสสายพันธุ์ที่มีความสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูง รวมถึงการค้นพบแอคติโนมัยซิสชนิดใหม่ อันเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเทคโนโลยีทางชีวภาพ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยาต่อไป ทั้งยังเป็นประโยชน์ในการพัฒนาความรู้ด้านความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยซิส ในประเทศไทยอีกประการหนึ่ง

### วัตถุประสงค์

เพื่อแยกแอคติโนมัยซิสจากดิน และทรายบริเวณชายหาด และป่าชายเลนที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และสารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง จำแนกชนิดของแอคติโนมัยซิสที่คัดเลือก ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สกัดแยก และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น

### ขั้นตอนการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างดิน และทราย และแยกแอคติโนมัยซิสจากดิน และทรายตัวอย่าง
2. ทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น
3. จำแนกสกุล และชนิดของแอคติโนมัยซิส
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
5. ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
6. สกัด และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เชื้อสร้าง

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ค้นพบแอคติโนมัยซิสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และพิสูจน์เอกลักษณ์สารนั้นเพื่อใช้เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมยา ทั้งยังเป็นข้อมูลในการสำรวจหาแอคติโนมัยซิสชนิดใหม่ในประเทศไทยต่อไป



## บทที่ 2

### เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1) ลักษณะทั่วไป และแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัยซิส

แอกติโนมัยซิสจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีการสร้างเส้นใย โดยมีเปอริเซ็นต์เบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (Kieser และคณะ, 2000) แม้ว่าแอกติโนมัยซิสจะสามารถสร้างเส้นใยได้คล้ายกับรา แต่มีลักษณะต่างๆที่แตกต่างจากราคือ แอกติโนมัยซิสไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไม่โทคอนเดรีย (Cross และ Goodfellow, 1973) ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซิสประกอบด้วยสารจำพวก 2, 6 diaminopimelic acid alanine glycine glutamic acid และ mucopeptide (*N*- acetyl glucosamine เชื่อมกับ *N*- acetyl muramic acid) (David, 1959) ซึ่งต่างจากผนังเซลล์รา เส้นใยของแอกติโนมัยซิสมีขนาดเล็กกว่ารา คือมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 2.0 ไมโครเมตร สายใยของแอกติโนมัยซิสประกอบด้วยสายใยอาหาร (substrate mycelium) และสายใยอากาศ (aerial mycelium) สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ โดยมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ สายสปอร์ หรืออาจมีการสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ (sporangium)

แอกติโนมัยซิสพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ดิน น้ำ อากาศ โคลน มูลสัตว์ และสามารถพบแอกติโนมัยซิส อาศัยอยู่ร่วมกันกับพืช Grigorevski-Lima และคณะ (2006) รายงานปริมาณแอกติโนมัยซิสในอากาศ ภายในอาคาร ในกรุงริโอเดอจาเนโร ประเทศบราซิล มีปริมาณเฉลี่ย 11 CFU/ m<sup>3</sup> โดยบริเวณที่มีมากที่สุด พบปริมาณแอกติโนมัยซิส 127 CFU/m<sup>3</sup> แอกติโนมัยซิสบางชนิดสามารถดำรงชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycete) Cao และคณะ (2005) สามารถแยก endophytic streptomycete ได้จากรากกล้วย โดยวิธีฆ่าเชื้อที่พื้นผิว (surface sterilization) โดยเชื้อส่วนใหญ่จัดอยู่ใน genus *Streptomyces* นอกจากนี้ แอกติโนมัยซิสยังสามารถแยกได้จากสัตว์ทะเล *Spongia* และคณะ (1999) ได้สำรวจจุลินทรีย์ในทะเล โดยเก็บตัวอย่างจากฟองน้ำ และโคลนใต้ทะเล พบว่า ประมาณครึ่งหนึ่งของจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นแอกติโนมัยซิส และอยู่ในสกุล *Streptomyces* โดยพบในฟองน้ำ 31% และพบในโคลนใต้ทะเล 50% นอกจากนี้ยังสามารถพบแอกติโนมัยซิสได้จากไลเคนส์ ทั้งในเขตอบอุ่น และเขตหนาว (Ignacio และคณะ, 2005) แอกติโนมัยซิสบางชนิดสามารถดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับรากพืชโดยจะอาศัยในปมรากพืช (nodule) ทำหน้าที่ช่วยตรึงไนโตรเจนในอากาศ โดยเฉพาะสกุล *Frankia*

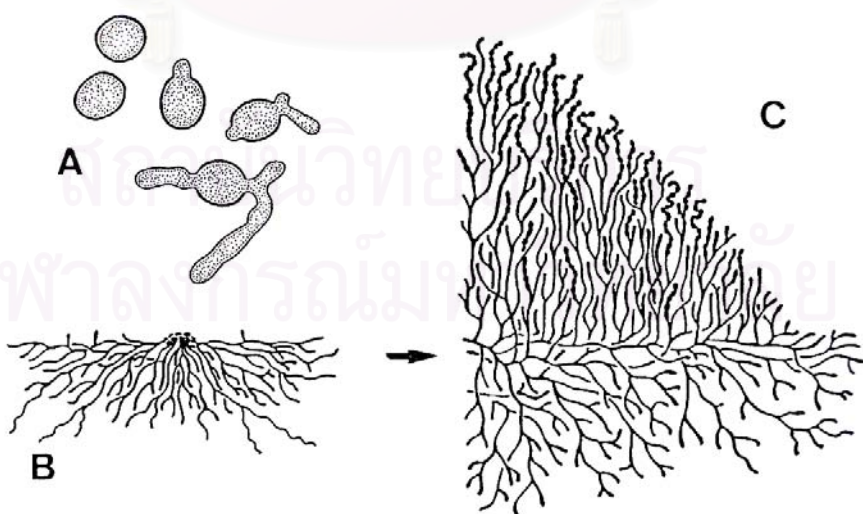
## 2.2) สันฐานวิทยาของแอกติโนมัยซิส

### 2.2.1) ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซิส และการเพาะเลี้ยง

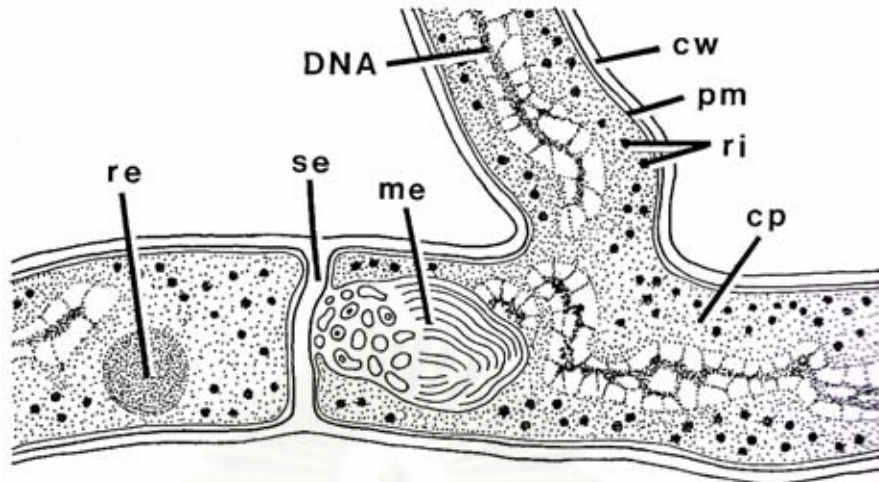
การสร้างโคโลนีเริ่มตั้งแต่การงอกเป็นเส้นใยแทรกตัวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือวัสดุยึดเกาะ พัฒนาเป็นสายใยอาหาร จากนั้นเส้นใยที่หนาแน่นได้เกิดการรวมตัวเป็นโคโลนีของเชื้อโคโลนีแอกติโนมัยซิสในระยะแรกอาจมีแต่สายใยอาหารเท่านั้น หลังจากนั้นจะพัฒนาสายใยอากาศ หรืออาจมีการสร้างสายใยอาหาร และสายใยอากาศพร้อมกัน สายใยอากาศของแอกติโนมัยซิสจะมีลักษณะชูขึ้นไปบนอากาศทำหน้าที่ในการสร้างสปอร์

โคโลนีของแอกติโนมัยซิสที่ประกอบด้วยสายใยอาหาร และสายใยอากาศ รวมตัวกันหนาแน่นดังแสดงในรูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีของแต่ละสปีชีส์ มีความแตกต่างกันไป ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมีขนาดตั้งแต่ ประมาณ 1 มิลลิเมตร จนถึง 2 - 3 เซนติเมตร ลักษณะอาจฟู มีผิวคล้ายผงแป้ง หรือแบนเรียบติดกับอาหาร หรือมีลักษณะผิวโคโลนีคล้ายหนัง มีสีหลากหลาย เช่น ขาว เหลือง เขียว ส้ม แดง ม่วง เป็นต้น เช่น *Streptomyces* มีทั้งสายใยอาหาร และสายใยอากาศ โคโลนีอาจฟู ผิวโคโลนีคล้ายผงแป้ง ส่วน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีสายใยอากาศ และ *Sporichthya* มีสายใยอากาศสั้น

โครงสร้างภายในเส้นใย ประกอบด้วย ผนังเซลล์ซึ่งหนาประมาณ 10 -20 นาโนเมตร ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ประกอบด้วยส่วนของไซโตพลาสซึม ซึ่งมีบริเวณของสายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆที่สะสมในเซลล์ ได้แก่ พอลิฟอสเฟต ไซมัน และ พอลิแซ็กคารไรด์ ในเส้นใยมีผนังกัน (Vobis, 1997) รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างภายในเส้นใยของแอกติโนมัยซิส

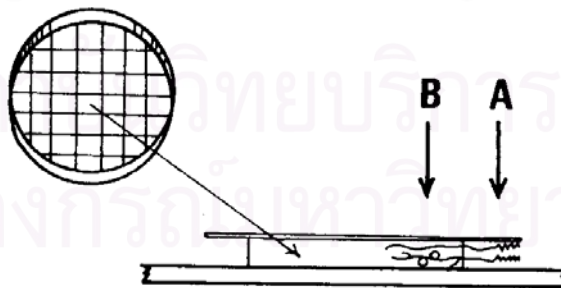


รูปที่ 2.1 การเจริญของแอกติโนมัยซิส (A) การงอกของสปอร์ (B) การสร้างสายใยอาหาร (C) ขอบเขตการสร้างสายใยอากาศ และการสร้างสปอร์

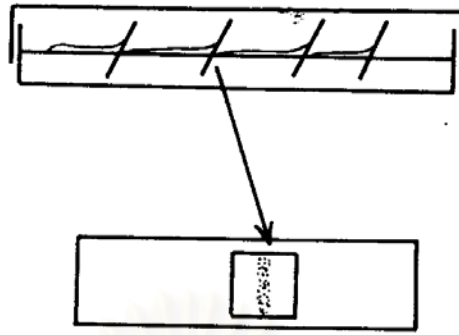


รูปที่ 2.2 องค์ประกอบภายในสายใยของแอกติโนมัยซิสประกอบด้วยไซโตพลาสซึม (cp; cytoplasm) เยื่อหุ้มเซลล์ (pm; plasmamembrane) ผนังเซลล์ (cw; cell wall) ผนังกั้นภายในเส้นใย (se; septum) ไรโบโซม (ri; ribosome) สารที่เก็บไว้ในเซลล์ (re; reserve material) และ ดีเอ็นเอ (DNA)

การเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซิสเพื่อศึกษาโคโลนีมีเทคนิคหลากหลาย แล้วแต่วัตถุประสงค์และการนำไปใช้ เช่น เทคนิคการทำสไลด์โดยการเลี้ยงแอกติโนมัยซิสในชั้นวุ้นที่ตัดไว้ จะทำให้สามารถศึกษาเปรียบเทียบลักษณะของสายใยอาหาร กับสายใยอากาศ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 เทคนิคการทำสไลด์แบบเสียบแผ่นกระจกลงในอาหาร เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาโครงสร้างของสายใยอากาศที่ต่ออยู่กับสายสปอร์ มักใช้ศึกษาโครงสร้างสปอร์ของ *Streptomyces* ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (Cross, 1994)



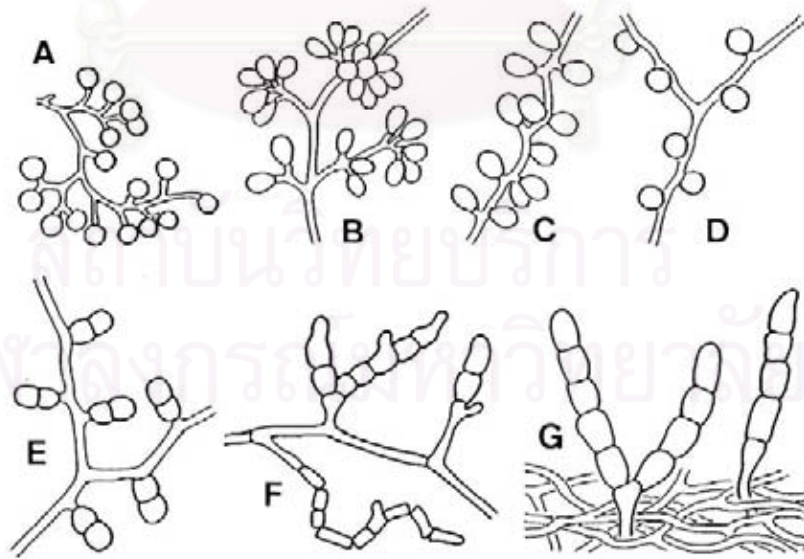
รูปที่ 2.3 เทคนิคการทำสไลด์ (slide culture) โดยเลี้ยงแอกติโนมัยซิสในชั้นวุ้นที่ตัดไว้ แล้วปิดทับด้วยแผ่นกระจก cover slip ที่ปราศจากเชื้อ หลังจากเชื้อเจริญแล้ว สังเกต (A) สายใยอากาศ (B) สายใยอาหารภายในเนื้อวุ้น



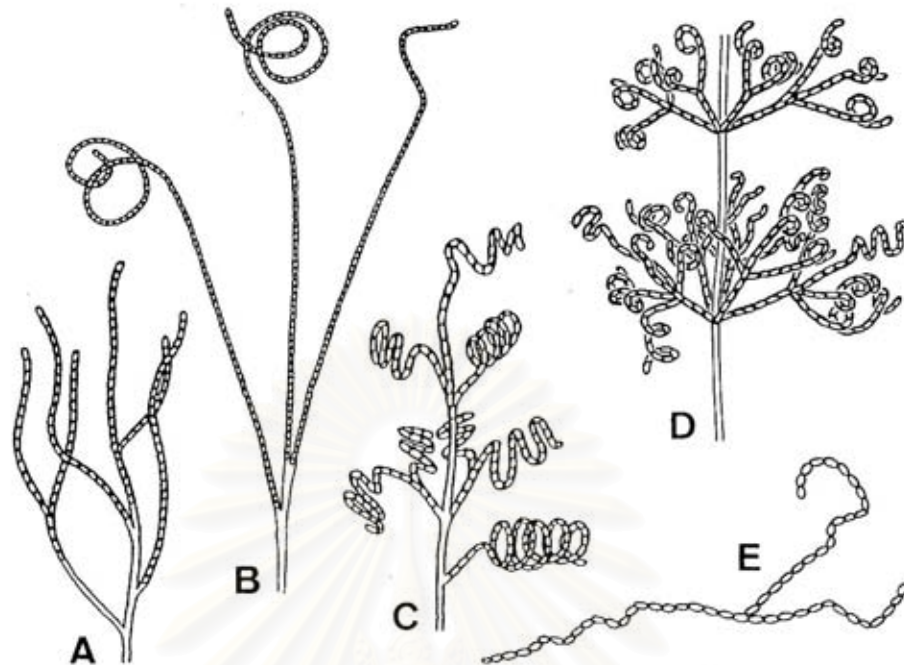
รูปที่ 2.4 เทคนิคการทำสไลด์ โดยการเสียบแผ่นกระจก cover slip ลงในชิ้นวุ้น หลังจากที่ยึดเชื้อเจริญบนแผ่นกระจกแล้ว นำแผ่นกระจกด้านที่มีเชื้อเจริญอยู่วางคว่ำลงบนแผ่นสไลด์ที่มีหยดสีย้อม แล้วสังเกตลักษณะเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์

### 2.2.2) สปอร์ของแอกติโนมัยซิส

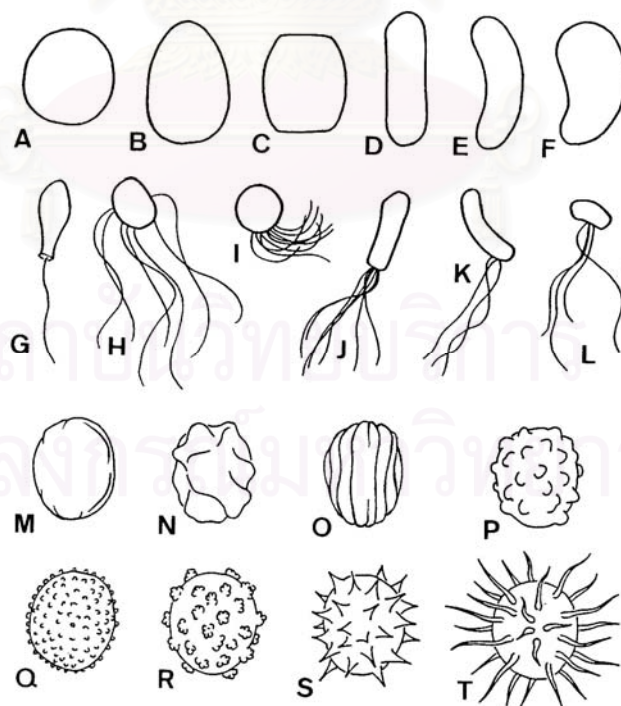
สปอร์ของแอกติโนมัยซิสมีหน้าที่ในการสืบพันธุ์ เกิดจากการแบ่งออกเป็นส่วนของสายใย (Fragmentation) โดยอาจมีการสร้างเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์สายสั้น (รูปที่ 2.5) หรือสปอร์สายยาว (รูปที่ 2.6) สปอร์มีรูปร่างที่หลากหลาย (รูปที่ 2.7) บางชนิดมีแฟลกเจลลาช่วยในการเคลื่อนที่ สปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้เรียกว่า planospores หรือ zoospores ดังแสดงในรูปที่ 2.7 G – L



รูปที่ 2.5 การสร้างสปอร์เดี่ยว (Monosporous) A – D, สปอร์คู่ (Disporous) E และ สปอร์สายสั้น (Oligosporous) F – G

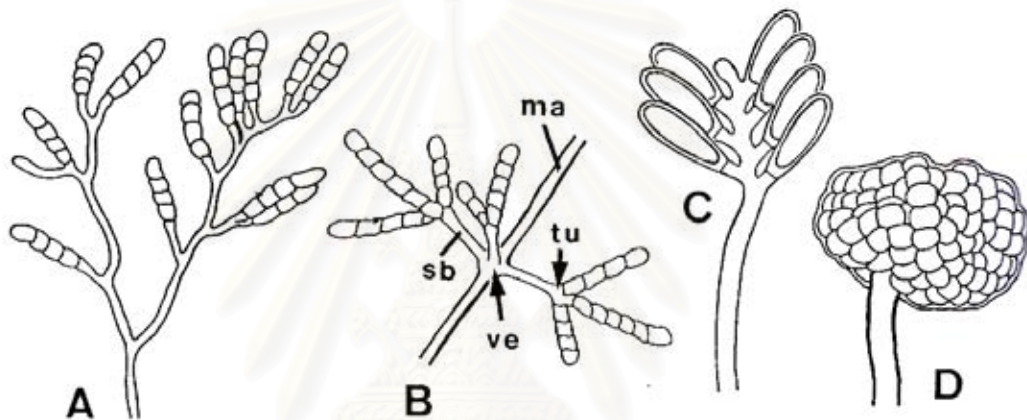


รูปที่ 2.6 การสร้างสปอร์สายยาว A – D ได้แก่ กลุ่มสเตรปโตไมซีต และ E ได้แก่ กลุ่มนอคาดิโอไฟซิด (A) Rectiflexibiles type (B) Retinaculiaperti type (C) Spira type (D) Verticillati type (E) fragmenting branched aerial hypha



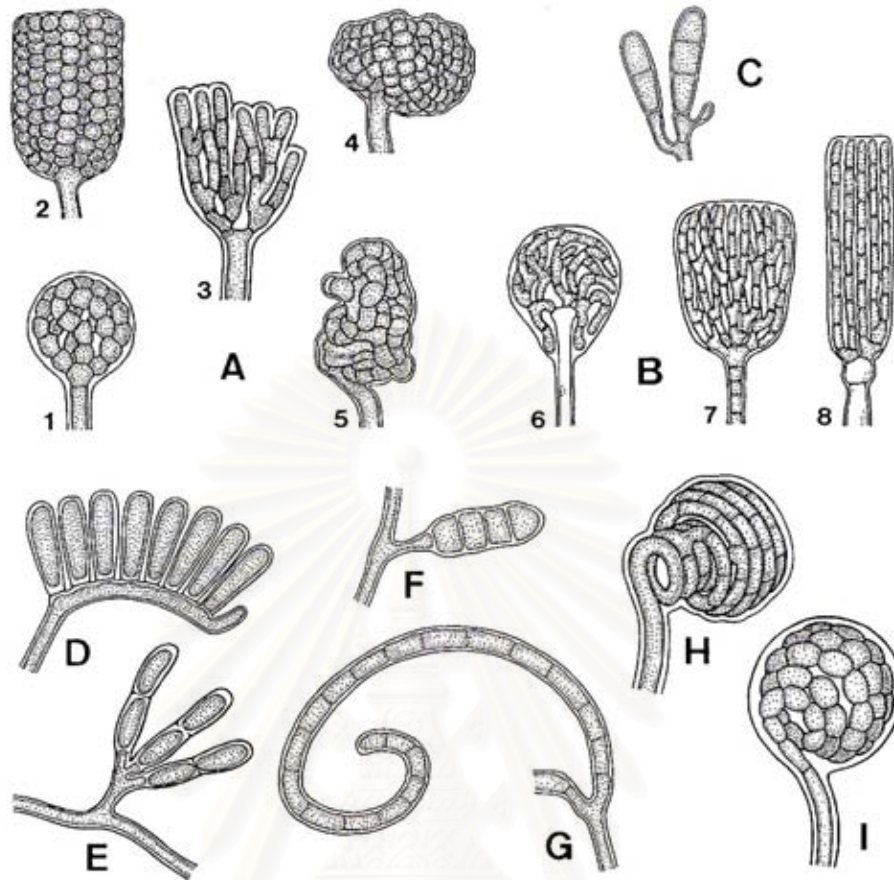
รูปที่ 2.7 รูปร่างสปอร์ของแอกติโนมัยซีต (A – F) สปอร์ผิวเรียบ, (G – L) สปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้, (M – P) สปอร์ผิวขรุขระ และ (Q – T) สปอร์ที่มีหนาม

แอกติโนมัยซีตสามารถสร้างสปอร์บนก้านชูสปอร์ (sporophores) หรือสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ (sporangium) ซึ่งพัฒนามาจากสายใยที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (Hawksworth และคณะ, 1983) โดยอาจจะเป็นส่วนหนึ่งของสายใยอาหาร หรือสายใยอากาศก็ได้ สายใยที่พัฒนาเป็นก้านชูสปอร์จะประกอบด้วย แกนหลัก (main axis) และ บริเวณสร้างสปอร์ (spore-forming part) แอกติโนมัยซีตบางชนิดมีก้านชูสปอร์ที่แตกสาขาออกเป็นส่วนตัว เรียกว่า verticil เป็นบริเวณที่มีการแตกช่อออกรอบๆ แกน side branch เป็นกิ่งที่แตกแขนงออกด้านข้างและ terminal umbel เป็นส่วนปลายของช่อสปอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.8 การสร้างสปอร์ที่อยู่ภายในอับสปอร์มีรูปร่างที่หลากหลาย ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.8 อับสปอร์ และก้านชูสปอร์ของแอกติโนมัยซีต

- (A) ก้านชูสปอร์แบบแตกกิ่งของ *Microteraspota* สร้างสปอร์บริเวณปลาย side branch
- (B) ก้านชูสปอร์แบบช่อสปอร์ เรียงตัวแนวเดียว (umbellate monoverticillate sporophore) ของ *Streptoverticillum* ma = main axis, ve = verticil, sb = side branch, tu = terminal umbel
- (C) ก้านชูสปอร์ของ *Planomonospora venezuelensis* ประกอบด้วยกิ่งสั้นๆ และมีอับสปอร์เดี่ยวเป็นรูปใบปาล์ม
- (D) ก้านชูสปอร์แบบไม่แตกกิ่งของ *Actinoplanes*



รูปที่ 2.9 การสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ แบ่งเป็น

(A) *Actinoplanes*: (1) globose (2) cylindrical (3) lobate (4) subglobose (5) irregular

(B) *Pilimelia*: (6) ovoid (7) campnulate (8) cylindrical

(C) *Dactylosporangium*: oligosporous claviform

เป็นสปอร์ที่สร้างภายในสายใยอาหาร

(D) *Planomonospora*: clavate (E) *Planobispora*: disporaous cylindrical

(F) *Planoteraspora*: tetrasporous cylindrical (G) *Planopolyspora*: polysporous tubular

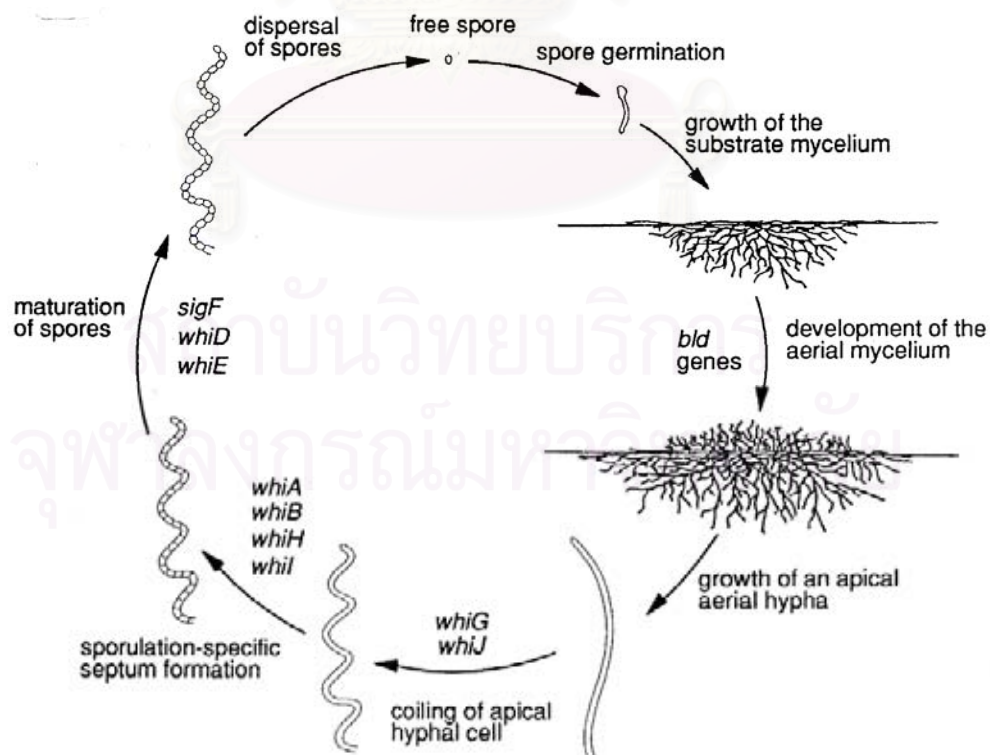
(H) *Spirillospora*: polysporous globose (I) *Streptosporangium*: polysporous spherical

เป็นสปอร์ที่สร้างภายในสายใยอากาศ

### 2.3) วงชีวิตของแอกติโนมัยซิส

วงชีวิตของแอกติโนมัยซิสเริ่มจากสปอร์งอกกลายเป็นสายใย สายใยเริ่มแรกเป็นสายใยอาหาร โดยแทรกตัวเข้าไปในพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นมีการสร้างสายใยอากาศ และพัฒนาสายใยอากาศเพื่อสร้างสปอร์ต่อไป Chater (1997) ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในระยะต่างๆของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) ซึ่งเป็นแอกติโนมัยซิสสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จัก และมีข้อมูลการศึกษาการทำงานในระดับพันธุศาสตร์มากในระดับหนึ่ง ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในระยะต่าง เช่น ยีนกลุ่ม *bld* เกี่ยวข้องกับการเจริญของสายใยอากาศ กลุ่มยีน *whi* ทำหน้าที่เกี่ยวกับการพัฒนาสายใยอากาศเพื่อสร้างสปอร์ โดยที่ยีน *whiG* และ *whiJ* ควบคุมการขาดเป็นเกลียวบริเวณปลายสายใยอากาศ ยีน *whiA whiB whiH* และ *whiL* ควบคุมการเริ่มสร้างสปอร์โดยการสร้างผนังกันภายในสายใยที่บิดเป็นเกลียว จากนั้น ยีน *SigF whiD* และ *whiE* จะมีหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของสปอร์ (spore maturation) เช่นควบคุมสีสปอร์ เป็นต้น เมื่อสปอร์ที่แก่เต็มที่หลุดออกจากสายสปอร์ และไปตกในบริเวณที่เหมาะสม สปอร์ก็จะงอกเป็นสายใยของแอกติโนมัยซิส เป็นการเริ่มต้นวงชีวิตต่อไป

การเจริญเติบโตในระยะต่างๆของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) และยีนบางส่วนที่เกี่ยวข้อง แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 วงชีวิตของ *Streptomyces coelicolor* A3(2)



## 2.4) การจัดจำแนกแอกติโนมัยซิส

การจัดจำแนกแอกติโนมัยซิสตามคู่มือ Bergey's manual of determinative bacteriology นั้น สามารถจำแนกได้ตามการสร้างเส้นใย ลักษณะสปอร์ องค์ประกอบของผนังเซลล์ การใช้แหล่งพลังงาน และที่อยู่อาศัย โดยสามารถจัดจำแนกได้เป็น 8 กลุ่ม คือ

### 1. นocardioform actinomycetes

แอกติโนมัยซิสกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลาย ส่วนใหญ่จะสร้างสายใยที่เป็นท่อนสั้นๆ บางกลุ่มสร้างสายใยอากาศ และสร้างสปอร์เป็นสาย การจัดจำแนกสกุล (Genus) ของกลุ่ม nocardioform จำแนกตามองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ การมีกรดไมโคลิก (mycolic acid) และลักษณะอื่นๆ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่

1.1 แบคทีเรียที่มีกรดไมโคลิก (Mycolic acid-containing bacteria)

1.2 สกุลชูโดร์นอคาร์เดีย และสกุลใกล้เคียง (*Pseudonocardia* and related genera)

1.3 สกุลนอคาร์ดิโอดีส และเทอร์ราแบคเตอร์ (*Nocardiodes* and *Terrabacter*)

1.4 สกุลโปรไมโครโมโนสปอรา และสกุลใกล้เคียง (*Promicromonospora* and related genera)

### 2. สกุลที่มีมัลติโลคูลาร์สปอร์แรงเกีย (Genera with multilocular sporangia)

เป็นกลุ่มที่มีการสร้างสายใยซึ่งแบ่งโดยมีผนังกันตามยาว (Longitudinal septa) และตามขวาง (Transverse septa) สร้างสปอร์เม็ดกลม สามารถเคลื่อนที่ได้ ได้แก่กลุ่มเดอร์มาโตฟิลิลัส (*Dermatophilus*) และ จีโอเดอร์มาโตฟิลิลัส (*Geodermatophilus*) ส่วนกลุ่มแฟรงเกิลีย (*Frankia*) สปอร์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

### 3. แอกติโนแพลนีส (Actinoplanetes)

เป็นกลุ่มที่มีสายใยอากาศน้อย หรืออาจไม่มีเลย มี meso-DAP และไกลซีนเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบอาราบินอส และไซโลสภายในเซลล์ แบ่งออกเป็นกลุ่มที่สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ภายในอับสปอร์ ได้แก่ แอกติโนแพลนีส (*Actinoplanes*) แอมพูลาเลลา (*Ampullariella*) แดกทิลอสปอร์แรงเจียม (*Dactylosporangium*) และพิลิเมีย (*Pilimelia*) กลุ่มที่สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ ไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยว และแคเทลลาโทสปอรา (*Catellatospora*) สร้างสปอร์เป็นสาย

### 4. สเตรปโตมัซิส และสกุลใกล้เคียง (Streptomyces and related genera)

แอกติโนมัยซิสกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลาย โดยทั้งหมดมี L-DAP และไกลซีนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แบ่งออกเป็น กลุ่มที่สร้างสายใยอากาศ และสายสปอร์ยาว ได้แก่

สเตรปโตมัยซีต (*Streptomyces*) และ สเตรปโตเวอริติซิลลัม (*Streptovorticillum*) สำหรับกลุ่มอื่นๆ ซึ่งสร้างสายใยอากาศน้อย หรือไม่สร้าง จะมีรูปแบบการสร้างสปอร์ที่หลากหลาย ได้แก่ อินทราสปอแรงเจียม (*Intrasporangium*) ไคเนอสปอเรีย (*Kineosporia*) และสปอริชยา (*Sporichthya*)

#### 5. กลุ่มแมดูโลมัยซีต (*Maduromycetes*)

จะสร้างสายใยอากาศได้ในปริมาณต่างๆ ซึ่งสามารถสร้างสปอร์ได้ ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-DAP และมี แมดูโรส เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ สเตรปโตสปอแรงเจียม และสกุลใกล้เคียง (*Streptosporangium* and related genera) และ แอกติโนแมดูรา (*Actinomadura*)

กลุ่มที่สร้างฮาโทรสปอร์สายสั้น ที่ไม่เคลื่อนที่ ได้แก่ ไมโครไบสปอรา (*Microbispora*) ไมโครเตตราสปอรา (*Microtetraspora*) และ แอกติโนแมดูรา (*Actinomadura*) สำหรับกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ แพลนโนไบสปอรา (*Planobispora*) แพลนโนโมโนสปอรา (*Planomonospora*) สไปริลโลสปอรา (*Spirillospora*) จะสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ภายในอับสปอร์ และกลุ่มที่สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ภายในอับสปอร์ ได้แก่ สเตรปโตสปอแรงเจียม (*Streptosporangium*)

#### 6. เทอร์โมโมโนสปอรา และสกุลใกล้เคียง (*Thermomonospora* and related genera)

สามารถสร้างสายใยอากาศ และสร้างสปอร์ ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-DAP แต่ไม่มีกรดอะมิโน หรือน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบในเซลล์ที่ถูกละลาย แบ่งออกเป็น กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว ได้แก่ เทอร์โมโมโนสปอรา (*Thermomonospora*) กลุ่มที่สร้างสายสปอร์ ได้แก่ แอกติโนซินนีมา (*Actinosynnema*) และ สเตรปโตออลอเทอิคัส (*Streptoalloteichus*)

#### 7. เทอร์โมแอกติโนมัยซีต (*Thermoactinomycetes*)

แอกติโนมัยซีตกลุ่มนี้มีเพียงสกุลเดียว คือ เทอร์โมแอกติโนมัยซีต (*Thermoactinomyces*) สามารถสร้างสายใยอากาศได้ สร้างสปอร์เดี่ยวแบบเอนโดสปอร์ (*endospores*) ทั้งภายในสายใยอาหาร และสายใยอากาศ ทุกชนิดเจริญในอุณหภูมิสูง ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-DAP แต่ไม่พบกรดอะมิโนหรือน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบในเซลล์

#### 8. กลุ่มอื่นๆ

เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มอื่นๆได้ โดยทุกชนิด สามารถสร้างสายใยอากาศ และสร้างสปอร์เป็นสายแบ่งออกเป็นสกุล *Kitasatospora Glycomyces Kibdelosporangium* และ *Saccharothix*

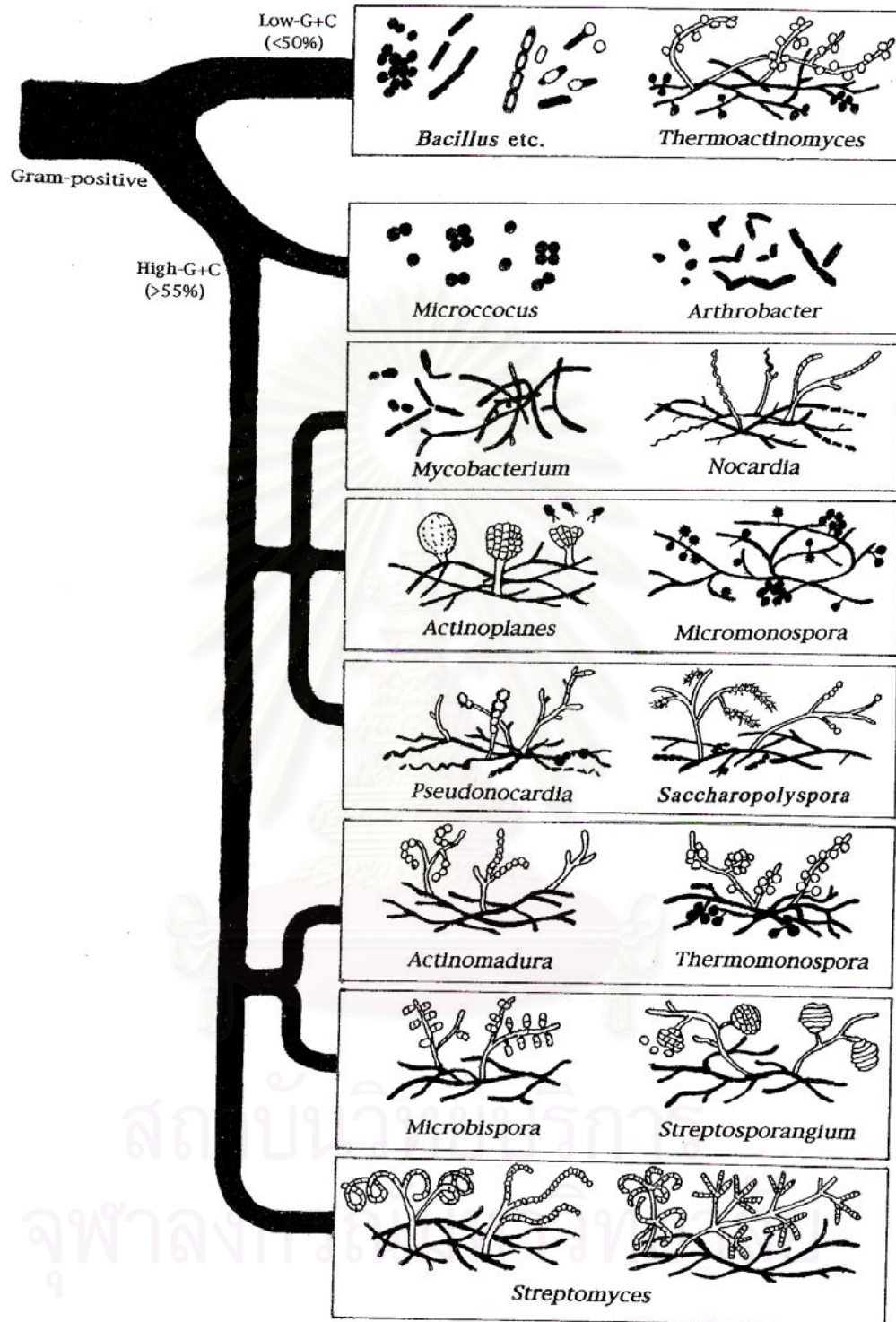
นอกจากการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีแล้ว ยังสามารถใช้วิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ โดยวิเคราะห์ลำดับยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ในการจำแนกแอกติโนมัยซีต อย่างไรก็ตาม วิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ อาจให้ผลที่แตกต่างกับวิธีการจำแนกแบบดั้งเดิม

ถึงระดับวงศ์ (family) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 *Thermoactinomyces* ซึ่งจัดเป็นแอกติโนมัยซิส เนื่องจากมีการสร้างเส้นใย และสปอร์สำหรับสืบพันธุ์ กลับมีความใกล้ชิดกันทางพันธุศาสตร์กับแอกติโนมัยซิสกลุ่มอื่น ๆ น้อยกว่า *Micrococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียไม่สร้างเส้นใย

*Actinomadura* กับ *Thermomonospora* ซึ่งถูกจัดให้อยู่คนละกลุ่มใน Bergey's manual เนื่องจากมีลักษณะโครงสร้างสปอร์ต่างกัน กลับมีความใกล้ชิดกันทางพันธุศาสตร์มากเมื่อเปรียบเทียบความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์

วิธีทางอณูพันธุศาสตร์โดยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียถึงระดับสกุล นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการจำแนกแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม Rintala และคณะ (2001) ได้พัฒนา primer 3 ตัวที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธีพีซีอาร์ บริเวณตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงกับยีนประมวลรหัส 16S rRNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบ *Streptomyces*

Lanoot และคณะ (2005) สามารถตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอภายในกลุ่ม streptomycetes และจัดเป็นกลุ่มต่างๆ 59 กลุ่ม จากเชื้อทั้งหมด 463 ตัว โดยใช้เทคนิค RFLP ซึ่งจำแนกความแตกต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอในบริเวณตำแหน่ง 16S-ITS (16S-ITS RFLP finger printing) ทำให้สามารถตรวจสอบความแตกต่างของ streptomycetes ชนิดต่างๆ ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น



รูปที่ 2.11 แผนภาพระดับความสัมพันธ์กันทางพันธุศาสตร์ของแอกติโนมัยซีต และแบคทีเรียกลุ่มอื่น โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของยีนประมวลรหัส 16S rRNA (ที่มา Atlas of Actinomycetes หน้า 198)

## 2.5) การคัดแยก และการคัดเลือกแอกติโนมัยซิส

แอกติโนมัยซิสส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในดิน มักมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารในธรรมชาติ สามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อน จึงเจริญได้ช้ากว่าแบคทีเรียอื่นๆ การคัดแยกแอกติโนมัยซิสจากธรรมชาติจึงต้องมีวิธีการจำเพาะที่เหมาะสม ในการแยกเชื้อจากแหล่งที่ต่างกัน การแยกแอกติโนมัยซิสจากธรรมชาติ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การ Pretreatment เพื่อกำจัดจุลินทรีย์อื่นๆ โดยการอบหรือต้มด้วยความร้อน การใช้สารเคมี หรือการใช้ไวรัสเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์บางชนิด (Kurtboke และคณะ, 1992) และการใช้อาหารที่จำเพาะต่อการเจริญของแอกติโนมัยซิสแต่ละชนิด (selective media) เช่น การเติมโคโคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นการเจริญของแอกติโนมัยซิส (Gryndler และคณะ, 2003) หรือการเติมสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ การแยกแอกติโนมัยซิสกลุ่มต่างๆมีวิธีการแยกที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแอกติโนมัยซิสที่ต้องการแยก และแหล่งที่มาของเชื้อดังตัวอย่างรายงานต่อไปนี้

Suzuki และคณะ (2000) แยกแอกติโนมัยซิสสกุล *Actinobispora* จากดิน โดยการอบดินที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัดแบคทีเรียอื่นๆ จากนั้นละลาย และเจือจางดินตัวอย่างในสารละลาย 0.85% NaCl เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Humic acid-vitamin gellan gum (HGV) ที่เติมสารปฏิชีวนะ leucomycin 1 µg/ml nivobiocin 1 µg/ml tunicamycin 0.5 µg/ml cyclohexamide 50 µg/ml และ nystatin 50 µg/ml ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกสกุล *Actinobispora* ได้ 18% ของจุลินทรีย์ทั้งหมด

Hayakawa และคณะ (1996) แยกแอกติโนมัยซิสสกุล *Microtetraspora* และสกุลใกล้เคียง โดยการนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำดินที่อบแล้วมาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ดูดสารละลายดินที่มีระดับการเจือจาง  $10^{-1}$  ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (5 mmol/l, pH 7.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม bezethonium 0.05% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LSV-SE agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 20 mg/l norfloxacin 20 mg/l และ nalidixic acid 10 mg/l

Hallmann และคณะ (1997) แยกแอกติโนมัยซิสที่อาศัยอยู่ภายในพืช (endophytic actinomycete) โดยการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ จากนั้นล้างให้สะอาดและบดด้วยโกร่งที่ปราศจากเชื้อ นำส่วนที่ได้จากการบดมากรองผ่านผ้าดี แล้วเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ และเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ

Boudjella และคณะ (2006) แยก *Streptosporangium* สายพันธุ์ Sg10 จากดินในประเทศแอลจีเรีย โดยนำดินตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเจือจางด้วยน้ำกลั่น นำมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin-B vitamins medium ซึ่งประกอบด้วย ไคติน  $K_2HPO_4$   $KH_2PO_4$   $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  NaCl  $CaCO_3$   $FeSO_4 \cdot 7H_2O$   $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$   $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  และวุ้น ปรับ pH เป็น 7.2 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อ ในส่วนของวิตามินบี ซึ่งประกอบด้วย thiamine-HCl riboflavin niacin pyrodoxin-HCl inositol Ca-pantothenate *p*-aminobenzoic acid และ biotin เติมหหลังจากที่นึ่งฆ่าเชื้ออาหารแล้ว นอกจากนี้ยังเติมยาปฏิชีวนะ kanamycin และ cycloheximide ความเข้มข้น 25 และ 50 mg/ml ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์

Lee และ Hwang (2002) ได้มีการศึกษาความหลากหลายของแอกติโนมัยซิสที่สามารถยับยั้งราได้ จากทางตะวันตกของประเทศเกาหลี พบว่าจากแอกติโนมัยซิสได้ทั้งหมด 1,510 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่จะพบ *Streptomyces* มากที่สุด ในทุกดินตัวอย่าง และ *Streptomyces* ที่แยกได้มากกว่า 50% สามารถยับยั้งราได้ ในดินบนภูเขา ที่มีความสูง 3,000 – 3,900 เมตรจากระดับน้ำทะเลในมณฑลยูนนาน ประเทศจีน นอกจากนี้ได้มีการสำรวจความหลากหลายของ แอกติโนมัยซิส โดยพบว่าเป็น *Streptomyces* 99% ของแอกติโนมัยซิสทั้งหมด (Xu และคณะ, 1996)

เนื่องจากสามารถพบ *Streptomyces* เป็นประชากรหลักในดิน Lazzarini (2000) ได้จัดแอกติโนมัยซิสที่ไม่ได้อยู่ในสกุล *Streptomyces* เป็นแอกติโนมัยซิสที่หายาก (rare actinomycete) เช่น สกุล *Actinomadura* *Actinoplanes* *Micromonospora* *Microbispora* เป็นต้น แอกติโนมัยซิสที่ไม่ใช่ *Streptomyces* จึงเป็นจุลินทรีย์อีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจ ในการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่

## 2.6) การประยุกต์ใช้แอกติโนมัยซิส

คุณสมบัติที่สำคัญของแอกติโนมัยซิส คือประโยชน์ทางการแพทย์โดยการใช้ผลิตสารปฏิชีวนะ และสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคนิดใหม่ๆต่อไป นอกจากนี้ แอกติโนมัยซิสยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีกหลากหลาย ครอบคลุมด้านอุตสาหกรรม การเกษตร และสิ่งแวดล้อม ดังตัวอย่างงานวิจัยต่างๆ ดังนี้

Oliveira และคณะ (2005) ใช้ *Frankia* spp. ซึ่งเป็นแอกติโนมัยไรซา (actinorrhiza) จัดเป็นแอกติโนมัยซิสที่สามารถอาศัยอยู่ในรากพืช และตรึงไนโตรเจนได้ นำมาติดเชื้อร่วมกับราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) *Glomus intraradices* ส่งผลทำให้พืช *Alnus glutinosa* ลดสภาวะความเครียดในดินที่มีความเป็นด่างสูง และเป็นการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต โดยที่พืชที่มีการใส่

เชื้อสองชนิดนี้ร่วมกันจะมีพื้นผิวใบมากขึ้น รากยาวขึ้น และมีมวลมากกว่าพืชที่ไม่มีเชื้อใส่เชื้อ หรือใส่เชื้อเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีประโยชน์ในการช่วยฟื้นฟูสภาพพืชในดินที่เป็นต่างสูง

El-tarabily และ Sivasithamparam (2006) ได้ศึกษา และรวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้องกับ แอกติโนมัยซิสที่ไม่ใช่สกุล *Streptomyces* (Non-streptomycete actinomycetes) ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราในดินที่ก่อโรคพืช เพื่อเป็นการควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) อีกทั้งยังเป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoter)

Stamford และคณะ (2002) แยก *Streptosporangium* sp. ซึ่งเป็น endophytic actinomycete อาศัยในใบของต้นข้าวโพด โดยเชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ glucoamylase ที่ทนร้อนได้ ซึ่งมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมที่ต้องมีการย่อยแป้ง ให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส

Sharma และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ Inulinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำฟรักโตสไซรัป จาก *Streptomyces* sp. โดยใช้ผงกระเทียมเป็นสารตั้งต้น และได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต Inulinase ที่สามารถให้ประสิทธิภาพการผลิตเทียบเท่าการผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

Goshev และคณะ (2005) แยกเอนไซม์ทนร้อน 2 ตัว ที่มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีนคอลลาเจนได้จากแอกติโนมัยซิส 2 ชนิด คือ *Microbispora* และ *Thermoactinomyces* เมื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับ Clostidiopeptidase A พบว่า เป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติคล้าย collagenase (collagenase-like enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องหนัง และขนสัตว์ โดยทำให้ขน และหนังอ่อนนุ่มลง

Castillo และคณะ (2006) คัดแยก streptomycetes จากดินทั้งในพื้นที่เกษตรกรรม และไม่ใช่พื้นที่เกษตรกรรม เพื่อตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายสารปราบวัชพืช diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และย่อยสลายได้ยาก เนื่องจากไม่ละลายน้ำ พบว่า streptomycetes เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีการย่อยสลาย diuron ได้ดี เหมาะสำหรับการบำบัดดินที่มีการปนเปื้อน diuron และ streptomycetes ที่แยกได้จากพื้นที่เกษตรกรรมมีความสามารถในการย่อยสลาย diuron ได้ดีกว่าจากที่ไม่ใช่พื้นที่เกษตรกรรม

Benimeli และคณะ (2007) คัดแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ M7 จากโคลนในแหล่งน้ำเสีย ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลาย lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) ได้ lindane เป็นสารฆ่าแมลงที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงมักตกค้าง และสะสมในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ พืช สัตว์ อาหาร รวมถึงในเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ งานวิจัยชิ้นนี้เป็นฉบับแรกที่

รายงานการย่อยสลาย lindane ของจุลินทรีย์ โดยไม่ต้องสะสมไว้ในเซลล์ หรือต้องเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสารอื่นก่อนการย่อยสลาย

จากรายงานดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า แอคติโนมัยซิสเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจในการศึกษา และประยุกต์ใช้ถ้าเกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ อีกกลุ่มหนึ่ง

## 2.7) สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะเป็นสารประกอบอินทรีย์ ที่ได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนมากจะเป็นสารเมทาบอลิท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ หรือฆ่าจุลินทรีย์ได้โดยใช้ความเข้มข้นต่ำ (Dermain, 1999) นอกจากจุลินทรีย์แล้ว อาจจะสามารถพบได้จากแหล่งอื่นๆ ในธรรมชาติ เช่น พืช สัตว์ หรือได้จากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ลักษณะของสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค จะต้องมีคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้ (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544)

1. สามารถทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด หรือเรียกว่ามีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum antibiotics)
2. ไม่ทำให้เชื้อโรคเกิดการดื้อยา หรือผ่าเหล่า (mutation)
3. ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์กับผู้ป่วย เช่น ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ หรือรบกวนระบบการทำงานในร่างกาย
4. ไม่ทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในร่างกายผู้ป่วย เพราะอาจทำให้เกิดการเสียสมดุลธรรมชาติ ทำให้เกิดการติดเชื้อจากจุลินทรีย์อื่นๆ

การทำงานของสารปฏิชีวนะแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (microbistatic) เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายกำจัดจุลินทรีย์แปลกปลอม โดยกระบวนการฟาโกไซโตซิส การผลิตแอนติบอดี การผลิต interferon หรือกลไกการปฏิเสธรังแปลกปลอมของลำไส้ เช่นอาการท้องเสีย หรืออาเจียน สำหรับการดำเนินงานแบบฆ่าจุลินทรีย์ (microbicidal) จะทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์แตก แต่ไม่สามารถยับยั้งผลจากสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างได้ (Edward, 1980) กลไกการทำงานของสารปฏิชีวนะ แบ่งออกเป็น 5 แบบ คือ (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544)

1. กลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ เพนนิซิลลิน (penicillin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) ไซโคลเซอริน (cycloserine) แวนโคไมซิน (vancomycin) และบาซิตราซิน (bacitracin)
2. กลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ โพลิมิกซิน (polymixin) แกรมมิซิดิน (gramicidins) ไทโรซิดีน (tyrocidin) นิสเตติน (nystatin) และแอมโฟเทอริซิน (amphotericin)

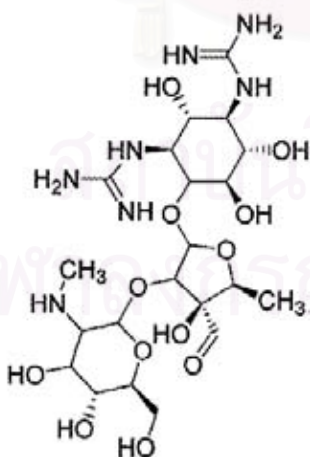


3. กลุ่มที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน ได้แก่ สเตรปโตไมซิน (streptomycin) กานาไมซิน (kanamycin) นีโอไมซิน (neomycin) เตตราไซคลิน (tetracycline) ออริโอไมซิน (aureomycin) เทอราไมซิน (terramycin) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) อิริโทรไมซิน (erythromycin)
4. กลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของกรดนิวคลีอิก ได้แก่ ไรแฟมพิซิน (rifampicin) แอกติโนไมซิน (actinomycin) ไมโตไมซิน (mitomycin) กรีสซิโอฟลูวิน (griseofluvin)
5. กลุ่มที่ยับยั้งระบบเอนไซม์ที่จำเพาะ ได้แก่ ซัลโฟนาไมด์

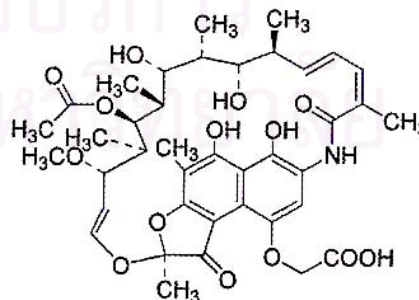
## 2.8) สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนไมซีต

สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ในปัจจุบันผลิตจากแอกติโนไมซีต ซึ่งแต่ละชนิดมีกลไกในการทำงานแตกต่างกัน โดยอาจจะส่งผลต่อการสร้างผนังเซลล์ รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือขัดขวางการสร้างดีเอ็นเอ เป็นต้น Snedder (2005) ได้จัดจำแนกสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนไมซีตเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

1. กลุ่ม Streptomycin และ Aminoglycoside กลุ่มอื่นๆ ได้แก่ streptomycin neomycin kanamycin lincomycin gentamycin เป็นต้น สูตรโครงสร้างพื้นฐาน ประกอบด้วย amino sugar ที่เชื่อมกันแบบ glycoside linkage ออกฤทธิ์แบบ bacteriocide โดยรบกวนการแปลรหัสของ mRNA ในไรโบโซมทำให้ยับยั้งสังเคราะห์โปรตีน โครงสร้างโมเลกุลของ streptomycin และ neomycin B แสดงดังรูปที่ 2.12 และ 2.13 ตามลำดับ

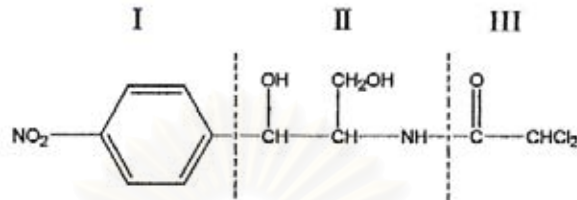


รูปที่ 2.12 Streptomycin



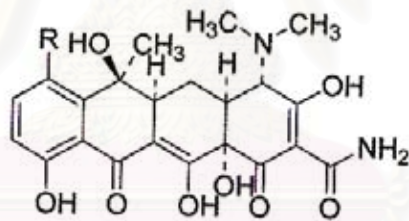
รูปที่ 2.13 Neomycin B

2. กลุ่ม Chloramphenicol โครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลประกอบด้วยวงอะโรมาติก (I) ส่วนไฮโดรคาร์บอนที่มีการขยายได้ (II) และ หมู่ acyl (III) แสดงดังรูปที่ 2.14 ออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic โดยยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

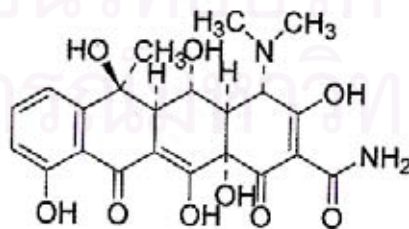


รูปที่ 2.14 Chloramphenicol

3. กลุ่ม Tetracycline ได้แก่ aureomycin (chlortetracycline) (รูปที่ 2.15) oxytetracycline (รูปที่ 2.16) เป็นต้น โมเลกุลพื้นฐานมีวงอะโรมาติกต่อกัน 4 วง ออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic กับจุลินทรีย์ได้กว้าง เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ bactericide กลไกการทำงานของสารกลุ่มนี้จะยับยั้งโปรตีนโดยการไปจับกับไรโบโซม และ mRNA

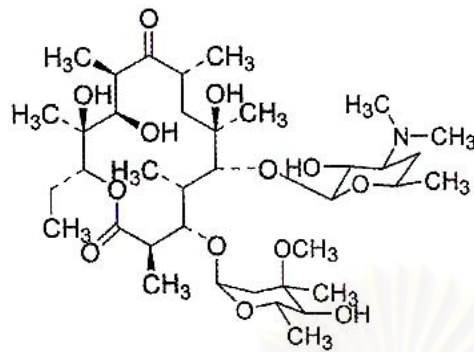


รูปที่ 2.15 Tetracyclin (R = H), chlortetracycline (R = Cl)

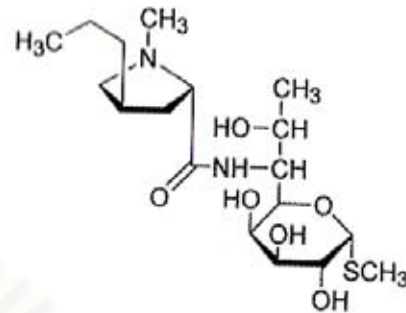


รูปที่ 2.16 Oxytetracyclin

4. กลุ่ม Macrolide ได้แก่ erythromycin (รูปที่ 2.17) และ lincomycin (รูปที่ 2.18) เป็นต้น



รูปที่ 2.17 Erythromycin



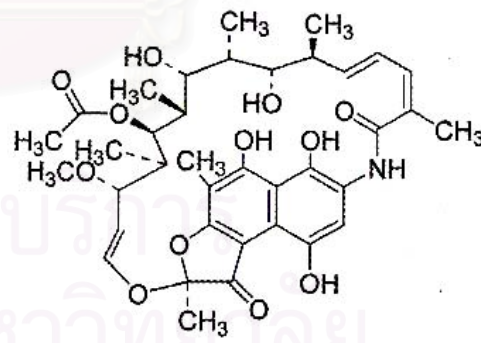
รูปที่ 2.18 Lincomycin

โมเลกุลมีขนาดใหญ่ประกอบด้วยคาร์บอนมากกว่า 20 อะตอม มี macrocyclic lactone ring เป็นองค์ประกอบหลัก ออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic โดยจับกับ 70S subunit ของไรโบโซม เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

5. กลุ่ม Rifamycin ได้แก่ Rifamycin B และ Rifamycin SV เป็นต้น สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ พบครั้งแรกจาก *Streptomyces* ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และ *Mycobacterium tuberculosis* Rifamycin B เป็นยาปฏิชีวนะตัวแรกในกลุ่มนี้ที่ใช้กับสัตว์ซึ่งมีฤทธิ์ไม่สูงมากนัก จึงมีการพัฒนา Rifamycin SV ที่ออกฤทธิ์เป็นวงกว้างออกมา สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ รวมถึง *Mycobacterium tuberculosis* และ *M. leprae* โครงสร้างโมเลกุลของ Rifamycin B และ Rifamycin SV แสดงดังรูปที่ 2.19 และ 2.20 ตามลำดับ

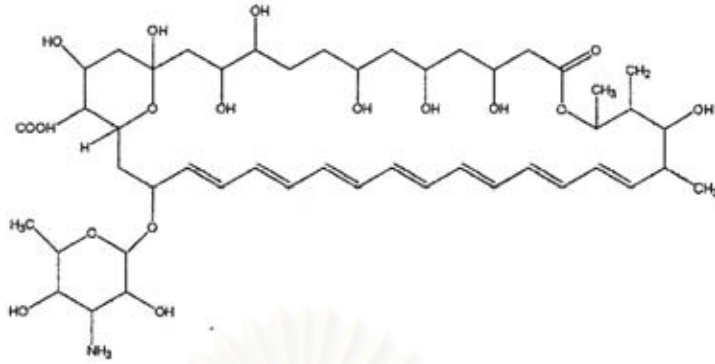


รูปที่ 2.19 Rifamycin B



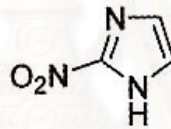
รูปที่ 2.20 Rifamycin SV

6. กลุ่ม Polyene ได้แก่ nystatin และ amphotericin B เป็นต้น โครงสร้างโมเลกุลมีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยส่วน hydrophobic และ hydrophilic ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา และยีสต์ (antifungal) โดยกลไกการทำงานมีผลต่อ selective permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างโมเลกุลของ Nystatin แสดงดังรูปที่ 2.21



รูปที่ 2.21 Nystatin

7. กลุ่ม Azomycin พบครั้งแรกจาก *Streptomyces* ในปี 1953 และได้รับการพัฒนาจนสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ในปี 1965 มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ trichomonocidal ดังแสดง โครงสร้างโมเลกุลดังรูปที่ 2.22 มีความเป็นพิษสูงมาก จึงมีการพัฒนาสารอะนาล็อก (analogue) ได้เป็น metronidazole ใช้เป็นสารฆ่าโปรโตซัว และแบคทีเรีย

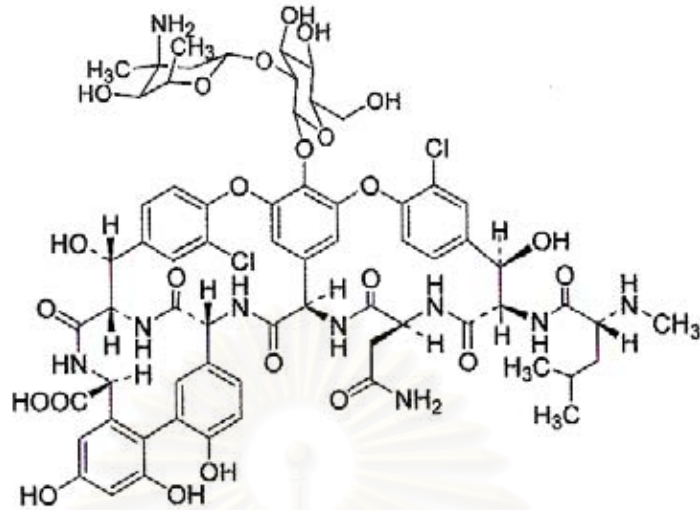


รูปที่ 2.22 Azomycin

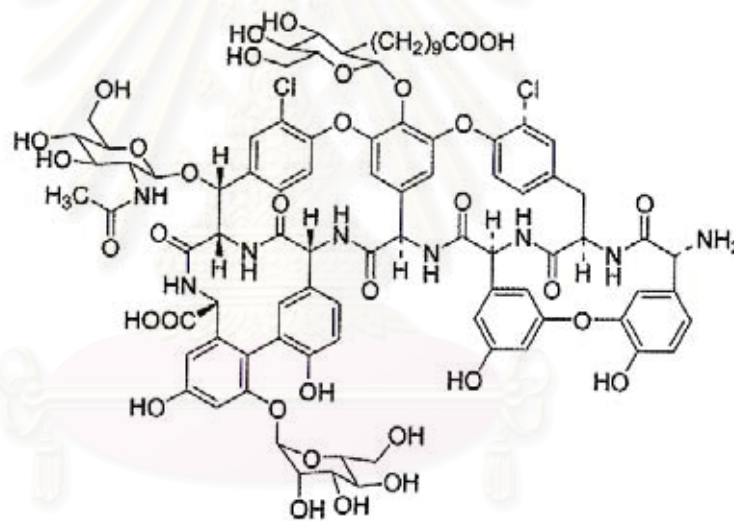
#### 8. กลุ่ม Vancomycin และ Teicoplanin

Vancomycin (รูปที่ 2.23) พบครั้งแรกจาก *Streptomyces orientalis* ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งที่เป็นแอโรบิก และแอนแอโรบิก รวมถึงเชื้อ *Staphylococcus* ที่ดื้อยาด้วย โดยมีกลไกรบกวนการสร้างผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ vancomycin ที่บริสุทธิ์ใช้เป็นยารักษาโรคทางช่องปาก และทางเดินอาหาร สำหรับ vancimycin ที่ไม่บริสุทธิ์จะทำให้เกิดผลข้างเคียง (side effect) มาก

Teicoplanin (รูปที่ 2.24) เป็นสารโมเลกุลเชิงซ้อน แยกได้จาก *Actinoplanes teichomycetius* ออกฤทธิ์เหมือนกับ vancomycin แต่มีอายุการคงอยู่ในร่างกาย (half-life) ได้นานกว่า และมีการระคายเคืองน้อยกว่า vancomycin สามารถฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อ หรือเส้นเลือดได้โดยตรง

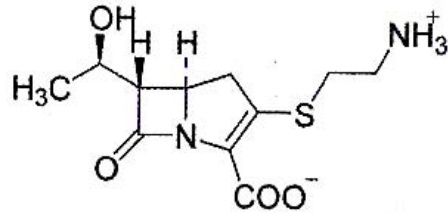


รูปที่ 2.23 Vancomycin



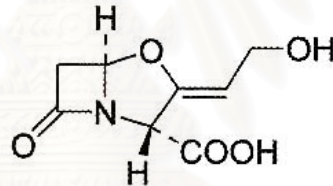
รูปที่ 2.24 Teicoplanin A2 -3

9. กลุ่ม Thienamycin เป็นสารกลุ่ม Carbapenem ซึ่งแยกได้จาก *Streptomyces* กว่า 40 ชนิด ในปี 1990 มีความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้สูง สารที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดในกลุ่มนี้คือ Thienamycin (รูปที่ 2.25) ค้นพบได้ครั้งแรกจาก *Streptomyces cattleya* ในปี 1976 มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคน มีคุณสมบัติทนต่อเอนไซม์  $\beta$ -lactamase สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้



รูปที่ 2.25 Thienamycin

10. กลุ่ม Clavulanic acid เนื่องจากเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ได้ จะสามารถต่อต้านยาปฏิชีวนะ penicillin และ cephalosporin ได้ จึงมีการค้นหายาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ได้ โดย Clavulanic acid (รูปที่ 2.26) แม้จะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ต่ำ แต่สามารถยับยั้งเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ได้ จึงได้มีการใช้ Clavulanic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะตัวอื่น เช่น amoxicillin ซึ่งการใช้ตัวยาร่วมกัน (combination) ของ Clavulanic acid กับยาชนิดอื่นนั้น ได้รับการพัฒนาเป็นยาที่ขายในท้องตลาด และทางการแพทย์ได้แล้ว โดยใช้รักษาโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจ และทางเดินปัสสาวะ



รูปที่ 2.26 Clavulanic acid

สารปฏิชีวนะที่ได้จากแอคติโนมัยซิสส่วนใหญ่ผลิตจากสกุล *Streptomyces* และได้มีการศึกษา และพัฒนาโมเลกุลของสารไปในระดับหนึ่ง สำหรับแอคติโนมัยซิสกลุ่มอื่นๆ ที่ไม่ได้อยู่ในสกุล *Streptomyces* (non-streptomycete actinomycete) ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ ในปัจจุบันได้รับความสนใจมากขึ้นในการค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ El-tarabily และ Sivasithampam (2006) ได้รวบรวมเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแอคติโนมัยซิสที่ไม่ใช่สกุล *Streptomyces* ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซิสที่ไม่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (El-tarabily และ Sivasithamparam, 2006)

แอกติโนมัยซิส	สารปฏิชีวนะ	อ้างอิง
<i>Actinoplanes</i> sp.	Xanthone	Cooper และคณะ (1992)
<i>Actinoplanes</i> sp.	Sch 54445	Min และคณะ (1997)
<i>A. brasiliensis</i>	A/672	Palleroni (1989)
<i>A. caeruleus</i>	Heptaene	Palleroni (1989)
<i>A. deccanensis</i>	Lipiamycin	Palleroni (1989)
<i>A. ferrugineus</i>	L-azetidine-2-carboxylic acid	Palleroni (1989)
<i>A. ianthinogenes</i>	Naphthoquinone	Palleroni (1989)
<i>A. missouriensis</i>	5-azacytidine	Palleroni (1989)
<i>A. philippinensis</i>	Macrocyclic lactone	Palleroni (1989)
<i>A. teichomyceticus</i>	Lipoglycopeptide Complex	Carelli และคณะ (1995)
<i>A. utahensis</i>	Echinocandin	Boeck และคณะ (1989)
<i>Actinomadura madurae</i>	Simaomicin	Maiese และคณะ (1990)
<i>Actinomadura hibisca</i>	Pradimicin FA-1	Sawada และคณะ (1990)
<i>Microbispora</i> sp.	SCH 31828	Petel และคณะ (1988)
<i>Microbispora</i> sp.	Glucosylquestiomycin	Igarashi และคณะ (1998)
<i>Micromonospora</i> sp.	Spartanamicins	Nair และคณะ (1992)
<i>Micromonospora</i> sp.	Rustmicin	Sigmund และ Hirsch (1998)
<i>Micromonospora</i> sp.	Micromonosporin	Thawai และคณะ (2004)
<i>M. cabonacea</i>	Everninomycin	Kawamoto (1989)
<i>M. coerulea</i>	Glutarimide	BeomSeok และคณะ (1999)
<i>M. echinospora</i>	Gentamicin	Kawamoto (1989)
<i>M. echinospora</i>	Hazimicins	Marquez และคณะ (1983)
<i>M. halophytica</i>	Halomicin	Kawamoto (1989)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) สารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยซิสที่ไม่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* (El-tarabily และ Sivasithamparam, 2006)

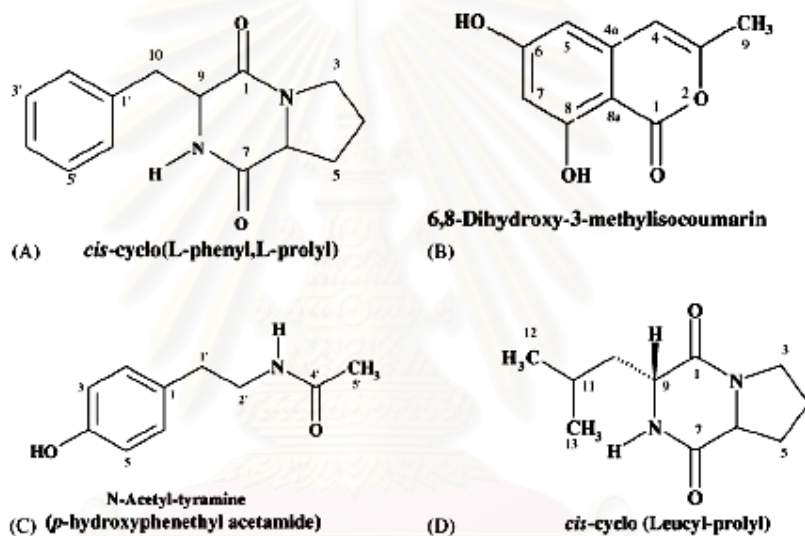
แอกติโนมัยซิส	สารปฏิชีวนะ	อ้างอิง
<i>M. inositol</i>	XK-41	Kawamoto (1989)
<i>M. olivasterospora</i>	Fortimicin	Kawamoto (1989)
<i>Microteraspota</i> sp.	SCH 42282	Hegde และคณะ (1998)
<i>Saccharathrix</i> sp.	Formamicin	Igarashi และคณะ (1997)
<i>Spirillospora</i> sp.	HM17	Haoene และคณะ (1994)
<i>Spirillospora</i> sp.	H107	Haoene และคณะ (1994)
<i>Streptosporangium</i> <i>albidum</i>	Aculeximycin	Ikemoto และคณะ (1983)
<i>Streptosporangium</i> <i>roseum</i>	AH7	Haoene และคณะ (1998)
<i>S. album</i>	Quinaklopeptin	Toda และคณะ (1990)
<i>S. cinnamoneum</i>	HA-94	Paradkar และคณะ (1998)

## 2.9) การพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแอกติโนมัยซิส

แม้ว่าจะมีการค้นพบสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเพื่อใช้ทำเป็นยา รักษาโรคมาเป็นเวลานานแล้ว และได้รับการพัฒนาเรื่อยมา ไม่ว่าจะเป็นการหาตัวทำลายที่เหมาะสมในการสกัด ดัดแปลงโมเลกุลสาร หรือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุง สายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะ แต่การค้นหายาปฏิชีวนะจากธรรมชาติก็ยังคงมีความสำคัญ และมีงานวิจัยเกี่ยวกับการหาแหล่งของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่มาโดยตลอด เนื่องจากปัจจัยต่างๆ หลายประการ เช่นการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ การแพร่กระจายของเชื้อ จากแหล่งหนึ่งสู่อีกแหล่งที่ไม่เคยมีเชื้อโรคนั้นระบาดมาก่อน หรือแม้แต่การหาแหล่งใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะในปริมาณ (Yield) ที่สูงขึ้น (Pettit และคณะ, 1999) ซึ่ง แหล่งของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สำคัญที่สุดก็คือจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแอกติโนมัยซิส ดังรายงานต่อไปนี้



Ben Ameer Mehdi และคณะ (2006) ได้รายงานการแยก และตรวจสอบโครงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ TN97 ซึ่งแยกได้จากดินในโอเอซิสประเทศตูนิเซีย พบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้มีระดับความเหมือนของยีนประมวลรหัส 16S rRNA คล้ายกับ *Streptomyces lipmanii* 96% และสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ สารอนุพันธ์ของ diketopiperazine ได้แก่ *cis-cyclo* (L- phenyl, L-prolyl) (รูปที่ 2.27A) และ *cis-cyclo* (Leucyl - Prolyl) (รูปที่ 2.27D) สารอนุพันธ์ของ isocoumarin (6,8- dihydroxy-3-methylisocoumarin) (รูปที่ 2.27B) และ *N*-acetyl-tyramine (รูปที่ 2.27C) ซึ่งสารต่างๆเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M.luteus* สายพันธุ์ LB 14110 *E.coli* สายพันธุ์ ATCC 8793 และ *V. dahliae*



รูปที่ 2.27 สารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *Streptomyces lipmanii* สายพันธุ์ TN97

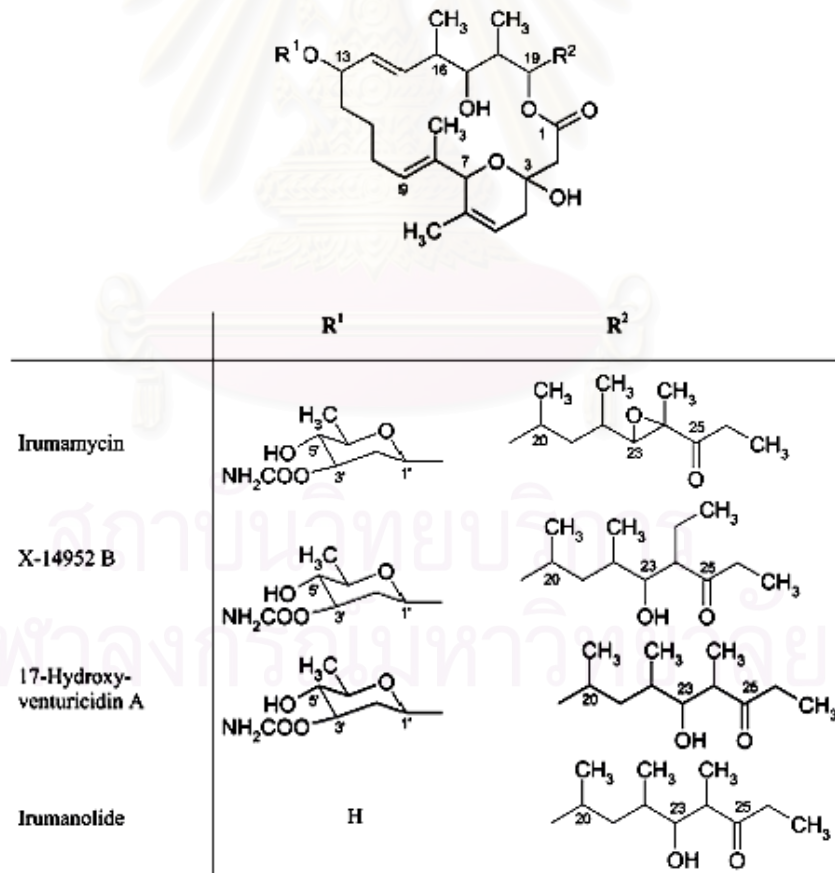
Sujatha และคณะ (2004) แยกและศึกษา streptomycete จากโคลนใต้ทะเลในอ่าวเบงกอล ประเทศอินเดีย พบสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyketide ที่ผลิตโดย *Streptomyces psammoticus* สายพันธุ์ BT-408 ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา และสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา methicillin ได้

Boudjella และคณะ (2006) แยก *Streptosporangium* sp. สายพันธุ์ Sg10 จากดินในประเทศแอลจีเรีย เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีความคล้ายกับ *Streptomyces carneum* 96.3 – 97.8% สามารถสร้างสารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีแต่มีฤทธิ์น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา สารปฏิชีวนะที่ค้นพบนี้มี 2 ตัวคือ sibiromycin และ sinefungins ที่เป็นสารกลุ่ม glycosylated aromatics ซึ่งต่างจากที่ Michel และ Yao ที่เคย

รายงานไว้ในปี 1994 ว่า *Streptomyces carneum* สร้างสารกลุ่ม lipoglycopeptide (Michel และ Yao, 1994)

Zheng และคณะ (2000) ค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งทั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ และเซลล์มะเร็งจากแอคติโนมัยซิส ที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลโดยใช้ตัวอย่างจาก เนื้อเยื่อพืชในทะเล ดอกไม้ทะเล รวมถึงลำไส้ของปลาฉลาม พบว่า *Micromonospora* เป็นสกุลที่มีเปปอร์เซ็นต์การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด คือมี 5 สายพันธุ์ จากที่แยกได้ทั้งหมด 68 สายพันธุ์ หรือคิดเป็น 7.35% ในขณะที่สกุล *Streptomyces* มี 2.44% และสกุลอื่นๆไม่มีการสร้างเลย อย่างไรก็ตาม *Streptomyces* เป็นกลุ่มที่มีเปปอร์เซ็นต์การสร้างสารปฏิชีวนะมากที่สุด

Fourati-Ben Fguira และคณะ (2005) แยกแอคติโนมัยซิสสายพันธุ์ใหม่ US80 ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา และยีสต์ได้ เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อที่แยกได้โดยวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบสยีนประมวลรหัส 16S rRNA พบว่า มีความเหมือนกับ *Streptomyces roseoflavus* 98% สายพันธุ์ที่แยกได้นี้ สร้างสารปฏิชีวนะ flavomycin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม aminoglycoside โครงสร้างโมเลกุลของสารปฏิชีวนะที่แยกได้แสดงดังรูปที่ 2.28



รูปที่ 2.28 สารปฏิชีวนะกลุ่ม flavomycin ที่สร้างจาก

*Streptomyces roseoflavus* สายพันธุ์ US80

## 2.10) สารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการตรวจสอบหาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งมากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย รวมถึงในประเทศไทย จากข้อมูลทะเบียนมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่ามีผู้ชายเป็นมะเร็งมากถึง 35,539 คน และผู้หญิง 38,467 คน โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งตับในผู้ชาย และมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิง มีสถิติจำนวนผู้เป็นมะเร็งมากเป็นอันดับหนึ่งในปี 1996 ดังนั้นจึงมีการค้นหาวิธีการรักษามะเร็งหลากหลายวิธี ซึ่งสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งก็เป็นอีกหนึ่งหนทางในการเยียวยารักษาผู้ป่วยมะเร็ง อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีข้อดีคือ สามารถยับยั้งมะเร็งได้แบบจำเพาะเจาะจง โดยทำลาย หรือส่งผลข้างเคียงต่อเนื้อเยื่ออื่นน้อย สารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งสามารถพบได้จากธรรมชาติทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ Pettit (1999) พบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง montanastatin และ vatinomycin ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากเปลือกไม้ และมูลสัตว์ เป็นสารต่อต้านการเกิดเนื้องอกได้ (Antineoplastic) Tanawan และคณะ (2005) ได้ทำการสกัดสมุนไพรไทย 3 ชนิด ได้แก่ ขอบชะนาง พระขรรค์ไชยศรี และชันทองพยาบาล ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Antiproliferative activity) ด้วยวิธี MTT พบว่าการสกัดด้วยเมทานอล ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแหล่งต่างๆจากธรรมชาติได้อย่างหลากหลาย ซึ่งแต่ละชนิดก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่างชนิดกัน Georgopapadaku (1995) ได้จัดจำแนกสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ตามโครงสร้างโมเลกุลของสาร ได้ดังนี้

1. Alkylating Agent สารกลุ่มนี้ไปปล่อยประจุบวกเข้าจับกับดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็งทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูป (conformation) ของโมเลกุลดีเอ็นเอ ได้แก่ melphalan ใช้รักษา myeloma และ solid tumour cyclophosphamide ใช้รักษามะเร็งเต้านม และมะเร็งชนิดอื่น
2. Platinum Complexes สารกลุ่มนี้จะจับกับเบสในสายดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ด้วยพันธะโคเวเลนต์ ทำให้โครงรูปเปลี่ยนไป ได้แก่ cisplatin และ carboplatin ใช้รักษามะเร็งในอวัยวะ กระเพาะปัสสาวะ และปอด เป็นต้น
3. Antimetabolites สารกลุ่มนี้ เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้าย (structural analog) กับสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ เช่น methotrexate จับกับเอนไซม์ dihydrofolate reductase ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ เบส purine และมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

4. Vinca Alkaloids and Taxol สารกลุ่มนี้ยับยั้งการรวมตัวกันของไมโครทิวบูล ในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในยูคาริโอต

5. Dactinomycin และ Anthracyclin สารสองกลุ่มนี้สร้างจาก *Streptomyces* มีกลไกโดยแทรกเข้าไปตรงตำแหน่งเฉพาะในเกลียวของดีเอ็นเอสายคู่ เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ สารกลุ่ม anthracyclin มีกลไกโดยแทรกเข้าไปตรงระหว่างคู่เบสในสายดีเอ็นเอ และจับกับเอนไซม์ topoisomerase II เป็นผลให้สายดีเอ็นเอแตกหักออก ส่งผลให้เซลล์ตาย

6. Epipodophyllotoxins และ Amsacrine สารกลุ่มนี้มีกลไกในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase II ในปฏิกิริยา DNA-resealing และแทรกเข้าไปในสาย ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ

สารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่พบจากธรรมชาติมีมากมายหลากหลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะด้วย (Gorajana, 2006) สารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ได้รับการพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคมะเร็งมีกลไกในการทำงานได้อย่างหลากหลาย ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 กลไกการทำงานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทะเลที่ได้รับการพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง (Burkhard, 2003)

ชื่อสาร	แหล่ง	กลุ่มของสาร	บริษัทที่ผลิต
<b>กลุ่มที่มีผลต่อเอนไซม์</b>			
ยับยั้งเอนไซม์ Methionine aminopeptidase			
LAF389	ฟองน้ำ	อนุพันธ์ของกรดอะมิโน	Novatis
ยับยั้งโปรตีน kinase			
Bryostatin-1	ไบรโอซัว	โพลีคีไทด์	GPC Biotech
<b>กลุ่มที่ยับยั้งไมโครทิวบูล</b>			
Dolastatin-10	ทากทะเล	เปปไทด์	NCI/ Knoll
ILX651	ทากทะเล	เปปไทด์	Ilex Oncology
Cemadotin	ทากทะเล	เปปไทด์	Knoll
Discodermolide	ฟองน้ำ	โพลีคีไทด์	Novatis
HTI26	ฟองน้ำ	ไตรเปปไทด์	Wyeth

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) กลไกการทำงานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทะเลที่ได้รับการพัฒนาเป็นยา  
รักษาโรคมะเร็ง (Burkhard, 2003)

ชื่อสาร	แหล่ง	กลุ่มของสาร	บริษัทที่ผลิต
<b>กลุ่มที่จับกับดีเอ็นเอ</b>			
Yondelis™	ทะเล	ไอโซควิโนโลน	PharmaMar/ Johnson&Johnson
<b>กลุ่มที่กระตุ้นปฏิกิริยา Oxidative</b>			
Aplidin™	ทะเล	cyclic depsipeptide	PharmaMar
<b>กลุ่มที่มีผลต่อไลโซโซม</b>			
Kahalamide F	ทากทะเล/ สาหร่าย	cyclic depsipeptide	PharmaMar
<b>กลุ่มที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน</b>			
KRN7000	ฟองน้ำ	$\alpha$ -galactosylceramide	Kirin
<b>กลุ่มที่ยับยั้งการจับของแคลเซียม</b>			
Squalamine lactate	ปลาฉลาม	อะมิโนสเตียรอยด์	Genaera

### 2.11) การพบสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งใหม่จากแอคติโนมัยซิส

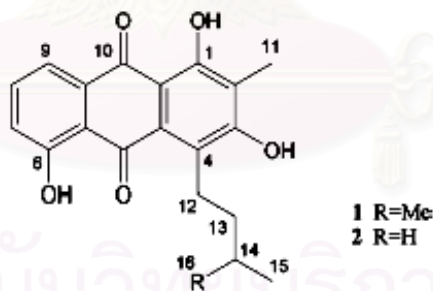
แม้ว่าการรักษาโรคมะเร็งจะมีวิธีการที่หลากหลาย เช่น การผ่าตัด การใช้เคมีบำบัด การฉายรังสี หรือการใช้ stem cell เป็นต้น แต่การใช้ยาที่มีคุณสมบัติจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเซลล์มะเร็งก็ยังคงมีความจำเป็นในการรักษาผู้ป่วยมะเร็ง เนื่องจากสามารถใช้รักษาอาการป่วยได้ตรงเป้าหมาย โดยไม่ไปทำลาย หรือส่งผลกระทบต่อเซลล์อื่นน้อยที่สุด ดังนั้นการพัฒนาตัวยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยมะเร็งจึงมีความสำคัญ และการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆจากธรรมชาติได้มีบทบาทอย่างยิ่งต่อการพัฒนาเป็นตัวยารักษามะเร็ง แอคติโนมัยซิสเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจในการค้นหาสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ดังรายงานต่อไปนี้

Gorajana และคณะ (2006) ได้มีการค้นพบสาร resistoflavine จาก *Streptomyces chibaensis* AUBN<sub>7</sub> ที่แยกได้จากโคลนได้ทะเลในบริเวณอ่างเบงกอลประเทศอินเดีย มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งตับ อีกทั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เล็กน้อย ทั้งแกรมบวก และลบ โครงสร้างโมเลกุลของ resistoflavine แสดงดังรูปที่ 2.29



Zheng และคณะ (2000) แยกแอกติโนไมยซิสจากสิ่งมีชีวิตในทะเลทั้งพืช และสัตว์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยใช้เนื้อเยื่อที่ความเข้มข้น 1: 320 เท่า ทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P388) และเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ KB, เซลล์ HLF และเซลล์ CNE ด้วยวิธี MTT พบว่ามีเชื้อ 74 และ 67 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งอัตราการเจริญของเซลล์ P388 และ KB ได้ จากเชื้อทั้งหมด 360 สายพันธุ์ คิดเป็น 20.6% และ 18.6% ตามลำดับ

Igarashi (2007) พบสารกลุ่ม anthraquinone ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ lupinacidin A และ lupinacidin B จาก *Micromonospora lupine* สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเป็น endophytic actinomycete สารทั้ง 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนู (26-L5 carcinoma cell) โดยไม่ได้มีการยับยั้งอัตราการเจริญของเซลล์ โครงสร้างโมเลกุลของ lupinacidin A และ lupinacidin B แสดงดังรูปที่ 2.30



รูปที่ 2.30 โครงสร้างโมเลกุลของ lupinacidin A (1) และ B (2)

## 2.12) แอกติโนมัยซิสจากทะเลที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทะเลเป็นแหล่งที่สำคัญในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ เนื่องจากในทะเลมีพื้นที่มากถึง 70 % ของพื้นที่ทั้งหมดของโลก นอกจากนี้ ทะเลยังเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง Burkhard (2003) คาดคะเนถึงความหลากหลายทางชีวภาพในทะเลบางบริเวณ เช่น ในพื้นดินใต้ทะเล และในบริเวณเขตปะการัง ว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพสูงกว่าในป่าฝนเขตร้อน อีกทั้งในปัจจุบันอัตราการค้นพบสารใหม่จากบ้นกน้อยลง เนื่องจากมีการแยกสารซ้ำมากขึ้น ในขณะที่ได้มีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากทะเลในอัตราที่สูงขึ้น การค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทะเลจึงมีโอกาสที่จะพบเชื้อ หรือสารที่น่าสนใจชนิดใหม่สูง

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอกติโนมัยซิสในทะเลมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ สมบัติการเป็นสารปฏิชีวนะ สารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง สารกดภูมิคุ้มกัน และเอนไซม์ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากทะเล แสดงดังรูปที่ 2.31 (Lam, 2006)

ตารางที่ 2.3 สารชนิดใหม่ที่ผลิตจากแอกติโนมัยซิสในทะเลระหว่างปี 2003 ถึง 2005

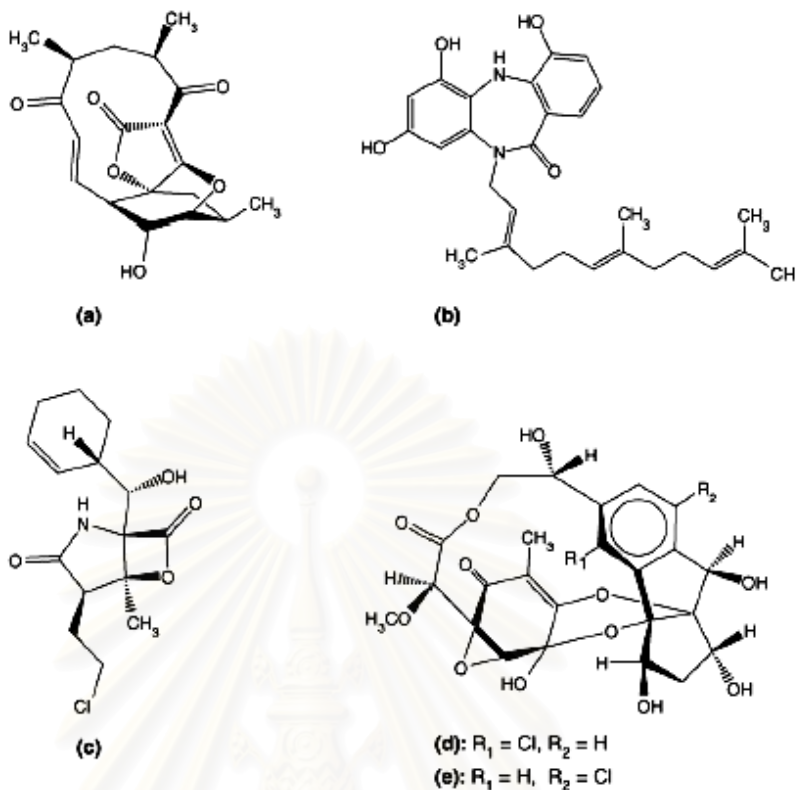
สาร	แหล่ง	สมบัติ
Abyssomicins	<i>Verrucosispora</i> sp.	antibacterial
Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	anticancer
Bonactin	<i>Streptomyces</i> sp.	antibacterial, antifungal
Caprolactones	<i>Streptomyces</i> sp.	anticancer
Chandrananimycins	<i>Actinomadura</i> sp.	antialagl, antibacterial, antifungal, anticancer
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	anticancer
Chloro-dihydroquinones	Novel actinomycete	antibacterial, anticancer
Diazepinomicin (ECO-4601)	<i>Micromonospora</i> sp.	antibacterial, anticancer anti-inflammatory
3,6-disubstituted indoles	<i>Streptomyces</i> sp.	anticancer
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	antibacterial

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) สารชนิดใหม่ที่ผลิตจากแอคติโนมัยซิสในทะเลระหว่างปี 2003 ถึง 2005

สาร	แหล่ง	สมบัติ
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	antibacterial
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	antibacterial
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	antibacterial
Himalomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	antibacterial
IB-00208	<i>Actinomadura</i> sp.	anticancer
Komodoquinone A	<i>Streptomyces</i> sp.	neuritogenic activity
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	antibacterial
Marinomycins	<i>Marinispora</i>	antibacterial, anticancer
Mechercharmucins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	anticancer
MKN-349A	<i>Nocardiopsis</i> sp.	unknown biological activity
Salinosporamide A (NPI-0052)	<i>Salinispora tropica</i>	anticancer
Sporolides	<i>Salinispora tropica</i>	unknown biological activity
Trioxacarcins	<i>Streptomyces</i> sp.	antibacterial, anticancer antimalarail

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 2.31 โครงสร้างสารที่พบจากแอกติโนมัยซิสในทะเล

(a) Abyssomicin C, (b) Diazepinomicin (ECO-4601),

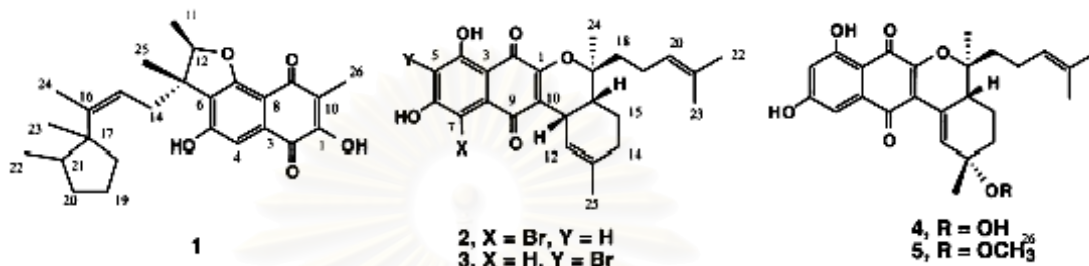
(c) Salinosporamide A (NPI-0052), (d) Sporalide A, (e) Sporalide B

แอกติโนมัยซิสจากทะเลจึงเป็นแหล่งใหม่ที่น่าสนใจ ซึ่งแอกติโนมัยซิสจากทะเลสามารถแยกได้จากดิน ททราย โคลน น้ำทะเล พืช และสัตว์จากทะเล ดังรายงานต่อไปนี้

Selvin และคณะ (2004) แยกแอกติโนมัยซิสจากฟองน้ำในทะเล *Dendrilla nigra* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sponge agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ สามารถแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ BTL7 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 88  $\mu\text{g}$  protein/ ml และสามารถยับยั้ง *Micrococcus luteus* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 44  $\mu\text{g}$  protein/ ml พบว่าอัตราการเจริญ และอัตราการสร้างสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมสารสกัดจากฟองน้ำเป็นอาหารเสริม

Hardt และคณะ (2000) พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งสารปฏิชีวนะ และสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด จากโคลนได้บึง Batiquitos บริเวณตอนเหนือของเมืองซานดิเอโก ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อสกัดสารออกจากรน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลอะซิเตต และแยกสารด้วยซิลิกา คอลัมน์ และ HPLC จากนั้นตรวจสอบสารด้วยเทคนิค NMR MS UV และ IR แล้ว พบว่า สาร 5 ชนิด ได้แก่ neomarinone marinone isomarinone hydroxydebromomarinone และ

methoxydebromomarinone มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลแสดงดังรูปที่ 2.32 สารดังกล่าวจัดเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม naphthoquinone เมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งแล้ว พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของมะเร็งได้ 60 ชนิด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เฉลี่ย  $10 \mu M$



รูปที่ 2.32 โครงสร้างโมเลกุลของ neomarinone และอนุพันธ์ของสารกลุ่ม marinone neomarinone (1) marinone (2) isomarinone (3) hydroxydebromomarinone (4) และ methoxydebromomarinone (5)

จากรายงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น เห็นได้ว่าการแยกแอกติโนมัซิดจากทะเลจะสามารถมีโอกาสในการค้นพบแอกติโนมัซิดชนิดใหม่ หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ได้สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งทะเลในประเทศไทย ซึ่งเป็นเขตร้อนชื้น เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง อีกทั้งงานวิจัยการแยกแอกติโนมัซิดจากบริเวณชายหาด และป่าชายเลนในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยในปัจจุบัน ดังนั้นการแยกแอกติโนมัซิดจากทะเลในประเทศไทยจึงมีความน่าสนใจในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ และมีประโยชน์ต่อการพัฒนาเป็นยารักษาโรค ทั้งโรคจากเชื้อจุลินทรีย์ และโรคมะเร็งในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1) อุปกรณ์

1. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) Memmert รุ่น BE600 บริษัท Jebsen and Jessen
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> incubator) Hepa Class100 รุ่น 311 บริษัท Thermo electron corporation
3. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น H1 บริษัท Lab Service Ltd, Part.
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
5. ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) Memmert รุ่น UE600 บริษัท Jebsen and Jessen
6. ตู้อบแห้งภายใต้สุญญากาศ (vacuum oven) Hotpack บริษัท Hotpact Corporation, USA.
7. เครื่องชั่งน้ำหนัก (digital scale) รุ่น PB3002 บริษัท Mettler Toledo
8. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) Olympus รุ่น BX51 บริษัท Olympus Optical Co., Ltd. Japan
9. กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) Olympus รุ่น CK2 บริษัท Olympus Optical Co., Ltd. Japan
10. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) JEOL รุ่น JSM-5410 LV, Japan
11. เครื่องเขย่า (shaker) New Brunswick Scientific บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, USA
12. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-1000 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
13. เครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) รุ่น FD-1 ยี่ห้อ EYELA บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
14. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Hettich รุ่น Rotofix32 บริษัท Becthai, Germany
15. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น S20-K ยี่ห้อ Mettler Toledo
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima, Japan

17. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด 0.0025 mm<sup>2</sup> ยี่ห้อ Loptik Labor
18. เครื่องอ่านค่าความดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น ELX800 บริษัท Bio-Tek Instruments, Inc.
19. เครื่องพีซีอาร์ (Authorized thermal cycler) Takara รุ่น TP600 บริษัท Takara Bio, Inc. Japan
20. เครื่อง Electrophoresis chamber set รุ่น Mupid-ex บริษัท Advance
21. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc) ยี่ห้อ Vilber Lourmat
22. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-610T บริษัท Hslangtai
23. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
24. เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
25. เครื่องแปลงไฟ (Power supply) My Power300 รุ่น AE-8130 บริษัท ATTO
26. ตู้เย็น 4 °C (refrigerator) Mitsubishi รุ่น Tiara บริษัท Mitsubishi electric
27. ตู้เย็น -20 °C ยี่ห้อ Sharp
28. ตู้เย็น -80 °C รุ่น 8620 บริษัท Thermo Electron Corporation
29. เครื่อง UV-Transilluminator รุ่น TM-10E บริษัท UVP
30. เครื่อง Vortex mixer รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
31. เครื่อง shaker-3D (Notating mixer) รุ่น Gyromini บริษัท Labnet International, Inc.
32. โกร่งบดยา (motar)
33. ไมโครปิเปต (automatic adjustable micropipette) บริษัท Gilson P2 (0.1-2 ไมโครลิตร), P10 (0.5-10 ไมโครลิตร), P20 (5-20 ไมโครลิตร), P200 (20-200 ไมโครลิตร), P1000 (0.1- 1 มิลลิลิตร)
34. ปิเปตต์ทิวป์ (pipette tip) บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
35. หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ (micro centrifuge tubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
36. หลอดพีซีอาร์ (PCR tubes) ขนาด 200 ไมโครลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
37. พาราฟิล์ม
38. ปีกเกอร์ (beaker)
39. ขวดแก้ว (bottle)
40. กระบอกตวง (cylinder)
41. ขดลวด (spring coil)

42. ลูป (loop)
43. เข็มเย็บเข็ช (needle)
44. ที่เจาะอาหารวุ้น (cork borer)
45. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (petridish)
46. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (96 wells plate)
47. ขวดเลี้ยงเซลล์ ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
48. หลอดเก็บเซลล์
49. หลอดชนิดพิวส์ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
50. บีเปตแก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
51. เครื่องดูดจากบีเปต (pipette aid) ยี่ห้อ Drummond
52. หัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
53. ที่ชูดเซลล์ (cell lifter)
54. เครื่องกวนโดยใช้แม่เหล็ก (magnetic stirrer) ยี่ห้อ Clifton Ceraplate
55. ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) รุ่น 34 HC ยี่ห้อ Taylor-Wharton Cryogenics บริษัท Harsco Corporation, USA
56. TLC aluminium sheet รุ่น Silica gel60 F<sub>254</sub> บริษัท Merck, Germany
57. คอลัมน์แก้วสำหรับแยกสาร
58. ขวดแก้วก้นกลม
59. ขวดแก้วสำหรับเก็บสาร
60. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Varian รุ่น Mercury 400
61. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT- IR) บริษัท Nicolet Impact model 410
62. เครื่อง Fison Instruments Mass Spectrometer model Trio2000 บริษัท Frisons Instruments, England
63. เครื่อง DNA sequencing รุ่น 3100XL ยี่ห้อ ABI บริษัท Applied Biosystem Incorporated

### 3.2) สารเคมี

1. Agar
2. Ammonium sulfate ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )
3. *L*- Arabinose บริษัท Sigma chemical, USA
4. *L*- Arginine บริษัท Sigma chemical, USA
5. *L*- Asparagine บริษัท Sigma chemical, USA
6. Bacto peptone
7. Bacto tryptone
8. Bacto soytone
9. Beef extract
10. Dextran บริษัท Sigma chemical, USA
11. Ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ )
12. *D*- Fructose บริษัท Merck, Germany
13. *D*- Galactose บริษัท Merck, Germany
14. Glucose
15. Glycerol
16. *L*- Histidine บริษัท Sigma chemical, USA
17. *meso*- Inositol บริษัท Sigma chemical, USA
18. *D*- Lactose บริษัท Merck, Germany
19. Malt extract
20. *D*- Mannitol บริษัท Difco Laboratories
21. *D*- Mannose บริษัท Sigma chemical, USA
22. Magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2$ )
23. Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ )
24. *L*- Methionine บริษัท Sigma chemical, USA
25. *L*- Phenylalanine บริษัท Sigma chemical, USA
26. *L*- Proline บริษัท Sigma chemical, USA
27. *L*- Rhamnose บริษัท Sigma chemical, USA
28. *di*-Potassium hydrogen sulfate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
29. Potassium nitrate บริษัท Merck, Germany

30. L- Serine บริษัท Sigma chemical, USA
31. Sodium acetate บริษัท Merck, Germany
32. Sodium caseinate
33. Sodium chloride (NaCl)
34. Sodium citrate บริษัท Merck, Germany
35. Sodium malonate บริษัท Merck, Germany
36. Soluble Starch
37. Starch
38. Sucrose บริษัท Merck, Germany
39. Sulfuric acid
40. L- Theonine บริษัท Sigma chemical, USA
41. L- Valine บริษัท Sigma chemical, USA
42. Xylose บริษัท Sigma chemical, USA
43. Yeast extract
44. DMSO (Dimethylsulfoxide) steried บริษัท Sigma, USA
45. Fetal Bovine Serum (FBS) ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
46. Hoechst 33342
47. MTT (3-(4,5- dimethylthiazolyl-2-) 2,5- diphenylterazolium bromide) บริษัท Sigma, USA.
48. RPMI ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
49. Thyphan blue
50. Trypsin-EDTA steried filtered ยี่ห้อ Hyclone บริษัท PERBIO
51. Vanillin
52. ตัวทำละลาย ได้แก่ hexane, ethyl acetate, chloroform, methanol และ ethanol
53. Silica 60 (No 9385) ขนาดอนุภาค 0.040 – 0.063 mm (230 – 400 ASTM) บริษัท E. Merck, Germany
54. Polyvinylpyrrolidone บริษัท Serva
55. Ascorbic acid บริษัท Serva
56. 2-Mecaptoethanol บริษัท Sigma
57. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) บริษัท Serva
58. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) บริษัท Scharlau

59. Isoamyl alcohol บริษัท Carlo erba
60. RNase
61. Polyethylene glycol (PEG) บริษัท Serva
62. Taq DNA polymerase บริษัท Fermentas
63. Loading dye
64. Primer ได้แก่
  - pA (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3')
  - pH (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3')
  - StrepB (5' ACAAGCCCTGGAAACGGGGT 3')
  - StrepE (5' CACCAGGAATTCCGATCT 3')
  - StrepF (5' ACGTGTGCAGCCCAAGACA 3')
65. Bovine serum albumin (BSA)
66. dNTP
67. Boric acid
68. Tris- (hydroxymethyl)-amino methane (Tris base) บริษัท Scharlau
69. Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express
70. Ethidium bromide
71. 100bp + 1.5 kb DNA ladder บริษัท SibEnzyme

### 3.3) ตัวอย่างดิน และทราย

เก็บตัวอย่างดิน และทรายจากบริเวณชายหาด และป่าชายเลนในประเทศไทย โดยเก็บจากจังหวัดต่างๆ ได้แก่ จันทบุรี ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ และ เพชรบุรี ตัวอย่างละประมาณ 50 ถึง 100 กรัม บันทึกสถานที่เก็บ ลักษณะ และสีของดิน วัดค่า pH (ภาคผนวก ง หมายเลข 1) ใส่ถุงพลาสติกที่ปิดมิดชิด ติดฉลากให้ชัดเจน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.4) การแยกแอกติโนมัยซิสจากดินตัวอย่าง

นำดิน และทรายตัวอย่าง 5 กรัม ละลายใน 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร จะได้สารละลายดินที่มีระดับการเจือจาง  $10^{-1}$  นำไปบ่มโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้น นำสารละลายดินไปเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ด้วยวิธีอันดับการเจือจางลดลง



สิบเท่า (serial ten fold dilution) คูดสารละลายดินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เกลี่ย (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch Casein Agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ cyclohexamide 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ nystatin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ปุ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีของแอกติโนมัยซิสที่มีลักษณะแตกต่างกันมาขีด (streak) ลงบนอาหาร sodium caseinate agar (SCA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) เพื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวเลี้ยง Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.5) การเก็บรักษาแอกติโนมัยซิส

ขีดแอกติโนมัยซิสลงบนอาหารผิวเลี้ยง Nutrient Agar (NA) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 1-3 สัปดาห์ สำหรับการเก็บรักษาเป็นเวลานานทำได้โดยการขีดแอกติโนมัยซิสลงบนอาหารผิวเลี้ยง Oat Meal Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 19) นำไปปุ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ จากนั้นเติมสารละลาย 20 % Glycerol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้ลูป (loop) ขูดสปอร์ให้หลุด เก็บรักษาในหลอดเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.6) การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซิส

#### 3.6.1) จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ ได้แก่

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC1729
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923
<i>Candida albicans</i>	ATCC 70014
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TISTR 5169
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC6275

#### 3.6.2) อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 11)	สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย
Malt extract agar (MEA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 13)	สำหรับเลี้ยงรา และยีสต์

### 3.6.3) ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะโดยวิธี agar cross streak method (Waksman, 1940)

ขีดแอกติโนมัยซิสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบเป็นแนวยาว บริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปมที่อุณหภูมิตั้ง 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 -5 วัน เมื่อแอกติโนมัยซิสเจริญแล้ว ขีดจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบตามขวางตั้งฉากกับแอกติโนมัยซิส ปมที่อุณหภูมิตั้งเป็นเวลา 1 -2 วัน จากนั้นวัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ของจุลินทรีย์ทดสอบ คัดเลือกแอกติโนมัยซิสที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยพิจารณาจากความกว้างของบริเวณยับยั้ง

## 3.7) การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากแอกติโนมัยซิส

### 3.7.1) การสกัดสารจากแอกติโนมัยซิส

เลี้ยงแอกติโนมัยซิสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปมที่อุณหภูมิตั้ง เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นสกัดสารออกจากอาหาร และเส้นใยของแอกติโนมัยซิสด้วยเอทิลอะซิเตต โดยการเขย่าเป็นเวลา 1 วัน นำส่วนเอทิลอะซิเตตมาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ สารสกัดที่ได้ละลายใน 95% เอทานอล เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิตั้ง -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาทดสอบต่อไป

### 3.7.2) เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่

KatoIII (HTB- 103)	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Human gastric carcinoma)
HepG2 (HB- 8065)	เซลล์มะเร็งตับ (Human liver hepatoblastoma)
SW620 (CCL- 227)	เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Human colorectal adenocarcinoma)
BT474 (HTB- 20)	เซลล์มะเร็งเต้านม (Human ductal carcinoma)
Jurkat (TIB- 152)	เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Human acute T-cell leukemia)

ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ห้องวิจัย 403 อาคารแถบ นีละนิธิ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.7.3) การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

นำเซลล์มะเร็งที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว มาล้างในสารละลาย 1X Phosphate Buffer Saline (1x PBS) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) เพื่อกำจัด Dimethylsulfoxide (DMSO) ออก ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงให้เข้ากัน จากนั้นปั่นเซลล์ให้ตกตะกอน ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 (ภาคผนวก ข หมายเลข 2)

ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 – 4 วัน จนกว่าเซลล์จะเจริญเต็มผิวขวดเลี้ยงเซลล์

สำหรับการเปลี่ยนอาหารให้เซลล์ ทำโดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจนหมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วดูดออก จากนั้นเติม 0.025% trypsin-EDTA ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3- 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ จากนั้นดูดเซลล์ ปริมาตร 0.5- 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่

ในกรณีที่ให้นำเซลล์ไปใช้ในการทดสอบในงานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุมให้นำเซลล์ที่อยู่ในสารละลาย 0.025% trypsin- EDTA ใส่ลงใน 1x PBS ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน และปั่นเซลล์ให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใส่ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 กระจายเซลล์ให้เข้ากันทั่ว นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยย้อมเซลล์ด้วยสี thyan blue และนับเซลล์ด้วยด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายเซลล์ใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์  $5 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 วัน เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

สำหรับการเก็บรักษาเซลล์มะเร็ง ทำโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เจริญมากพอ จากนั้นดูดเซลล์ลงในอาหาร RPMI1640 ที่เติม DMSO ที่ปลอดเชื้อ ในอัตราส่วน (9: 1) และรีบนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทันที เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น จึงนำเซลล์ไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวต่อไป

#### 3.7.4) การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT method (Palaga และคณะ, 1996)

ดูดสารสกัดจากแอกติโนมายซิน ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเซลล์มะเร็ง โดยใช้ 95% เอทานอล เป็นชุดควบคุมลบ และหลุมที่ไม่มีเซลล์เป็นชุดควบคุมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย MTT (3-(4,5- dimethylthiazolyl-2-) 2,5- diphenylterazolium bromide) (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2- 4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT และอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม และเติม 0.004N HCl ใน isopropanol (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

### 3.7.5) การทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบอะพอโทซิส (Apoptosis test)

เลี้ยงเซลล์ให้ได้เซลล์  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ศึกษาระลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเล็กที่มีแผ่น cover slip ปราศจากเชื้อวางอยู่ จากนั้นหยดสารที่จะทดสอบลงบน cover slip ใช้ยา SS ซึ่งเป็นยาที่กระตุ้นการอะพอโทซิสเป็นชุดควบคุมบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์จะเจริญโดยเกาะกับแผ่น cover slip จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติมสารละลาย 1% glutaraldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูด glutaraldehyde ทิ้ง และล้างแผ่น cover slip ด้วยสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำเซลล์ที่เกาะอยู่กับแผ่น cover slip ตรวจสอบการตายแบบอะพอโทซิส โดยการหยดสารละลาย 1x PBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ เติมน้ำสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้ปากคีบ คีบแผ่น cover slip ที่มีเซลล์เกาะอยู่วางคว่ำลงบนแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที เคลือบขอบ cover slip ยาทาเล็บ นำไปเซลล์ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ เซลล์ที่ตายแบบอะพอโทซิสจะมีการหดตัวของเซลล์ และนิวเคลียส

### 3.8) การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซิสที่แยกได้ด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์

3.8.1) การสกัดดีเอ็นเอจากแอกติโนมัยซิส แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 การล้างเซลล์ เพื่อกำจัดสารพอลิแซ็กคาไรด์

1. เลี้ยงแอกติโนมัยซิสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ประมาณ 3 – 5 วัน
2. นำเซลล์ประมาณ 20 – 50 มิลลิกรัม ไปบดด้วยโกร่งบดยาเพื่อให้เซลล์เข้ากันเป็นเนื้อเดียว
3. เติมน้ำล้าง buffer (ภาคผนวก ค หมายเลข 3) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างที่บด จากนั้นถ่ายลงในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทิ้ง
5. ทำซ้ำข้อ 3 และ 4 ประมาณ 2 – 3 ครั้ง จนน้ำใส

ส่วนที่ 2 การทำให้เซลล์แตก (Zhou et al., 1999)

1. เติมน้ำ 2X CTAB lysis buffer (ภาคผนวก ค หมายเลข 4) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ให้เข้ากับตะกอนเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติมน้ำ chloroform : isoamylalcohol ความเข้มข้น 24 : 1 (ภาคผนวก ค หมายเลข 5) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการวอเทกซ์

3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. ถ่ายลงในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
5. ทำซ้ำข้อ 2 – 4 อีก 1 รอบ
6. เติม isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในส่วนน้ำใส และเก็บไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
8. ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง และเติม ethanol ความเข้มข้น 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ
9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง
10. ทำให้ตะกอนแห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งแล้ว ละลายตะกอนด้วย TE buffer (ภาคผนวก ค หมายเลข 7) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

### ส่วนที่ 3 การกำจัดอาร์เอ็นเอ

1. เติม RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
2. เติมสารละลาย PEG (ภาคผนวก ค หมายเลข 6) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง
4. ล้างตะกอนโดยใช้ ethanol ความเข้มข้น 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเท ethanol ทิ้ง
6. ทำให้ตะกอนแห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งแล้ว ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
7. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

### 3.8.2) การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัส 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซส

ออกแบบ primer ที่ใช้ โดยอ้างอิงจาก Rintala และคณะ (2001) และ Lanoot และคณะ (2005) ได้แก่

pA	(5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3')
pH	(5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3')
StrepB	(5'- ACAAGCCCTGGAAACGGGGT -3')
StrepE	(5'- CACCAGGAATTCGATCT -3')
StrepF	(5'- ACGTGTGCAGCCCAAGACA -3')

จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอจากขั้นตอนที่ 3.8.1 เป็นแม่แบบ (template) ซึ่งในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. 10x buffer	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
2. 2mM dNTP mix	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
3. 25mM MgCl <sub>2</sub>	ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร
4. forward primer (20 μM)	ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
5. reverse primer (20 μM)	ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
6. Taq DNA polymerase (5U)	ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร
7. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	ปริมาตร 6.3 ไมโครลิตร
8. DNA template	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซสประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Annealing	53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที	
Hold	4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน	

### 3.8.3) การตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบยีนที่ได้จากการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำให้เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เตรียมอะกาโรสเจล (ภาคผนวก ค หมายเลข 11) หลอม และเทลงในแม่พิมพ์ที่มีหวี (comb) เสียบอยู่ แล้วปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (loading dye) ในอัตราส่วน 5 : 2 และหยอดตัวอย่างลงในหลุมอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน เครื่อง Electrophoresis chamber โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide (ภาคผนวก ค หมายเลข 10) ส่องภายใต้รังสี UV ตรวจสอบขนาดของยีนโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

### 3.8.4) วิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA

นำผลิตภัณฑ์ของการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ primer 3 คู่ ได้แก่ StrepB กับ StrepE, pA กับ StrepF และ pA กับ pH ตามขั้นตอนที่ 3.8.2 มาวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA โดยวิธี direct sequencing โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่สำนักงานวิจัยคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

### 3.9) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี

#### 3.9.1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เตรียม slide culture ของแอกติโนมัยซิส (ภาคผนวก ง หมายเลข 2) โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เพื่อให้เชื้อสร้างเส้นใย และสปอร์ จากนั้นย้อมเชื้อด้วย lacto phenol cotton blue นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

#### 3.9.2) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เตรียมตัวอย่างแอกติโนมัยซิส โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sodium Caseinate Agar เพื่อให้สร้างสปอร์ จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาคผนวก ง หมายเลข 3)

#### 3.9.3) การศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP

ศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP (International Streptomyces Project) (ภาคผนวก ก หมายเลข 18 - 23) ได้แก่

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

ขีดแอกติโนมัยซิสที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP1- 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7- 14 วัน บันทึกการเจริญ การสร้างสปอร์ สีของสปอร์ สีของสายใยอาหาร สีของสายใยอากาศ และการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

#### 3.9.4) การตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน

เลี้ยงแอกติโนมัยซิสบนอาหาร peptone yeast extract iron agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) และ tyrosine agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 25) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน เมื่อเข้าสู่วันที่ 4 โดยจะเกิดสีดำ หรือสีน้ำตาลเข้มในอาหารเลี้ยงเชื้อ



### 3.9.5) การตรวจสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

แทง (stab) แอกติโนมัยซีตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผิวเอียง peptone yeast extract iron agar (ISP6) (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) ในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จากการที่อาหารจะมีสีน้ำเงินดำ (bluish-black color) ควรสังเกตสีของอาหารก่อนที่เชื้อจะสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำลงไปในการอาหาร (Tresner และ Danga, 1958)

### 3.9.6) การตรวจสอบการรีดิวส์ไนเตรท

แทง (stab) แอกติโนมัยซีตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrate agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 24) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงไนเตรทเป็นไนไตรทโดยหยดสารละลายเอ (ละลาย sulfanilic acid 0.8 กรัม ใน 5 นอร์มอล กรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร) และสารละลายบี (ละลาย alphanaphthylamine 0.5 กรัม ใน 5 นอร์มอล กรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลองซึ่งจะเกิดสีแดง แต่ถ้าการทดสอบไม่เกิดสีแดงเนื่องจากไนไตรทเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนีย และก๊าซไนโตรเจน ต้องทดสอบขั้นที่สองต่อไป โดยการเติมผงสังกะสีลงไป ถ้าเกิดสีแดง แสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ (Shirling และ Gottlieb, 1966)

### 3.9.7) การตรวจสอบการเจริญที่ pH 4.3

ซัดแอกติโนมัยซีตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Bennett's agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 27) ค่า pH 4.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 – 14 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อ

### 3.9.8) การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ซัดแอกติโนมัยซีตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Bennett's agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 26) บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 และ 14 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 4 สัปดาห์ สังเกตการเจริญของเชื้อ

### 3.9.9) การศึกษาสมบัติการย่อยสลายสาร (degradation activity)

ซัดแอกติโนมัยซีตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Bennett's agar ซึ่งประกอบด้วย 0.5% adenine, 0.5% tyrosine, 0.4% xylan, 0.4% xanthine, 0.1% casein, 0.4% gelatin, และ 0.1% starch ตรวจสอบการย่อยสลายโดยสังเกตจากการเกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) ยกเว้นการย่อย gelatin และแป้ง ตรวจสอบโดยการสังเกตวงใสหลังจากเททับด้วยสารละลาย acidified mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) และไอโอดีน (iodine) ตามลำดับ

### 3.9.10) การตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน

ตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ 0.1% arginine, 0.1% histidine, 0.1% methionine, 0.1% potassium nitrate, 0.1% phenylalanine, 0.1% serine, 0.1% theonine และ 0.1% valine โดยขีดแอกติโนมัยซิสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง basal medium agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 28) ที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนโดยการเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ basal medium agar ที่ประกอบด้วย 0.1% asparagine หรือ 0.1% proline

### 3.9.11) การตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน

ตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ 1% L- arabinose, 1% dextran, 1% D- fructose, 1% D- galactose, 1% meso- inositol, 1% D- lactose, 1% D- manitol, 1% D- mannose, 1% L- rhamnose, 1% sucrose, 1% Theharose, 1% xylose, 1% sodium acetate, 1% sodium citrate และ 1% sodium malonate โดยขีดแอกติโนมัยซิสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon utilization agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 29) ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยการเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ carbon utilization agar ที่ประกอบด้วย 1% glucose บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

### 3.10) การสกัด และทดสอบฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอกติโนมัยซิส

แยกส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ออกจากส่วนเส้นใยแอกติโนมัยซิสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยการกรองภายใต้สุญญากาศ ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 และนำแต่ละส่วนมาสกัด โดยมีขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 3.1



### 3.10.1) การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแล้ว นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary evaporator) ตู้อบแห้งภายใต้สุญญากาศ (vacuum oven) และเครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิ ต่ำ (lyophilizer) เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นนำไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตในปริมาตร 1: 1 โดยการเขย่าทิ้งไว้ 1 คืน แยกส่วนเอทิลอะซิเตตออกโดยการกรอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หรือจนกว่าส่วน เอทิลอะซิเตตจะใส จากนั้นระเหยส่วนเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ จนแห้ง นำส่วนที่เหลือจากการสกัด มาสกัดต่อด้วยเมทานอล แยกส่วนเมทานอลออกโดยการกรอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หรือจนกว่าส่วนเมทานอลจะใส จากนั้นระเหยส่วนเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง สุญญากาศ จนแห้ง บันทึกน้ำหนักของสารสกัดทั้งสองส่วน

### 3.10.2) การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเส้นใย

นำเส้นใยที่ได้จากการกรองไปบดในเอทิลอะซิเตตด้วยโกร่งบดยา เพื่อให้เส้นใยแตก จากนั้นแช่ในเอทิลอะซิเตตเป็นเวลา 1 คืน แยกส่วนเอทิลอะซิเตตออกโดยการกรอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หรือจนกว่าส่วนเอทิลอะซิเตตจะใส จากนั้นระเหยส่วนเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง สุญญากาศ จนแห้ง นำส่วนที่เหลือจากการสกัด มาสกัดต่อด้วยเมทานอล แยกส่วนเมทานอลออก โดยการกรอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หรือจนกว่าส่วนเมทานอลจะใส จากนั้นระเหยส่วนเมทานอลออกด้วย เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ จนแห้ง บันทึกน้ำหนักของสารสกัดทั้งสองส่วน

### 3.10.3) การตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well

(Murray และ Baron, 1999)

#### 3.10.3.1) การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ใช้ลูปเปียโคโลนีเดี่ยว 4 – 6 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Broth (NB) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบโดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard (ภาคผนวก ก หมายเลข 32) จะได้ปริมาณเชื้อประมาณ  $10^8$  CFU ต่อ มิลลิลิตร

#### 3.10.3.2) การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sabouraud agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อแยกให้เป็นโคโลนี เดี่ยว ใช้ลูปเปียโคโลนีเดี่ยว 4 – 6 โคโลนี ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับความขุ่นของ

ยีสต์ทดสอบโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard จะได้เซลล์ประมาณ  $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร

### 3.10.3.3) การเตรียมหัวเชื้อราทดสอบ

นำราทดสอบที่ติดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ใช้ลูปชุบสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย กรองเอาเส้นใยออกด้วยสำลีปลอดเชื้อ ให้เหลือแต่สปอร์ จากนั้นเจือจางสารละลายสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ  $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับด้วย haemocytometer

### 3.10.3.4) การตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well

เตรียมจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีข้อ 3.10.3.1 – 3.10.3.4 จากนั้นทำสำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดหัวเชื้อ ปิดสำลีกับข้างหลอดให้พอหมาดๆ ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller- Hinton agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) สำหรับทดสอบแบคทีเรีย และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sabouraud agar สำหรับทดสอบยีสต์ และรา เกลี่ยเชื้อทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* *Candida albicans* *Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus niger* ให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3 – 5 นาทีเพื่อให้อาหารแห้ง จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อเจาะลงในอาหารให้เป็นหลุม แล้วใช้ เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยน้ำขึ้นวุ้นที่เจาะไว้ ออก

นำสารสกัดที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ปริมาตร 40 ไมโครลิตร มาหยอดลงในหลุมอาหาร ความหนาของอาหารประมาณ 4 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางหลุม 5 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ และรา วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

### 3.10.4) การตรวจสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ตรวจสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยการนำสารสกัดจากอาหารเลี้ยง ใสลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม หลุมละ 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 วัน และตรวจสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยวิธี MTT ตามวิธีข้อ 3.7.3

### 3.11) การหาอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอกติโนมัยซิสสายพันธุ์ J6.2

จากการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น ทั้งการสร้างสารปฏิชีวนะ และการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง พบว่า สายพันธุ์ J6.2 เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจในการศึกษารายละเอียดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อผลิต เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะแบบ broad spectrum คือยับยั้งได้ทั้ง แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา รวมทั้งสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งตับ จึงคัดเลือกแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2 มาใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

#### 3.11.1) การเตรียมหัวเชื้อแอกติโนมัยซิส

เตรียมหัวเชื้อ J6.2 โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง sodium caseinate agar เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ ควบคู่กับล้างปลอดเชื้อใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ และชูดให้สปอร์หลุด จากนั้นกรองเส้นใยออกให้เหลือแต่สปอร์โดยกรองผ่านสำลีปลอดเชื้อ ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้  $1 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางสารละลายสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

#### 3.11.2) การเลี้ยงแอกติโนมัยซิสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ดูดสารละลายสปอร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 6 ชนิด ได้แก่ Nutrient Broth (NB), Malt Extract Broth (MEB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 14), Sodium Caseinate Broth (SCB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 10), Glucose Yeast Malt Extract (GYM) (ภาคผนวก ก หมายเลข 17), Tryptic Soy Broth (TSB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) และ Soluble Starch Broth (SSB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 16) ที่มีขดลวด (spring coil) บ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

#### 3.11.3) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ และเส้นใยของเชื้อมาสกัดตามวิธีข้อ 3.10.1 และ 3.10.2 และระเหยให้แห้ง ละลายสารสกัดด้วย 95 % เอทานอล จากนั้นนำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well ตามวิธีข้อ 3.10.3 และทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT ตามข้อ 3.10.4

### 3.12) การแยก และทำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์

#### 3.12.1) วิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

เป็นวิธีการแยกสารบนแผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F<sub>254</sub> โดยการเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นตัวชะ ได้แก่ เมทานอล เอทิลอะซิเตต คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ในอัตราส่วนต่างๆ หลังจากการดีเวลลอป (develop) แผ่น TLC สารที่มีสภาพขั้วต่างๆกัน จะถูกแยกออกจากกัน การตรวจสอบตำแหน่งของสารต่างๆโดยการส่องภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือจุ่มลงในสารละลาย vanillin (ภาคผนวก ก หมายเลข 33) และให้ความร้อนกับแผ่น TLC สีของสารจะปรากฏขึ้น จากนั้นนำไปวัดค่า R<sub>f</sub>

#### 3.12.2) วิธี Preparative Thin Layer Chromatography (Preparative TLC)

เป็นวิธีแยกสารให้บริสุทธิ์ โดยมีหลักการเช่นเดียวกับ TLC แต่จะทำการแยกสารในปริมาณมากกว่า เพื่อนำสารที่แยกได้มาใช้ต่อไป โดยใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F<sub>254</sub> ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร หลังจากดีเวลลอป (develop) แผ่น TLC ด้วยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว ตรวจสอบตำแหน่งของสารต่างๆโดยการส่องภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร จากนั้นขีดซิลิกาเจลที่ปรากฏแถบของสารออกมาสกัด ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม กรองส่วนซิลิกาเจลออก นำส่วนของสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ ชั่งน้ำหนัก และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยวิธี TLC

#### 3.12.3) วิธี Column Chromatography

เป็นวิธีแยกสารให้บริสุทธิ์ที่อาศัยหลักการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ (adsorbent) และการละลายในตัวทำละลาย โดยใช้ซิลิกาเจล 60 No. 9385 เป็นตัวดูดซับ และใช้ระบบตัวทำละลายในอัตราส่วนต่างๆ เป็นตัวชะ โดยเรียงจากสภาพขั้วน้อยไปมาก ได้แก่ เฮกเซน เฮกเซนผสมกับเอทิลอะซิเตต เอทิลอะซิเตต เอทิลอะซิเตตผสมกับเมทานอล และเมทานอล เป็นตัวชะคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่แยกได้มาตรวจสอบด้วยวิธี TLC เพื่อวิเคราะห์ว่าเป็นสารที่เหมือนกันหรือไม่ ทำการรวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน จากนั้นนำส่วนที่ได้ไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีด้วยวิธี NMR

### 3.13) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

#### 3.13.1) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

บันทึกด้วยเครื่อง Varian รุ่น Mercury 400 สำหรับหา H และ C nuclear magnetic resonance spectra โดยวัดค่า chemical shift เป็น ppm สารตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ ทำการละลายใน  $\text{CDCl}_3$  หรือ  $\text{CD}_3\text{OD}$  หรือ  $\text{D}_2\text{O}$

#### 3.13.2) Infrared Spectroscopy (IR)

บันทึกด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT- IR) ของบริษัท Nicolet Impact model 410 สำหรับวัด Infrared spectra ของสาร เตรียมสารตัวอย่างที่ใช้วัดโดยการผสมกับ โปรแตสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นแผ่น (pellet) เป็นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร

#### 3.13.3) Mass Spectrometry (MS)

บันทึกด้วยเครื่อง Fison Instruments Mass Spectrometer model Trio2000 ของบริษัท Frisons Instruments ประเทศอังกฤษ ใช้ Electron Impact Source (EI) ที่มีความต่างศักย์ 70 อิเล็กตรอนโวลต์ กระแส 300 ไมโครแอมป์ อุณหภูมิ 180 - 300 องศาเซลเซียส สำหรับบันทึก mass spectra

### 3.14) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

#### 3.14.1) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

นำแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ยีสต์ทดสอบ ได้แก่ *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Sabouraud Broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ปรับความขุ่นให้ได้เทียบเท่า 0.5 McFarland ใส่เชื้อทดสอบลงในจานเลี้ยงเชื้อแบบ 96 หลุม (96 wells plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร

นำส่วนของสารที่แยกได้ที่ละลายใน 95% เอทานอล ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อแบบ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 5 ไมโครลิตร ใช้ยาปฏิชีวนะ Streptomycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมบวกสำหรับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และ ใช้ Nystatin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมบวกสำหรับการยับยั้งการเจริญของยีสต์ และใช้



เอทานอล 95% ปริมาตร 5 ไมโครลิตรเป็นชุดควบคุมลบ บ่มโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที แบบที่เรียทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยีสต์ทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 3.14.2) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

นำเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) จำนวนเซลล์  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารที่แยกได้ละลายใน 95% เอทานอล ใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม (96 wells plate) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์เป็นชุดควบคุมบวก และใช้เอทานอล 95% เป็นชุดควบคุมลบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT ตามข้อ 3.10.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ลักษณะดิน และทรายตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดิน และบริเวณจากบริเวณชายหาด และป่าชายเลน 4 จังหวัดในประเทศไทย ช่วงเวลา 10.00 – 13.00 น. ได้แก่ อำเภอคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี อำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ แหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี และอำเภอหางาว จังหวัดระนอง จำนวนทั้งสิ้น 34 ตัวอย่าง ทำการบันทึกลักษณะ เนื้อดิน สี และค่า pH ของตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.1 – 4.4

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิสที่แยกได้จากอำเภอคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

ตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง	pH	สายพันธุ์แอกติโนมัยซิสที่แยกได้
J1	ดินขาวถูกไฟไหม้	4.48	J1.1, J1.2, J1.3, J1.4, J1.5
J2	ดินทราย ชั้น สีดำ-น้ำตาล	5.92	J2.1, J2.2
J3	ดินทราย ไม่ชื้นมาก สีน้ำตาล	7.28	J3.1
J4	ดินขาว ใต้ต้นเสม็ด บริเวณใบไม้ทับถม	6.17	J4.1
J5	ทรายบริเวณชายหาด ริมทะเล มีเศษเปลือกหอยปะปน	8.87	J5.1, J5.3
J6	ดินใต้ต้นสน ริมทะเลบนบก ข้างร้านอาหาร	7.15	J6.1, J6.2, J6.3, J6.4
J8	ดินขาว แห่ง บริเวณป่าเสม็ด	5.89	J8.1, J8.2, J8.3
J9	ดินทรายเป็นสีดำ	6.18	J9.1, J9.2, J9.3, J9.4, J9.5
J10	ทรายบริเวณชายหาด มีผักนึ่งทะเลขึ้นอยู่	7.45	J10.1
J11	ดินขาว แห่ง ใต้ต้นเสม็ด ในป่ายูคาลิปตัส	4.21	J11.1
J12	ดินทราย สีดำ เปี้ยก ใต้ต้นฝาดดอกแดง	6.97	J12.1, J12.2, J12.3, J12.4

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิสที่แยกได้จากอ่าว  
คุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี

ตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง	pH	สายพันธุ์แอกติโนมัยซิส ที่แยกได้
J13	ดินทราย สีดำ-น้ำตาล ขึ้น บริเวณหญ้า	7.43	J13.1, J13.2, J13.3, J13.4, J13.5, J13.6, J13.7, J13.8
J14	ดินทราย สีดำ เปือก	6.50	J14.1, J14.2, J14.3
J15	ดินทราย สีน้ำตาล ขึ้น	8.66	J15.1, J15.4
J16	ดินทราย สีดำ-น้ำตาล ใต้ต้นโกงกาง	7.82	J16.1, J16.2
J17	ดินทราย-โคลน ใต้ต้นแสม เปือก	6.37	J17.1
J19	โคลน สีดำ เปือก	5.97	J19.1, J19.2, J19.3, J19.4, J19.5, J19.6
J20	ดินทราย สีน้ำตาล-ดำ ใต้ต้นโปรงแดง	6.46	J20.1, J20.1

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิสที่แยกได้จากอ่าว  
ปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง	pH	สายพันธุ์แอกติโนมัยซิส ที่แยกได้
P1	ทราย สีน้ำตาลอ่อน แห้ง บริเวณชายหาด มี หญ้าทะเลและผักบุ้งทะเลขึ้นอยู่	8.12	P1.1
P2	ทราย สีน้ำตาลเข้ม ขึ้น บริเวณผักเบี้ยทะเล	6.59	P2.2
P3	ทราย ขึ้น สีน้ำตาลอ่อน	6.42	P3.3, P3.2
P4	ดินทราย แห้ง บริเวณหญ้าทะเลใต้ต้นโพธิ์ ทะเล	6.31	P4.1
P5	ดินทราย สีน้ำตาลอ่อน แห้งบริเวณหญ้าทะเล	6.72	P5.1, P5.2
P6	ดินและเศษใบไม้ สีดำ แห้ง บริเวณใต้ต้นสน ริมชายหาด	6.06	P6.2, P6.3
P7	โคลน สีน้ำตาลเข้ม เปือก	6.50	P7.1, P7.2, P7.3, P7.5
P15	ดินทราย สีดำ ขึ้น	5.88	P15.1, P15.2
P16	ดินทราย สีน้ำตาลเข้มขึ้น	7.14	P16.1

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิสที่แยกได้จาก  
อำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง	pH	สายพันธุ์แอกติโนมัยซิส ที่แยกได้
P17	ดินเหนียว สีดำ ชั้น ใต้ต้นโกงกางใบเล็ก	6.06	P17.1
P18	ดินเหนียว สีดำ ชั้น ใต้ต้นแสม	6.30	P18.1
P19	ดินขาวปนทราย สีน้ำตาลอ่อน ชั้น ใต้ต้นแสม	7.22	P19.1

ตารางที่ 4.3 ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิสที่แยกได้จากอำเภอ  
หวาง จังหวัดระนอง

ตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง	pH	สายพันธุ์แอกติโนมัยซิส ที่แยกได้
R1	ดินเหนียว สีน้ำตาลอ่อน เปี้ยก บริเวณแปลง อนุบาลโกงกาง	6.14	R1.1, R1.3
R2	ดินเหนียว สีดำ ชั้น	3.26	R2.1
R3	ดินทราย สีน้ำตาลเข้ม เปี้ยก บริเวณโคนต้น เหียงอกปลาหมอ	5.68	R3.1

ตารางที่ 4.4 ลักษณะของดิน และทราย ค่า pH และจำนวนแอกติโนมัยซิสที่แยกได้จากแหลม  
ผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี

ตัวอย่าง	ลักษณะของตัวอย่าง	pH	สายพันธุ์แอกติโนมัยซิส ที่แยกได้
B2	ดินขาว เนื้อละเอียด แห้ง	7.41	B2.4

#### 4.2) แอกติโนมัยซิสจากดิน และทรายตัวอย่าง

จากการแยกแอกติโนมัยซิสจากดิน และทราย 34 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ starch casein agar พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยซิส ได้จำนวน 77 สายพันธุ์ ทำการบันทึกลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซิสที่แยกได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 สายพันธุ์และลักษณะของแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน และทราย

แอคติโนมัยซิส สายพันธุ์	ลักษณะของโคโลนี
1) J1.1	โคโลนีสีขาว แข็ง ด้าน และฟู ย่อยอาหารให้เป็นสีเหลือง
2) J1.2	โคโลนีสีขาว แข็ง และฟู
3) J1.3	โคโลนีสีขาว บาง แผ่ออก
4) J1.4	โคโลนีสีขาว ผิวหนัง
5) J1.5	โคโลนีสีดำ กลม
6) J2.1	สายใยอาหารสีน้ำตาล สายใยอากาศสีขาว โคโลนีหยัก และใหญ่
7) J2.2	โคโลนีเหลืองอ่อน นูน มัน มีบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
8) J3.1	โคโลนีขาว กลม มีบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
9) J4.1	โคโลนีขาว เป็นจุด แผ่เป็นวงกว้าง
10) J5.1	โคโลนีเหลืองอ่อน กลม มัน และแข็ง
11) J5.3	โคโลนีส้มเข้ม กลม เล็ก
12) J6.1	โคโลนีส้มอิฐ ผิวแบ่งสีเทา กลม
13) J6.2	โคโลนีน้ำตาล กลม แข็ง
14) J6.3	โคโลนีกลม บนสีเทา ด้านล่างสีเหลือง
15) J6.4	โคโลนีม่วง กลม เล็ก แข็ง มีจุดผิวแบ่งตรงกลาง
16) J8.1	โคโลนีขาว กลม มีบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
17) J8.2	โคโลนีเหลือง ขอบเรียบ ผิวแบ่ง
18) J8.3	โคโลนีน้ำตาล ขอบเรียบ แผ่เป็นวงกว้าง
19) J9.1	โคโลนีส้ม นิม บนหยัก ขอบหยัก
20) J9.2	โคโลนีขาว เหนียว บนหยัก ขอบหยัก มีบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
21) J9.3	โคโลนีขาว ฟู ตรงกลางดำ
22) J9.4	โคโลนีแดง กลม
23) J9.5	โคโลนีขาว แผ่ออกเป็นกิ่งก้าน
24) J10.1	โคโลนีดำ กลม มีบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
25) J11.1	โคโลนีน้ำตาลดำ ผิวแบ่ง กลม
26) J12.1	โคโลนีขาว กลม
27) J12.2	โคโลนีขาว กลม

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) สายพันธุ์และลักษณะของแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน และทราย

แอคติโนมัยซิส สายพันธุ์	ลักษณะของโคโลนี
28) J12.3	โคโลนีเขียว กกลม
29) J12.4	โคโลนีขาว กกลม
30) J13.1	โคโลนีกกลม สายใยอาหารสีน้ำตาล สายใยอากาศสีขาว มีบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
31) J13.2	โคโลนีกกลม สายใยอาหาร และสายใยอากาศสีขาว ผิวแบ่ง
32) J13.3	โคโลนีน้ำตาล หยัก นิ่ม
33) J13.4	โคโลนีเหลือง ผิวแบ่งหนา แผ่ออกเป็นวง
34) J13.5	โคโลนีน้ำตาลเหลือง กกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเป็นแบ่งเล็กน้อย
35) J13.6	โคโลนีเหลืองอ่อน ขอบเรียบตรงกลางหยัก
37) J13.8	โคโลนีเทา เส้นใยแผ่ออกด้านข้าง
38) J14.1	โคโลนีส้ม กกลม แข็ง
39) J14.2	โคโลนีสีครีม ด้านข้างแผ่เป็นต้นไม้ นิ่ม
40) J14.3	โคโลนีน้ำตาล มีเส้นใยแผ่ออกด้านข้าง
41) J15.1	โคโลนีกกลม สายใยอาหารสีม่วง สายใยอากาศสีขาว
42) J15.4	โคโลนีเทา กกลม ผิวแบ่ง
43) J16.1	โคโลนีส้ม ด้าน ขอบหยักเล็กน้อย
44) J16.2	โคโลนีสีโอรส นิ่ม ขอบหยักเล็กน้อย
45) J17.1	โคโลนีเทา บนหยัก ขอบเรียบ กกลม มัน แข็ง
46) J19.1	โคโลนีแดง ขอบหยัก มัน
47) J19.2	โคโลนีเหลืองอ่อน ขอบหยัก มัน
48) J19.3	โคโลนีส้ม ขอบหยัก แข็ง
49) J19.4	โคโลนีเหลือง ขอบหยัก มัน มีบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
50) J19.5	โคโลนีใส กกลม เล็ก มีบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
51) J19.6	โคโลนีกกลม ล่างสีเหลือง ผิวแบ่งคลุมหนา
52) J20.1	โคโลนีเหลือง ด้านบน และขอบหยัก นิ่ม
53) J20.2	โคโลนีใส แผ่เป็นวง ขอบหยัก นิ่ม

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) สายพันธุ์และลักษณะของแอกติโนมัยซิสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน และทราย

แอกติโนมัยซิส สายพันธุ์	ลักษณะของโคโลนี
54) P1.1	โคโลนีกลม สายใยอาหารสีน้ำตาล สายใยอากาศสีขาว สปอร์ขาว
55) P2.1	สร้างเส้นใยแผ่เป็นวงกว้าง สีน้ำตาลอ่อน สร้างสารละลายเป็นหยดบนผิวโคโลนี
56) P3.1	โคโลนีกลม ขาว ขอบหยัก ย่อยอาหารจนเป็นสีเหลือง
57) P3.2	สร้างเส้นใยแผ่เป็นวงกว้าง สีน้ำตาลอ่อน สร้างสารละลายเป็นหยดบนผิวโคโลนี
58) P4.1	โคโลนีกลม สายใยอาหารสีแดง สายใยอากาศสีขาว สปอร์ขาว
59) P5.1	สร้างเส้นใยแผ่เป็นวงกว้าง สีน้ำตาลอ่อน สร้างสารละลายเป็นหยดบนผิวโคโลนี
60) P5.2	สร้างเส้นใยแผ่เป็นวงกว้าง สีน้ำตาลอ่อน สร้างสารละลายเป็นหยดบนผิวโคโลนี
61) P6.2	โคโลนีกลม สายใยอาหารสีน้ำตาล สายใยอากาศสีขาว สปอร์ขาว
62) P6.3	โคโลนีกลม สายใยอาหารสีน้ำตาล สายใยอากาศสีขาว สปอร์ขาว
63) P7.1	โคโลนีกลม ขาว สายใยอาหารสีขาว สายใยอากาศสีขาว สปอร์ขาว
64) P7.2	โคโลนีกลม มัน สีน้ำตาล ขอบหยัก
65) P7.3	โคโลนีขาว มันเล็กน้อย แผ่ออกด้านข้าง
66) P7.5	โคโลนีกลม ขาว, แผ่ออกเป็นวงกว้างมาก
68) P15.2	โคโลนีกลม สีขาว ขอบหยัก เล็ก เส้นใยแผ่ออกด้านข้างเล็กน้อย
69) P16.1	โคโลนีกลม เทา สปอร์เทา อาหารใต้โคโลนีมีสีน้ำตาลอ่อน
70) P17.1	โคโลนีกลม มัน สีส้ม
71) P18.1	โคโลนีกลม มัน สีส้ม มีเส้นใยแผ่ออกด้านข้าง
72) P19.1	โคโลนีขาว เล็ก กลม ขอบหยัก
73) R1.2	โคโลนีกลม สายใยอาหารสีน้ำตาล สายใยอากาศสีขาว สปอร์สีน้ำตาลเข้ม
74) R1.3	โคโลนีกลม ขาว สปอร์น้ำตาลดำ
75) R2.1	โคโลนีขอบหยัก ขาว มันเล็กน้อย
76) R3.1	โคโลนีกลม เล็ก สีส้ม ผิวเรียบ มัน
77) B2.4	โคโลนีกลม เล็ก สีส้ม เส้นใยสีขาว แผ่ออกด้านข้าง

#### 4.3) การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะเบื้องต้น

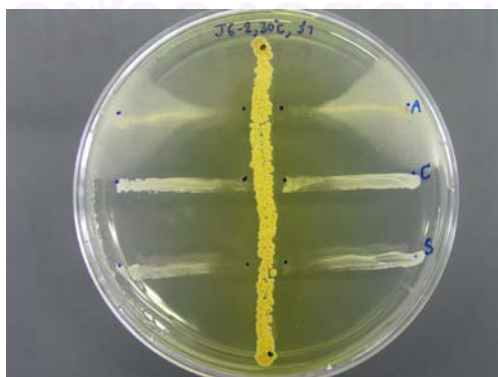
นำแอกติโนมัยซิสทั้งหมดที่แยกได้ 77 สายพันธุ์ มาทดสอบด้วยวิธี agar cross streak กับ จุลินทรีย์ทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC1729
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25923
<i>Candida albicans</i>	ATCC 70014
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TISTR 5169
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC6275

เมื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง โดยวัดจากขอบของจุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกยับยั้งผ่านโคโลนีของแอกติโนมัยซิส จนถึงขอบอีกด้านหนึ่งของจุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกยับยั้ง พบว่า แอกติโนมัยซิสแต่ละสายพันธุ์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 แอกติโนมัยซิสที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแบบเป็นวงกว้าง โดยยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา และ ยีสต์ ได้แก่ สายพันธุ์ J2.1 J6.1 J6.2 J15.4 และ P1.1 รูปที่ 4.1 และ 4.2 แสดงบริเวณยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราทดสอบ ของแอกติโนมัยซิสที่แยกได้



รูปที่ 4.1 แสดงการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1



รูปที่ 4.2 แสดงการยับยั้งยีสต์ และราทดสอบของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2



ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซิส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซิส	ระดับการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>E.coli</i> ATCC9027	<i>P.aeruginosa</i> ATCC25922	<i>B. cereus</i> ATCC1729	<i>S.aureus</i> ATCC25923	<i>C.albicans</i> ATCC 70014	<i>S.cerevisiae</i> TISTR 5169	<i>A.niger</i> ATCC6275
J1.4	-	-	++	++	-	+	+
J2.1	++	+	++	++	+	+++	++
J5.3	-	-	-	-	+	+	-
J6.1	++	+++	+++	++	++	+++	+
J6.2	++	+	+++	+++	+	++	++
J6.3	+	+	+	+++	-	+	+
J8.1	-	-	+	++	++	+	+
J11.1	-	-	+++	+++	++	+++	++
J12.3	-	-	-	-	+	+	+
J15.4	+	+	+	+++	++	++	++
J19.2	-	-	+	+	-	+	+
J19.4	-	-	-	-	-	+	+
J20.1	-	-	+	+	-	+	+
J20.2	-	-	-	-	+	-	-
P1.1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
P3.2	-	-	++	++	-	-	+
P4.1	-	-	+	-	+++	+	+
P7.3	-	-	-	-	-	+	-
P15.2	-	-	-	-	-	++	+
R3.2	-	-	+	+	-	-	-
B2.4	-	-	+	-	-	+	-

หมายเหตุ +++ = รัศมีของบริเวณยับยั้งมากกว่า 15 มิลลิเมตร

++ = รัศมีของบริเวณยับยั้ง 7 – 15 มิลลิเมตร

+ = รัศมีของบริเวณยับยั้ง 1 – 7 มิลลิเมตร

- = ไม่ยับยั้ง

#### 4.4) การทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเบื้องต้น

นำสารสกัดที่ได้จากแอกติโนมายซิส (crude extract) ที่แยกได้ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่างๆ 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร KatolIII (HTB-103) เซลล์มะเร็งตับ HepG2 (HB-8065) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (CCL-227) เซลล์มะเร็งเต้านม BT474 (HTB-20) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat (TIB-152) ตรวจสอบด้วยวิธี MTT โดยการวัดการดูดกลืนแสง เซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะติดสี หลุมที่มีค่าความดูดกลืนแสงสูงแสดงว่ายังมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่มาก ส่วนหลุมที่มีค่าความดูดกลืนแสงน้อยแสดงว่า เซลล์ถูกยับยั้งการเจริญ

จากนั้นหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยนำค่าความดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{percentage} = 100 - \left[ \frac{(\text{OD of tested well} - \text{positive control}) \times 100}{(\text{negative control} - \text{positive control})} \right]$$

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารสกัดจากแอกติโนมายซิสแสดงดังตารางที่ 4.7 ตัวเลขที่พิมพ์ตัวหนา หมายถึงการยับยั้งแบบจำเพาะเจาะจง

ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารสกัดจากแอกติโนมายซิส

แอกติโนมายซิส สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (%)				
	KatolIII (HTB-103)	HepG2 (HB-8065)	SW620 (CCL-227)	BT474 (HTB-20)	Jurkat (TIB-152)
P1.1	-6.287	12.097	19.17	<b>63.64</b>	1.278
P3.1	34.731	45.968	11.77	45.45	-15.91
P3.2	9.5808	29.032	32.4	-12.7	11.22
P4.1	55.389	77.419	67.6	98.18	36.51
P7.2	49.102	<b>87.903</b>	27.58	61.82	-36.93
P15.1	36.228	84.677	54.93	81.82	29.4
P16.1	42.814	70.968	43.39	36.36	10.94
P17.1	12.275	50	36.77	40	29.97
P18.1	32.934	<b>109.68</b>	67.15	61.82	40.2
P19.1	57.186	<b>129.84</b>	43.39	38.18	41.62
J1.1	72.156	<b>125</b>	84.3	34.55	35.65

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารสกัดจากแอกติโนไมซีต

แอกติโนไมซีต สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (%)				
	Katolll (HTB-103)	HepG2 (HB-8065)	SW620 (CCL-227)	BT474 (HTB-20)	Jurkat (TIB-152)
J1.2	54.79	85.484	56.39	27.27	19.46
J1.4	96.707	137.1	99.66	87.27	51.85
J1.5	29.641	104.03	37.22	118.2	42.19
J2.2	84.731	136.29	85.31	121.8	45.45
J4.2	45.509	103.23	63.34	92.73	26.99
J5.3	66.168	92.742	40.13	94.55	13.92
J6.1	63.473	77.419	10.99	78.18	14.91
J6.2	16.168	<b>147.58</b>	79.26	61.82	39.63
J6.3	50.898	100.81	83.52	72.73	35.51
J6.4	70.659	100.81	80.38	85.45	39.49
J8.1	55.988	66.935	30.38	40	31.73
J9.1	-18.56	49.194	43.27	60	38.78
J9.5	14.072	141.94	49.89	121.8	47.59
J10.1	79.641	116.13	78.7	130.9	50.99
J12.1	83.234	<b>142.74</b>	89.69	83.64	44.46
J12.3	39.521	20.161	24.66	25.45	15.2
J12.4	81.737	52.419	89.46	14.55	32.53
J13.3	19.76	<b>116.13</b>	71.86	54.55	48.58
J13.4	41.317	<b>89.516</b>	69.17	60	38.92
J13.6	16.168	-14.52	10.99	34.55	6.108
J14.3	23.952	<b>83.871</b>	56.39	36.36	31.82
J15.1	19.461	16.129	<b>101.8</b>	80	26.99
J15.2	-41.62	61.29	44.51	<b>109.1</b>	27.98
J15.4	-22.75	9.6774	4.596	<b>92.73</b>	24.01
J16.2	37.126	75.806	32.17	76.36	15.91

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารสกัดจากแอกติโนมัซซีส

แอกติโนมัซซีส สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (%)				
	Katolll (HTB-103)	HepG2 (HB-8065)	SW620 (CCL-227)	BT474 (HTB-20)	Jurkat (TIB-152)
J19.2	-42.51	7.2581	3.924	-102	-100
J20.1	-17.5	-30.19	-1.228	17.07	-37.64
J20.2	10.36	-18.24	20.47	18.54	-1.563
R1.3	50.268	69.811	69.53	97.07	38.64
R3.1	17.928	16.981	30.7	63.41	33.24
B2.4	11.755	35.22	38.3	47.8	17.76
R1.2	51.664	46.541	43.45	74.63	33.95

#### 4.5) การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัซซีส

จากตารางที่ 4.6 และ 4.7 สามารถจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัซซีสที่แยกได้ ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัซซีสที่แยกได้

กลุ่มของจุลินทรีย์ทดสอบ และเซลล์มะเร็ง ที่ถูกยับยั้ง	แอกติโนมัซซีส สายพันธุ์	ฤทธิ์การยับยั้ง
1. แบคทีเรียแกรมบวก	R3.2	ยับยั้ง <i>Bacillus cerues</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>
2. ยีสต์	J5.3 J20.2 และ P7.3	J20.3 ยับยั้ง <i>Candida albicans</i> P7.3 ยับยั้ง <i>Saccharomyces cereviseiae</i> J5.3 ยับยั้งยีสต์ทั้งสองชนิด
3. ยีสต์ และรา	J12.3 J19.4 และ P15.2	J19.4 และ J15.2 ยับยั้ง <i>Saccharomyces cereviseiae</i> และ <i>Aspergillus niger</i> J12.3 ยับยั้งยีสต์ทั้งสองชนิด และ <i>Aspergillus niger</i>

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) การจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยซิสที่แยกได้

กลุ่มของจุลินทรีย์ทดสอบ และเซลล์มะเร็ง ที่ถูกยับยั้ง	แอกติโนมัยซิส สายพันธุ์	ฤทธิ์การยับยั้ง
4. แบคทีเรียแกรมบวก และ ยีสต์	B2.4	ยับยั้ง <i>Bacillus cereus</i> และ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5. แบคทีเรียแกรมบวก และ รา	P3.2	ยับยั้ง <i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> และ <i>Aspergillus niger</i>
6. แบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และรา	J1.4 J8.1 J11.1 J19.2 J20.1 และ P4.1	J1.4 J19.2 และ J20.1 ยับยั้ง <i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> และ <i>Aspergillus niger</i> J8.1 และ J11.1 ยับยั้ง <i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> และ <i>Aspergillus niger</i> P4.1 ยับยั้ง <i>Bacillus cereus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> และ <i>Aspergillus niger</i>
7. แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ และรา	P1.1 J2.1 J6.1 J6.2 J6.3 และ J15.4	ยับยั้ง <i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> และ <i>Aspergillus niger</i>
8. เซลล์มะเร็งตับ	J6.2 J12.1 J13.3 J13.4 J14.3	ยับยั้งจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งตับ HepG2
9. เซลล์มะเร็งเต้านม	P1.1 J15.2 และ J15.4	ยับยั้งจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งเต้านม BT474

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) การจัดกลุ่มการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยซิสที่แยกได้

กลุ่มของจุลินทรีย์ทดสอบ และเซลล์มะเร็ง ที่ถูกยับยั้ง	แอกติโนมัยซิส สายพันธุ์	ฤทธิ์การยับยั้ง
10. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่	J15.1	ยับยั้งจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620
11. แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ และรา อีกทั้งยับยั้งเซลล์มะเร็ง แบบจำเพาะเจาะจง	P1.1 J6.2 และ J15.4	ยับยั้ง <i>Bacillus cerues</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cereviseiae</i> และ <i>Aspergillus niger</i> อีกทั้งยับยั้งจำเพาะ เจาะจงกับเซลล์มะเร็ง HepG2 BT474 และ SW620

จากการจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง พบว่าแอกติโนมัยซิสแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และเซลล์มะเร็งได้ต่างกัน จึงได้เลือกแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้เป็นวงกว้าง และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้แบบจำเพาะเจาะจง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 4.6) สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น โดยใช้วิธี Agar cross streak สำหรับทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และวิธี MTT สำหรับทดสอบการสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง พบว่า แอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) เป็นแบบ broad spectrum โดยทั้งสามสายพันธุ์นี้ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราได้

อีกทั้งยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (antitumor activity) แบบจำเพาะเจาะจง (specific inhibition) กล่าวคือ

แอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474)

แอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2 จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

แอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J15.4 จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474)

จึงได้คัดเลือกแอกติโนมัยซิสทั้งสามสายพันธุ์นี้มาจำแนกชนิด และคัดเลือก สายพันธุ์ J6.2 มาศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจาก สารที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งตั้บนั้นยังค้นพบได้น้อยในปัจจุบัน

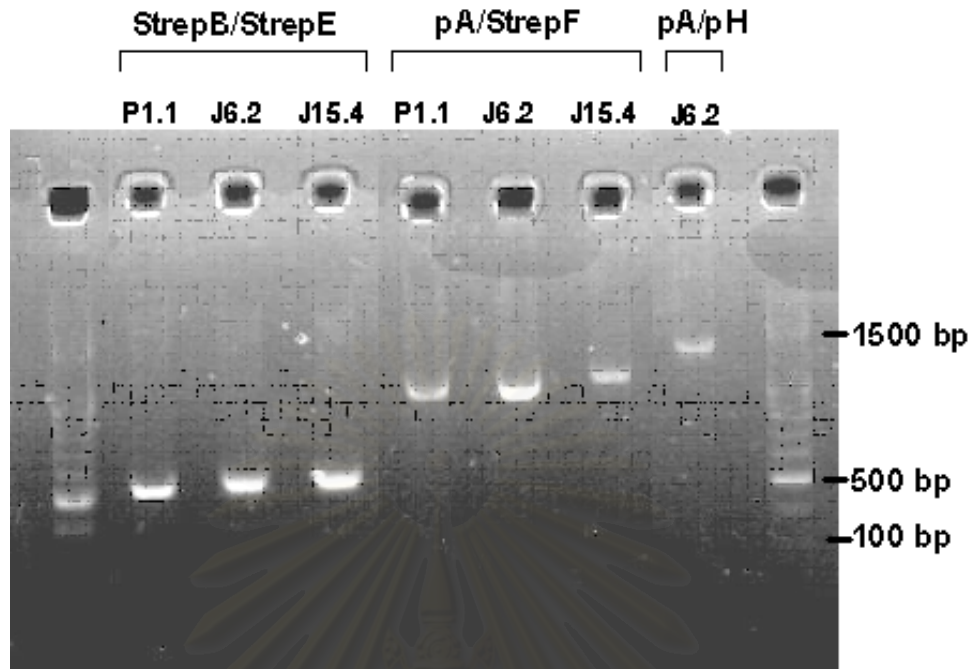
#### 4.7) การจำแนกแอกติโนมัยซิสสายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA

ทำการสกัด และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนประมวลรหัส 16S rRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1541 คู่เบส (base pairs; bp) แต่เนื่องจากยีนประมวลรหัส 16S rRNA เป็นยีนที่มีขนาดใหญ่ และมีลำดับเบสอนุรักษ์ (conserved sequence) อยู่มาก จึงต้องออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้หลากหลายขนาด เพื่อสามารถครอบคลุมลำดับเบสที่มีความแตกต่างกัน (variable region) ในแต่ละสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซิส โดยการตรวจสอบหาลำดับเบสที่ซ้อนทับกัน (over lab) ของ PCR product ที่เพิ่มจำนวนได้ ในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ โดยอ้างอิงข้อมูลจาก Rintala และคณะ (2001) และ Lanoot และคณะ (2005) ได้แก่

Strep B	5' – ACAAGCCCTGGAAACGGGGT – 3'	(ตำแหน่งที่จับ 139- 158)
Strep E	5' – CACCAGGAATTCCGATCT – 3'	(ตำแหน่งที่จับ 640- 657)
Strep F	5' – ACGTGTGCAGCCCAAGACA – 3'	(ตำแหน่งที่จับ 1194- 1212)
pA	5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'	(ตำแหน่งที่จับ 8- 27)
pH	5' – AAGGAGGTGATCCAGCCGCA – 3'	(ตำแหน่งที่จับ 1541- 1522)

ทำการตรวจสอบขนาดของ PCR product เบื้องต้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในรูปที่ 4.3

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.3 ขนาดของ PCR product เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ บนอะกาโรสเจล

จากนั้นส่งตัวอย่าง PCR product ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 ขนาดต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนประมวลรหัส 16S rRNA ที่สำนักงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแสดงดัง รูปที่ 4.4 – 4.6 ซึ่งชิ้นส่วนของดีเอ็นเอดังกล่าวของสายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 มีขนาด 1,124 1,401 และ 1,105 bp ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
GCTTACACAT GCAAGTCGAA CGATGAACCA CTTCGGTGGG GATTAGTGGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
GAACGGGTGA GTAACACGTG GGCAATCTGC CCTGCACTCT GGGACAAGCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     110     120     130     140     150
CTGGAACCGG GGTCTAATAC CGGATACTGA TCCTCGCAGG CATCTGCGAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     160     170     180     190     200
GTTCGAAAGC TCCGGCGGTG CAGGATGAGC CCGCGCCTA TCAGCTAGTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     210     220     230     240     250
GGTGAGGTAA CGGCTCACCA AGGCGACGAC GGGTAGCCGG CCTGAGAGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     260     270     280     290     300
CGACCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350
GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGGGCGAAA GCCTGATGCA GCGACGCCGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     360     370     380     390     400
GTGAGGGATG ACGGCCTTCG GGTGTAAAC CTCTTTCAGC AGGGAAGAAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     410     420     430     440     450
CGAAAGTGAC GGTACCTGCA GAAGAAGCGC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     460     470     480     490     500
GCCGCGGTAA TACGTAGGGC GCAAGCGTTG TCCGGAATTA TTGGGCGTAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     510     520     530     540     550
AGAGCTCGTA GGCGGCTTGT CACGTCGGTT GTGAAAGCCC GGGGCTTAAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     560     570     580     590     600
CCCGGGTCTG CAGTCGATAC GGGCAGGCTA GAGTTCGGTA GGGGAGATCG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     610     620     630     640     650
GAATTCCTGG TGTAGCGGTG AAATGCGCAG ATATCAGGAG GAACACCGGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     660     670     680     690     700
GGCGAAGGCG GATCTCTGGG CCGATACTGA CGCTGAGGAG CGAAAGCGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     710     720     730     740     750

```

GGGAGCGAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGGTGGG  
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
760 770 780 790 800  
CACTAGGTGT GGGCAACATT CCACGTTGTC CGTGCCGCAG CTAACGCATT  
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
810 820 830 840 850  
AAGTGCCCGG CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGCTAAAAC TCAAAGGAATT  
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
860 870 880 890 900  
GACGGGGGCC CGCACAAGCG GCGGAGCATG TGGCTTAATT CGACGCAACG  
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
910 920 930 940 950  
CGAAGAACCT TACCAAGGCT TGACATACAC CGGAAAACCC TGGAGACAGG  
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
960 970 980 990 1000  
GTCCCCCTTG TGGTCGGTGT ACAGGTGGTG CATGGCTGTC GTCAGCTCGT  
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
1010 1020 1030 1040 1050  
GTCGTGAGAT GTTGGGTTAA GTCCCGCAAC GAGCGCAACC CTTGTCCCGT  
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|  
1060 1070 1080 1090 1100  
GTTGCCAGCA GGCCCTTGTG GTGCTGGGGA CTCACGGGAG ACCGCCGGGG  
.....|.....| .....|.....| .....  
1110 1120  
TTCAAAC TCG GAGGAATGGT GGGG

รูปที่ 4.4 ลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอกติโนมัซซีส สายพันธุ์ P1.1

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          10          20          30          40          50
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CGATGAACCA CTTCGGTGGG GATTAGTGGC GAACGGGTGA GTAACACGTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          60          70          80          90          100
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GGCAATCTGC CCTGCACTCT GGGACAAGCC CTGGAAACGG GGTCTAATAC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          110         120         130         140         150
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CGGATACTGA CCTTCACGGG CATCTGTGAA GGTGCGAAAGC TCCGGCGGTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          160         170         180         190         200
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CAGGATGAGC CCGCGGCCTA TCAGCTTGTT GGTGAGGTAA TGGCTCACCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          210         220         230         240         250
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
AGGCGACGAC GGGTAGCCGG CCTGAGAGGG CGACCGGCCA CACTGGGACT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          260         270         280         290         300
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGCACA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          310         320         330         340         350
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
ATGGGCGAAA GCCTGATGCA GCGACGCCGC GTGAGGGATG ACGGCCTTCG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          360         370         380         390         400
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GGTTGTAAAC CTCTTTCAGC AGGGAAGAAG CGAAAGTGAC GGTACCTGCA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          410         420         430         440         450
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GAAGAAGCGC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGGC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          460         470         480         490         500
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
GCAAGCGTTG TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGAGCTCGTA GGCGGCTTGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          510         520         530         540         550
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CACGTCGGTT GTGAAAGCCC GGGCTTAAC CCCGGTCTG CAGTCGATAC

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      560      570      580      590      600
.....
GGGCAGGCTA GAGTTCGGTA GGGGAGATCG GAATTCCTGG TGTAGCGGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      610      620      630      640      650
.....
AAATGCGCAG ATATCAGGAG GAACACCGGT GGCGAAGGCG GATCTCTGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      660      670      680      690      700
.....
CCGATACTGA CGCTGAGGAG CGAAAGCGTG GGGAGCGAAC AGGATTAGAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      710      720      730      740      750
.....
ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGGTGGG CACTAGGTGT GGGCAACATT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      760      770      780      790      800
.....
CCACGTTGTC CGTGCCGAG CTAACGCATT AAGTGCCCG CCTGGGGAGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      810      820      830      840      850
.....
ACGCGCCGAA GGCTAAAAC TAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      860      870      880      890      900
.....
GCGGAGCATG TGGCTTAATT CGACGCAACG CGAAGAACCT TACCAAGGCT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      910      920      930      940      950
.....
TGACATACAC CGGAAACGTC CAGAGATGGG CGCCCCCTG TGGTCGGTGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      960      970      980      990      1000
.....
ACAGGTGGTG CATGGCTGTC GTCAGCTCGT GTCGTGAGAT GTTGGGTAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1010     1020     1030     1040     1050
.....
GTCCCAGCAAC GAGCGCAACC CTTGTCCCGT GTTGCCAGCA GGCCCTTGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1060     1070     1080     1090     1100
.....
GTGCTGGGGA CTCACGGGAG ACCGCCGGGG TCAACTCGGA GGAAGGTGGG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1110          1120          1130          1140          1150
.....
GACGACGTCA AGTCATCATG CCCCTTATGT CTTGGGCTGC ACACGTGCTA
.....
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1160          1170          1180          1190          1200
.....
CAATGGCCGG TACAATGAGC TGCGATACCG CAAGGTGGAG CGAATCTCAA
.....
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1210          1220          1230          1240          1250
.....
AAAGCCGGTC TCAGTTCGGA TTGGGGTCTG CAACTCGACC CCATGAAGTC
.....
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1260          1270          1280          1290          1300
.....
GGAGTCGCTA GTAATCGCAG ATCAGCATTG CTGCGGTGAA TACGTTCCCG
.....
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          1310          1320          1330          1340          1350
.....
GGCCTTGTA ACACCGCCCG TCACGTCACG AAAGTCGGTA ACACCCGAAG
.....
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .
          1360          1370          1380          1390          1400
.....
CCGGTGGCCC AACCCCTTGT GGGAGGGAGC TGTGGAAGGT GGGACTGGCG A

```

รูปที่ 4.5 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ของแอกติโนมายซิส สายพันธุ์ J6.2

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
AGTCGACGAT GAACCTCCTT CGGGAGGGGA TTAGTGGCGA ACGGGTGAGT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
AACACGTGGG CAATCTGCCC TGCACTCTGG GACAAGCCCT GGAAACGGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     110     120     130     140     150
TCTAATACCG GATACTGACC CGCTTGGGCA TCCAAGCGGT TCGAAAGCTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     160     170     180     190     200
CGGCGGTGCA GGATGAGCCC GCGGCCTATC AGCTTGTGG TGAGGTAATG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     210     220     230     240     250
GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGGCC TGAGAGGGCG ACCGGCCACA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     260     270     280     290     300
CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     310     320     330     340     350
ATTGCACAAT GGGCGAAAGC CTGATGCAGC GACGCCGCGT GAGGGATGAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     360     370     380     390     400
GGCCTTCGGG TTGTAAACCT CTTTCAGCAG GGAAGAAGCG AAAGTGACGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     410     420     430     440     450
TACCTGCAGA AGAAGCGCCG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     460     470     480     490     500
CGTAGGGCGC GAGCGTTGTC CGGAATTATT GGGCGTAAAG AGCTCGTAGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     510     520     530     540     550
CGGCTTGTCG CGTCGGTTGT GAAAGCCCGG GGCTTAACCC CGGGTCTGCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     560     570     580     590     600
GTCGATACGG GCAGGCTAGA GTTCGGTAGG GGAGATCGGA ATTCCTGGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     610     620     630     640     650
TAGCGGTGAA ATGCGCAGAT ATCAGGAGGA ACACCGGTGG CGAAGGCCGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     660     670     680     690     700
TCTCTGGGCC GATACTGACG CTGAGGAGCG AAAGCGTGGG GAGCGAACAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     710     720     730     740     750
GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGGTGGGCA CTAGGTGTGG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      760      770      780      790      800
GCGACATTCC ACGTCGTCCG TGCCGCAGCT AACGCATTAA GTGCCCCGCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      810      820      830      840      850
TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG CTAAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCC

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      860      870      880      890      900
CACAAAGCGGC GGAGCATGTG GCTTAATTTCG ACGCAACGCG AAGAACCTTA

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      910      920      930      940      950
CCAAGGCTTG ACATACACCG GAAAGCATCA GAGATGGTGC CCCCCTTGTG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      960      970      980      990     1000
GTCGGTGTAC AGGTGGTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1010     1020     1030     1040     1050
TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT TGTCCCCTGT TGCCAGCAGG

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
     1060     1070     1080     1090     1100
CCCTTGTGGT GCTGGGGACT CACGGGAGAC CGCCGGGTCA ACTCGGAGGA

.....|
AGGGG

```

รูปที่ 4.6 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J15.4

จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ของแอกติโนมัยซิสทั้งสามสายพันธุ์ มาเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่รวบรวมไว้ในฐานข้อมูลยีน (Gene Bank database) จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (กุมภาพันธ์ 2550) พบว่า สายพันธุ์ P1.1 มีระดับความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100% คล้ายกับยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของ *Streptomyces* spp. หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces enissocaesilis* *Streptomyces olivaceus* *Streptomyces rubrocyano-diastaticus* *Streptomyces fungicidicus* *Streptomyces vinaceusdrappus* *Streptomyces plicatus* *Streptomyces maritimus* และ *Streptomyces rochei*

สายพันธุ์ J6.2 มีระดับความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100% คล้ายกับยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของ *Streptomyces parvulus* NBRC 13193

สายพันธุ์ J15.4 ระดับความเหมือน (% identity) เท่ากับ 99% คล้ายกับยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของ *Streptomyces* spp. หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces variabilis*

*Streptomyces vinaceus* *Streptomyces labedae* *Streptomyces erythrogriseus* และ *Streptomyces griseoincarnatus* ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ระดับความเหมือนของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 เทียบกับฐานข้อมูลยีนใน Gene Bank

strain	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
P1.1	<a href="#">DQ026641.1</a>	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> strain NRRL B-16365 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2175</a>	2175	97%	100%
	<a href="#">AB184730.1</a>	<i>Streptomyces olivaceus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 3119	<a href="#">2175</a>	2175	97%	100%
	<a href="#">AB184613.1</a>	<i>Streptomyces rubrocyanodiastaticus</i> subsp. piger gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14692	<a href="#">2175</a>	2175	97%	100%
	<a href="#">AB184529.1</a>	<i>Streptomyces fungicidicus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13848	<a href="#">2175</a>	2175	97%	100%
	<a href="#">AB184311.1</a>	<i>Streptomyces vinaceusdrappus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13099	<a href="#">2175</a>	2175	97%	100%
	<a href="#">AB184291.1</a>	<i>Streptomyces plicatus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13071	<a href="#">2175</a>	2175	97%	100%
	<a href="#">AJ002089.1</a>	<i>Streptomyces</i> sp. 16S rRNA gene, partial, strain NT90(K15)	<a href="#">2175</a>	2175	97%	100%
	<a href="#">AF233338.1</a>	<i>Streptomyces maritimus</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2175</a>	2175	97%	100%
	<a href="#">AB184237.1</a>	<i>Streptomyces rochei</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12908	<a href="#">2169</a>	2169	97%	100%
J6.2	<a href="#">AB184326.1</a>	<i>Streptomyces parvulus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13193	<a href="#">2777</a>	2777	100%	100%



ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ระดับความเหมือนของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 เทียบกับฐานข้อมูลยีนใน Gene Bank

strain	Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	Max ident
J15.4	<a href="#">DQ442551.1</a>	<i>Streptomyces variabilis</i> strain NRRL B-3984T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2163</a>	2163	99%	99%
	<a href="#">AB184763.1</a>	<i>Streptomyces vinaceus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 3406	<a href="#">2163</a>	2163	99%	99%
	<a href="#">AB184704.1</a>	<i>Streptomyces labedae</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 15864	<a href="#">2163</a>	2163	99%	99%
	<a href="#">AB184605.1</a>	<i>Streptomyces erythrogriseus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14601	<a href="#">2163</a>	2163	99%	99%
	<a href="#">AB184207.1</a>	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12871	<a href="#">2163</a>	2163	99%	99%
	<a href="#">AB184186.1</a>	<i>Streptomyces vinaceus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12840	<a href="#">2163</a>	2163	99%	99%
	<a href="#">AY999868.1</a>	<i>Streptomyces labedae</i> strain IFO 15864 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2163</a>	2163	99%	99%
	<a href="#">AY999749.1</a>	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> strain JCM 4381 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">2163</a>	2163	99%	99%
	<a href="#">AJ781321.1</a>	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> 16S rRNA gene, type strain LMG 19316	<a href="#">2163</a>	2163	99%	99%

จากข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์ พบว่ายีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ในแอกติโนมัยซิสในกลุ่ม *Streptomyces* นั้นมีลำดับเบสอนุรักษ์อยู่มาก จึงทำให้พบระดับความเหมือนของยีนนี้กับ *Streptomyces* spp. หลายชนิด การจำแนกความแตกต่างของแอกติโนมัยซิสแต่ละชนิด หรือแต่ละสายพันธุ์นั้น มีความจำเป็นที่จะต้องออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีนบริเวณที่มีความแตกต่างของลำดับเบส (variable region) อีกทั้งจะต้องมีข้อมูลพื้นฐานของแอกติโนมัยซิสหลากหลายชนิด ทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และข้อมูลการจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสกันได้ Lanoot และคณะ (2005) ได้รายงานการจัดกลุ่ม streptomycete ด้วยวิธี RFLP fringerprinting โดยศึกษา ยีน 16S-ITS ซึ่งเป็น ส่วนของยีนประมวลรหัส 16S rRNA ต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ระหว่างยีน 16S และ 23S ribosomal subunit

พบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว สามารถใช้ในการจัดกลุ่ม streptomycete ได้ ยีนบริเวณดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ streptomycete แต่ละชนิด

อย่างไรก็ตาม ยีน 16S-ITS ของ streptomycete นั้นยังมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่น้อย ในฐานข้อมูลปัจจุบัน ดังนั้นในการจำแนกชนิด และสายพันธุ์ *Streptomyces* ในงานวิจัยฉบับนี้จึงใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี ในการประกอบกรจำแนก *Streptomyces* ในระดับชนิด

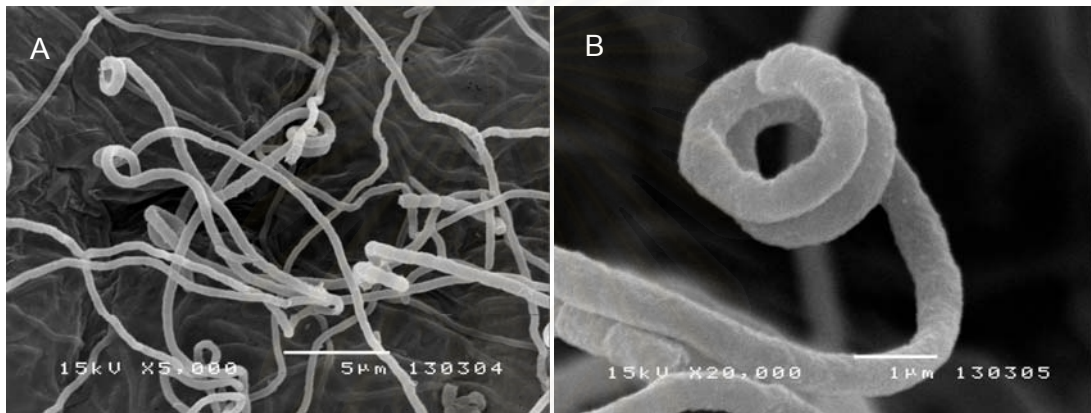


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

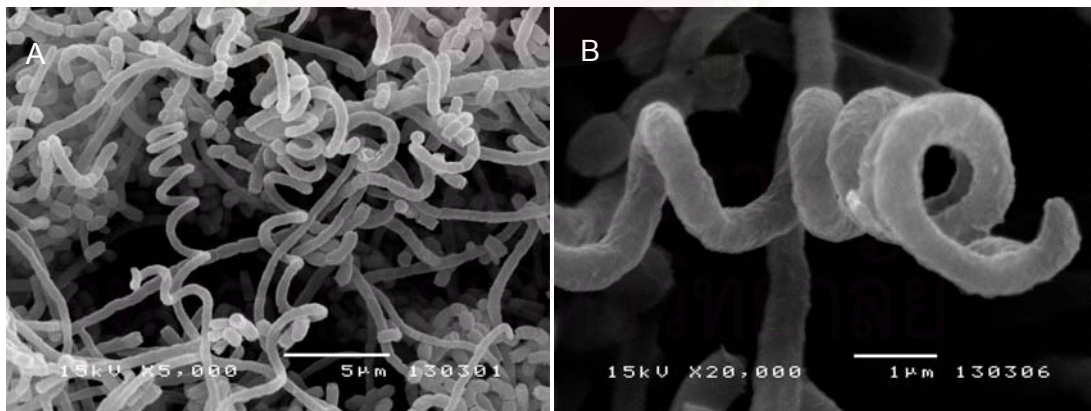
#### 4.8) การศึกษาสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีของแอกติโนมัยซิสสายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4

##### 4.8.1) การศึกษาทางสัณฐานวิทยา

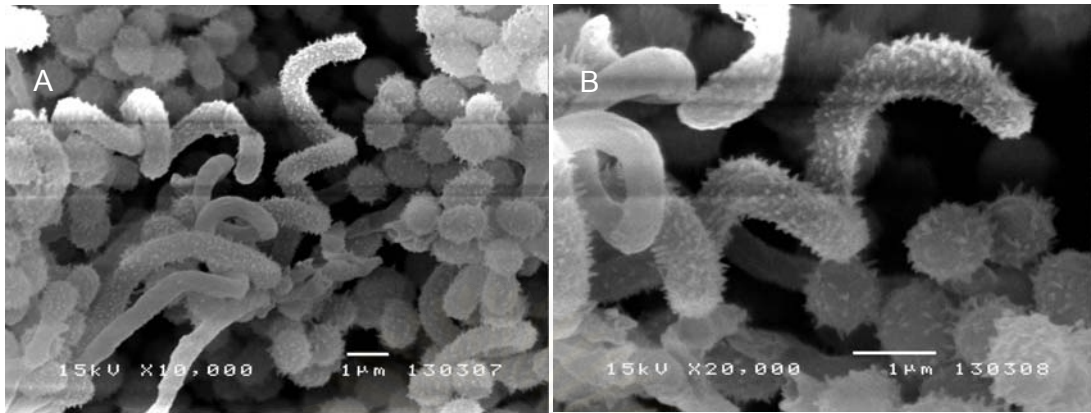
นำแอกติโนมัยซิสที่คัดเลือกได้สามสายพันธุ์ ได้แก่ แอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Sodium Caseinate Agar เพื่อให้สร้างสปอร์ จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ผลแสดงดังรูปที่ 4.7 – 4.9



รูปที่ 4.7 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 ส่องภายใต้ ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (A) และ 20,000 เท่า (B) สังเกตคอนนิตีเรียร์ขดเป็นวง เกือบ ซึ่งเป็นลักษณะของ *Streptomyces*



รูปที่ 4.8 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2 ส่องภายใต้ ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (A) และ 20,000 เท่า (B) สังเกตคอนนิตีเรียร์ขดเป็นวง เกือบ ซึ่งเป็นลักษณะของ *Streptomyces*



รูปที่ 4.9 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J15.4 ส่องภายใต้ ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (A) และ 20,000 เท่า (B) สังเกตคอนนิตีร์ขดเป็นวง เกือบ ซึ่งเป็นลักษณะของ *Streptomyces*

#### 4.8.2) การศึกษาการเจริญ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project (ISP)

จากการนำแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 6 ชนิด คือ

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

เพื่อศึกษาการเจริญ การสร้างสปอร์ สีของสปอร์ สีของสายใยอาหาร สีของสายใยอากาศ และการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ พบว่า แอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 ที่ลักษณะการเจริญแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.10 ลักษณะโคโลนี สีของสายใยอาหาร และสีของสายใยอากาศบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP แสดงดังรูปที่ 4.10 – 4.15

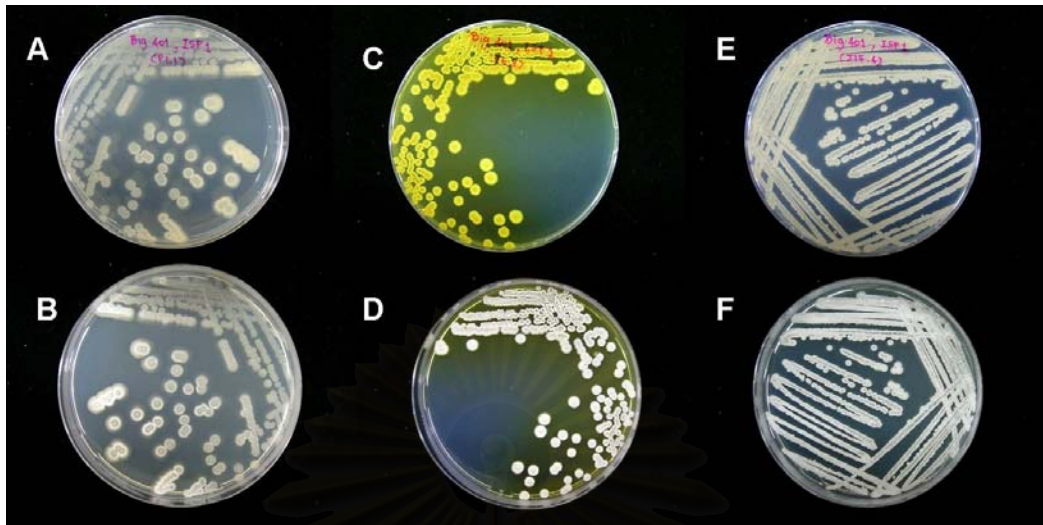
ตารางที่ 4.10 การเจริญของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project (ISP)

ชนิดของอาหาร ISP	ลักษณะการเจริญ	การเจริญของแอกติโนมัยซิสที่แยกได้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP		
		P1.1	J6.2	J15.4
ISP1-TYA	การเจริญ	ดีมาก	ดีมาก	ดีมาก
	การสร้างสปอร์	ปานกลาง	น้อย	ดีมาก
	สีสปอร์	เทา	ขาว	เทา
	สายใยอาหาร	ขาว	ขาวเหลือง	ขาวเหลือง
	สายใยอากาศ	ขาว	ขาว	ขาว
	การสร้างรงควัตถุ	ไม่มี	สารสีเหลือง	ไม่มี
ISP2-YMEA	การเจริญ	ดีมาก	ดีมาก	ดี
	การสร้างสปอร์	ดีมาก	ดีมาก	น้อย
	สีสปอร์	เทา	ขาว	เทา
	สายใยอาหาร	เหลือง	น้ำตาล	ขาวเหลือง
	สายใยอากาศ	ขาว	ขาว	ขาว
	การสร้างรงควัตถุ	ไม่มี	สารสีเหลือง	ไม่มี
ISA3-OA	การเจริญ	ดีมาก	ดี	ดี
	การสร้างสปอร์	ดีมาก	ดี	น้อย
	สีสปอร์	เทา	เทา	ขาว
	สายใยอาหาร	น้ำตาล	ขาวเหลือง	ขาวเหลือง
	สายใยอากาศ	ขาว	ขาว	เหลือง
	การสร้างรงควัตถุ	ไม่มี	สารสีเหลือง	ไม่มี
ISP4-ISSA	การเจริญ	ดีมาก	ดี	ดีมาก
	การสร้างสปอร์	ดีมาก	ดีมาก	ดี
	สีสปอร์	เทา	เทา	ขาว
	สายใยอาหาร	ขาว	เหลือง	ขาว
	สายใยอากาศ	ขาว	ขาว	ขาว
	การสร้างรงควัตถุ	ไม่มี	สารสีเหลือง	ไม่มี

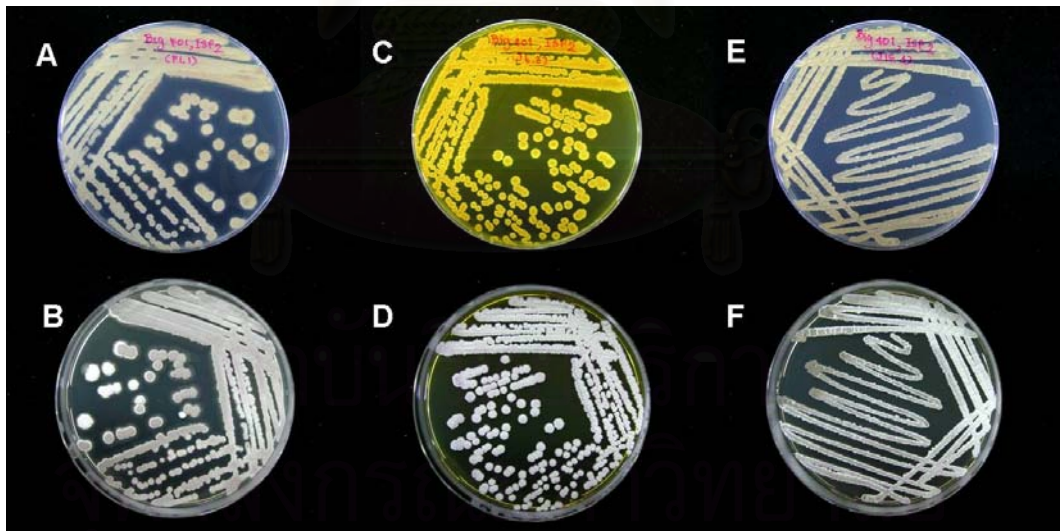
ตารางที่ 4.10 (ต่อ) การเจริญของแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project (ISP)

ชนิดของอาหาร ISP	ลักษณะการเจริญ	การเจริญของแอคติโนมัยซิสที่แยกได้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP		
		P1.1	J6.2	J15.4
ISP5-GAA	การเจริญ	ดีมาก	ดีมาก	ดี
	การสร้างสปอร์	ดีมาก	ดีมาก	ดี
	สีสปอร์	ขาว	เทา	ขาว
	สายใยอาหาร	เหลือง	ขาวเหลือง	ขาว
	สายใยอากาศ	ขาว	ขาว	ขาว
	การสร้างรงควัตถุ	ไม่มี	สารสีเหลืองอ่อน	ไม่มี
ISP6-PYEA	การเจริญ	ดีมาก	น้อย	ดีมาก
	การสร้างสปอร์	น้อย	น้อย	น้อย
	สีสปอร์	ขาว	ขาว	ขาว
	สายใยอาหาร	ขาว	เหลือง	ขาวเหลือง
	สายใยอากาศ	ขาว	เหลือง	ขาว
	การสร้างรงควัตถุ	ไม่มี	สารสีเหลือง	ไม่มี

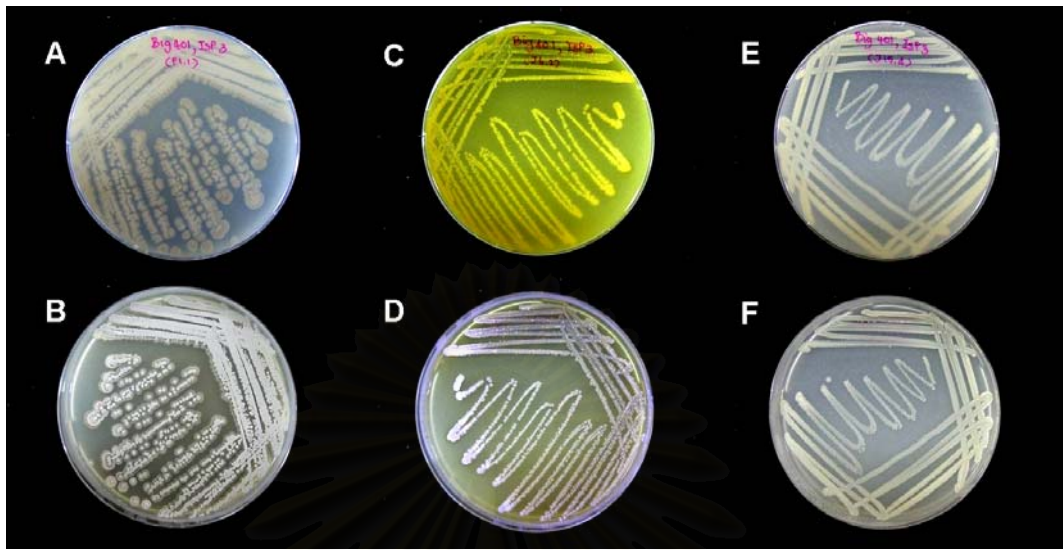
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



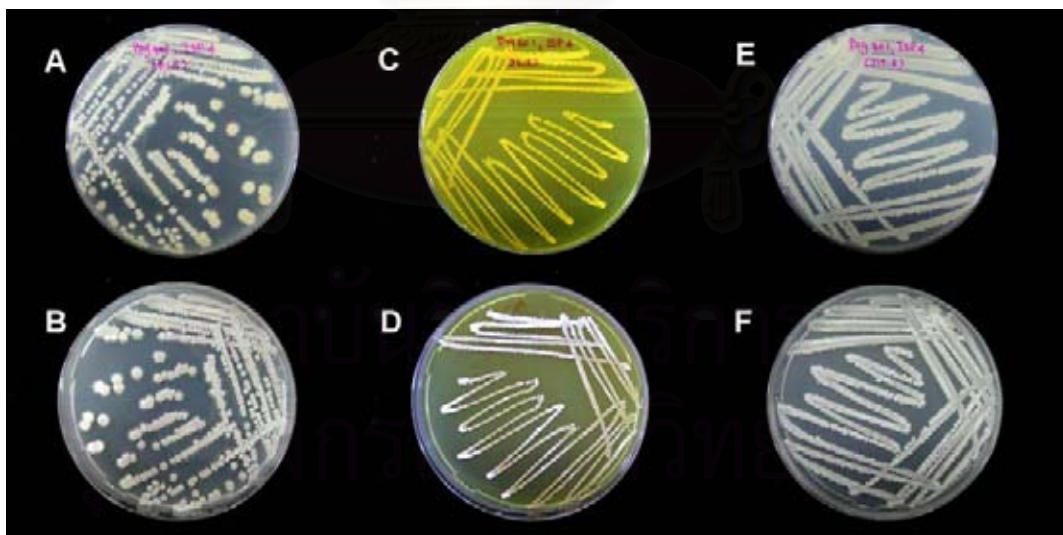
รูปที่ 4.10 ลักษณะ และสีของโคโลนีของสายใยอาหาร (A, C, E) และสายใยอากาศ (D, E, F) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 1 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 (A, B) สายพันธุ์ J6.2 (C, D) และสายพันธุ์ J15.4 (E, F)



รูปที่ 4.11 ลักษณะ และสีโคโลนีของสายใยอาหาร (A, C, E) และสายใยอากาศ (D, E, F) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 2 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 (A, B) สายพันธุ์ J6.2 (C, D) และสายพันธุ์ J15.4 (E, F)

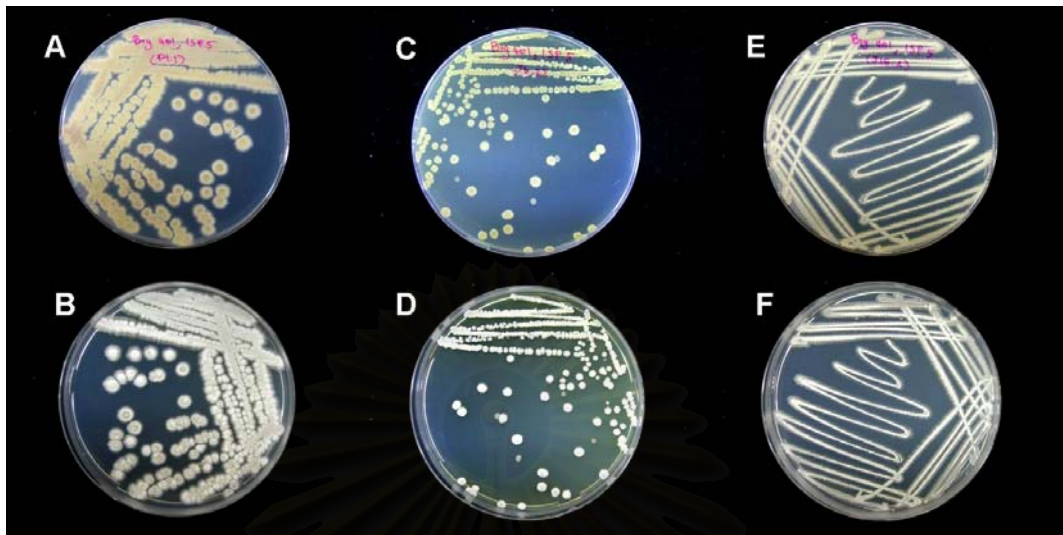


รูปที่ 4.12 ลักษณะ และสีโคโลนีของสายใยอาหาร (A, C, E) และสายใยอากาศ (D, E, F) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 3 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 (A, B) สายพันธุ์ J6.2 (C, D) และสายพันธุ์ J15.4 (E, F)

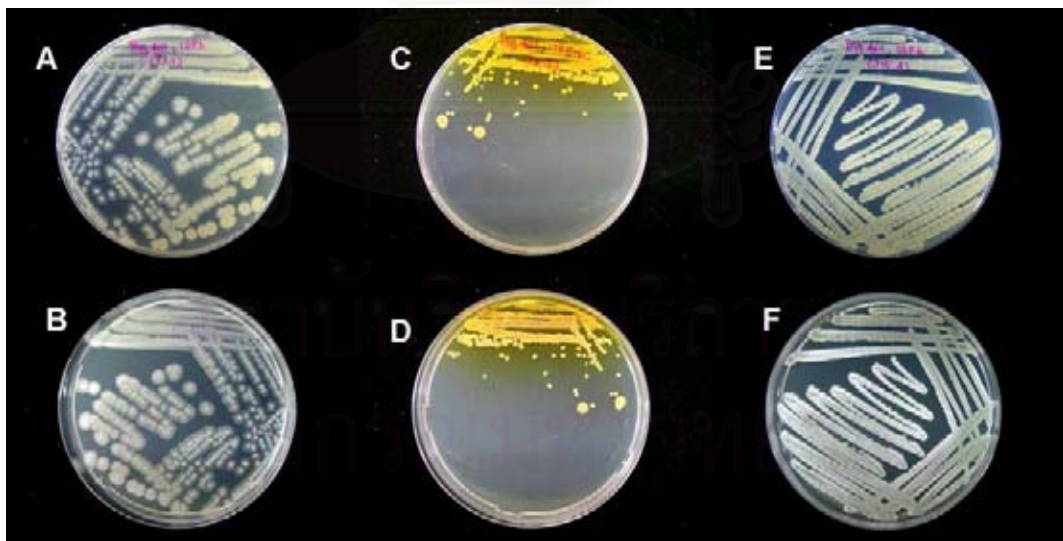


รูปที่ 4.13 ลักษณะ และสีโคโลนีของสายใยอาหาร (A, C, E) และสายใยอากาศ (D, E, F) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 4 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 (A, B) สายพันธุ์ J6.2 (C, D) และสายพันธุ์ J15.4 (E, F)





รูปที่ 4.14 ลักษณะ และสีโคโลนีของสายใยอาหาร (A, C, E) และสายใยอากาศ (D, E, F) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 5 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 (A, B) สายพันธุ์ J6.2 (C, D) และสายพันธุ์ J15.4 (E, F)



รูปที่ 4.15 ลักษณะ และสีโคโลนีของสายใยอาหาร (A, C, E) และสายใยอากาศ (D, E, F) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 6 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 (A, B) สายพันธุ์ J6.2 (C, D) และสายพันธุ์ J15.4 (E, F)

#### 4.8.3) การตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ การรีดิวส์ไนเตรท และการเจริญที่ pH 4.3

จากการนำแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 มาศึกษาการสร้างรงควัตถุเมลานิน โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP6-PYEA และ Thyrosine agar และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า เชื้อทั้งสามสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างรงควัตถุเมลานินได้ ศึกษาการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผิวเอียง ISP6-PYEA ศึกษาการรีดิวส์ไนเตรทโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrate agar และตรวจสอบการรีดิวส์ไนเตรทพบว่า ทั้งสามสายพันธุ์ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทได้ และศึกษาการเจริญที่ pH 4.3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Bennett agar ค่า pH 4.3 พบว่า สายพันธุ์ P1.1 สามารถเจริญที่ค่า pH 4.3 ได้ ในขณะที่ J6.2 และ J15.4 ไม่สามารถเจริญได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 การสร้างรงควัตถุเมลานิน การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ การรีดิวส์ไนเตรท และการเจริญที่ pH 4.3 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4

การทดสอบ	แอกติโนมัยซิสสายพันธุ์		
	P1.1	J6.2	J15.4
การสร้าง melanin	-	-	-
การสร้าง H <sub>2</sub> S	-	-	-
การย่อย nitrate	-	-	-
การเจริญที่ pH 4.3	+	-	-

#### 4.8.4) การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการนำแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 มาศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง modified Bennett agar พบว่า ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แอกติโนมัยซิสทั้งสามสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้งสามสายพันธุ์สามารถเจริญได้ และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ P1.1 สามารถเจริญได้ แต่สายพันธุ์ J6.2 และ J15.4 ไม่สามารถเจริญได้ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.12



ชุดควบคุมบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium ที่เติม Asparagine หรือ Proline ผลแสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆของ แอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4

แหล่งไนโตรเจน	การเจริญของแอคติโนมัยซิสสายพันธุ์		
	P1.1	J6.2	J15.4
Arginine	+	+	+
Histidine	+	+	+
Methionine	-	+	+
Phenylalanine	+	+	+
Potassium nitrate	+	+	+
Serine	+	+	+
Thionine	+	+	+
Valine	+	+	+

- + : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบ หรือเท่ากับชุดควบคุมบวก  
ที่ใช้ 0.1% asparagine หรือ 0.1% proline เป็นแหล่งไนโตรเจน
- : เจริญเท่ากับ หรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ  
ที่ไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจน

#### 4.8.7) การตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน

จากการนำแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Carbon utilization agar ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon utilization agar ที่ไม่ได้เติมสาร และชุดควบคุมบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium ที่เติม Glucose ผลแสดงดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆของ แอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4

แหล่งคาร์บอน	การเจริญของเชื้อ		
	P1.1	J6.2	J15.4
Arabinose	+	-	+
Dextran	+	+	+
Fructose	+	-	+
Galactose	+	+	+
<i>meso</i> - Inositol	+	+	+
Lactose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Mannose	+	-	+
Rhamnose	+	+	+
Sodium acetate	-	-	-
Sodium citrate	-	-	-
Sucrose	-	-	+
Thehalose	+	+	+
Xylose	+	-	+
Xylan	+	+	+

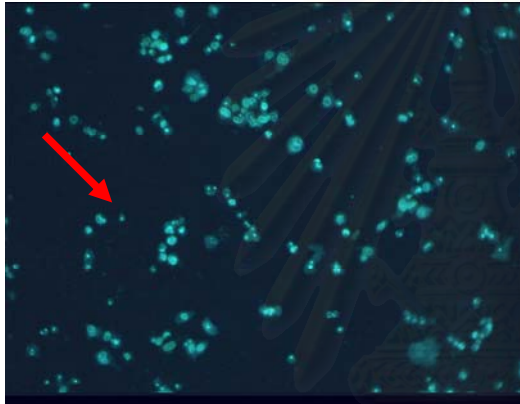
+ : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบ หรือเท่ากับชุดควบคุมบวก  
ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

- : เจริญเท่ากับ หรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ  
ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน

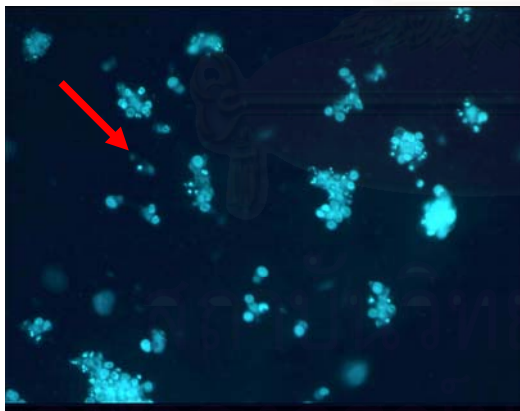
จากการตรวจสอบข้อมูลทางชีวเคมี พบว่าแอคติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces enissocaesillis* *Streptomyces parvulus* และ *Streptomyces variabilis* ตามลำดับ

4.9) การทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพ็อบโทซิสของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2

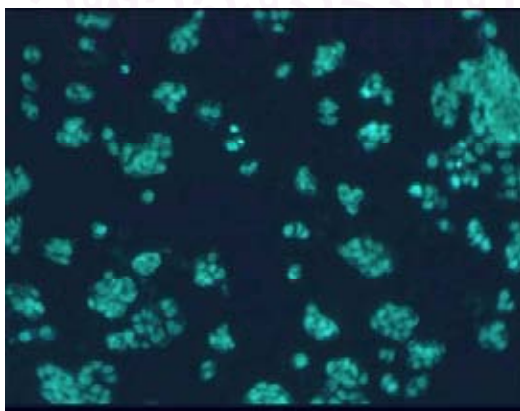
เมื่อนำสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 มาทดสอบการกระตุ้นให้เซลล์ตายแบบอะพ็อบโทซิสโดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 มีการหดตัวของเซลล์ และนิวเคลียส เหมือนกับชุดควบคุมบวก ดังแสดงในรูปที่ 4.16 – 4.18 ลูกศรสีแดง คือเซลล์ที่เกิดการอะพ็อบโทซิส แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 กระตุ้นเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ให้เกิดการตายแบบอะพ็อบโทซิส



รูปที่ 4.16 เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เกิดการอะพ็อบโทซิส เมื่อสัมผัสกับสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 ลูกศรสีแดง หมายถึงเซลล์ที่ตายแบบอะพ็อบโทซิส



รูปที่ 4.17 เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ที่เกิดการอะพ็อบโทซิส เมื่อสัมผัสกับยา SS (ชุดควบคุมบวก) ลูกศรสีแดง หมายถึงเซลล์ที่ตายแบบอะพ็อบโทซิส



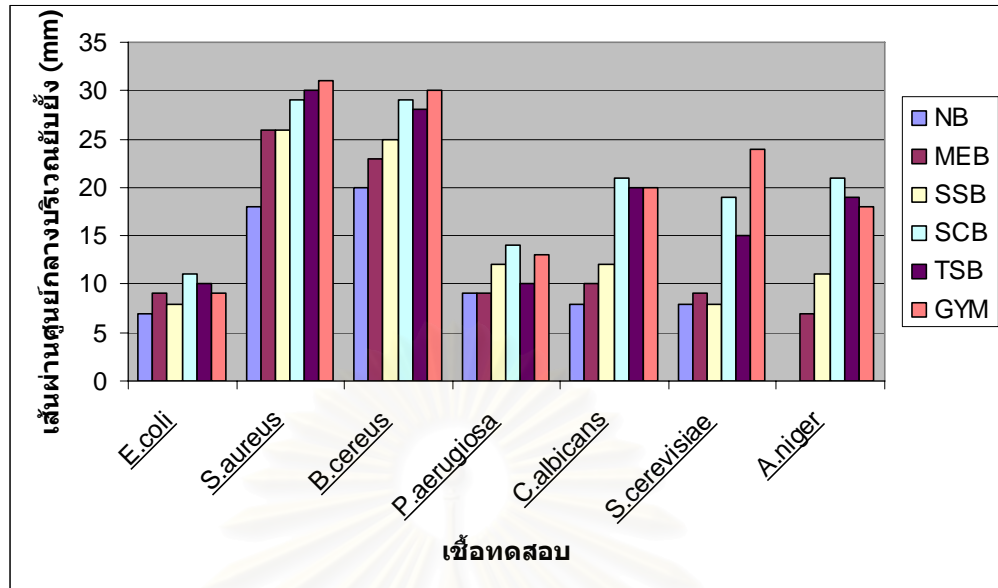
รูปที่ 4.18 เซลล์มะเร็งตับ HepG2 เมื่อสัมผัสกับ 95% เอทานอล จะที่ไม่เกิดการอะพ็อบโทซิส (ชุดควบคุมลบ)

#### 4.10) การหาอาหารที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2

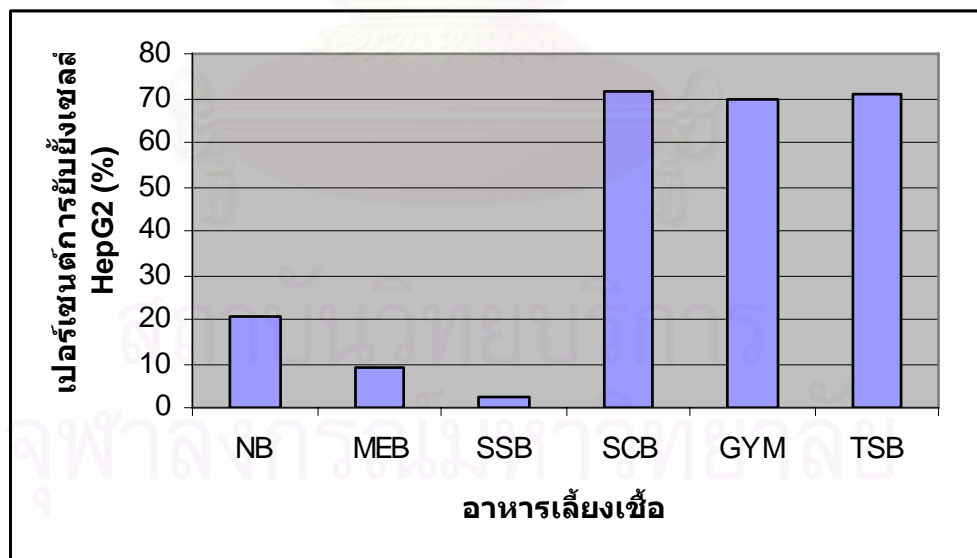
นำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดชนิดต่างๆ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยวิธี Agar well ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.19 การทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT พบว่า เมื่อเลี้ยง *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดชนิดต่างๆ ได้แก่ Nutrient Broth (NB) Malt Extract Broth (MEB) Soluble Starch Broth (SSB) Sodium Caseinate Broth (SCB) Tryptic Soy Broth (TSB) และ Glucose Yeast Malt Extract Broth (GYM) สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 20.33 9.33 2.67 71.33 70.00 และ 70.67 ตามลำดับ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.20

ตารางที่ 4.16 การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าเฉลี่ย Inhibition zone ของเชื้อทดสอบ (mm)						
	<i>E.coli</i> ATCC9027	<i>P.aeruginosa</i> ATCC25922	<i>B.cereus</i> ATCC1729	<i>S.aureus</i> ATCC25923	<i>C.albicans</i> ATCC 70014	<i>S.cerevisiae</i> TISTR 5169	<i>A.niger</i> ATCC6275
NB	7	18	20	9	8	8	-
MEB	9	26	23	9	10	9	7
SSB	8	26	25	12	12	8	11
SCB	11	29	29	14	21	19	21
TSB	10	30	28	10	20	15	19
GYM	9	31	30	13	20	24	18



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อทดสอบเมื่อเลี้ยง แอคติโนมัย-ซิสสายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ ได้แก่ Nutrient Broth (NB) Malt Extract Broth (MEB) Soluble Starch Broth (SSB) Sodium Caseinate Broth (SCB) Tryptic Soy Broth (TSB) และ Glucose Yeast Malt Extract Broth (GYM)



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ของแอคติโนมัยซิสสายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ ได้แก่ Nutrient Broth (NB) Malt Extract Broth (MEB) Soluble Starch Broth (SSB) Sodium Caseinate Broth (SCB) Tryptic Soy Broth (TSB) และ Glucose Yeast Malt Extract Broth (GYM)

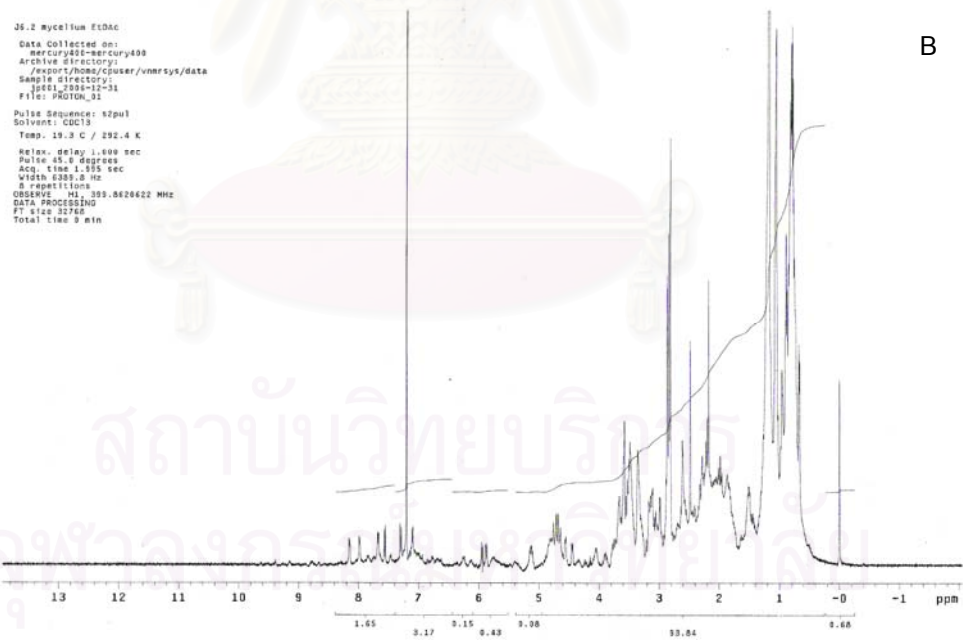
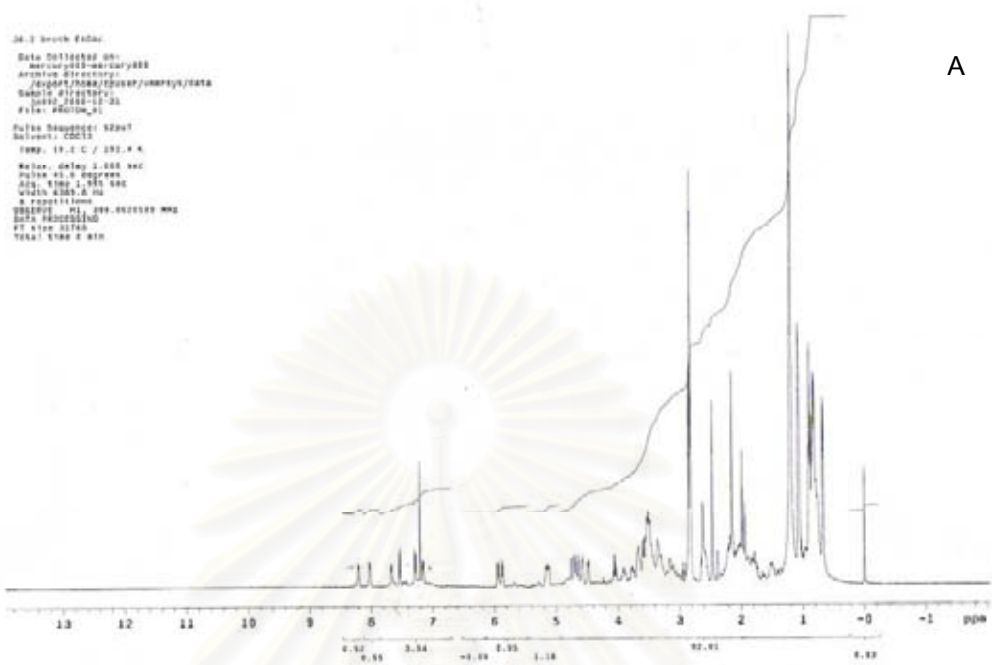


จากการทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของแอคติโนมัยซิสสายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดต่างๆ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB GYM และ TSB ทำให้แอคติโนมัยซิสสายพันธุ์ J6.2 สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูง การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบในทุกอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ทำการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB เพื่อใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจาก SCB เป็น selective media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีน้ำตาล และมีสารอาหารเชิงซ้อนต่ำ ทำให้เชื้อชนิดอื่นเจริญในอาหารนี้ได้น้อย

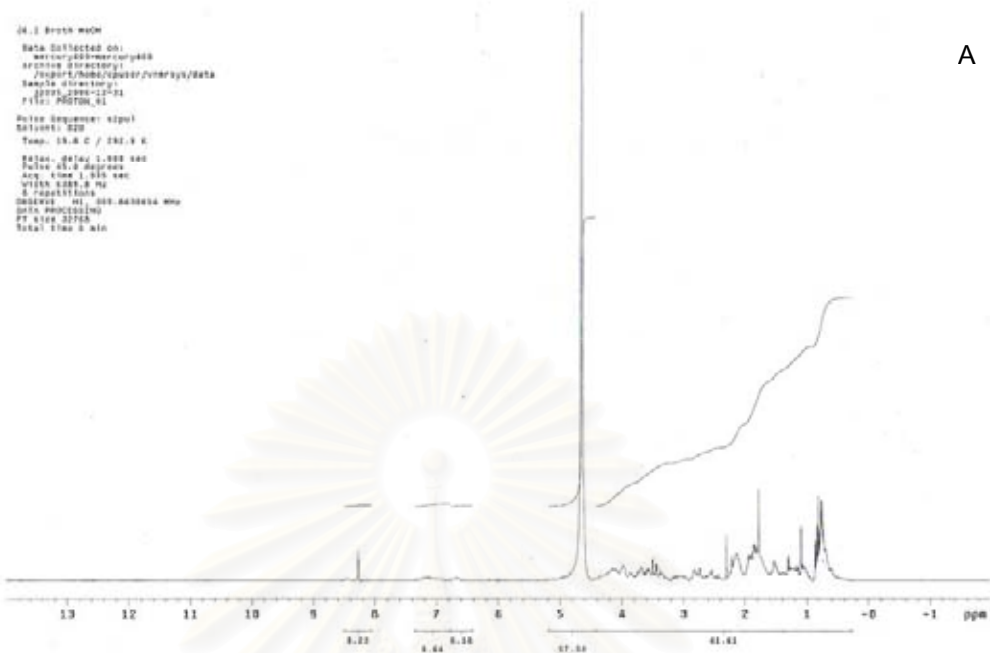
#### 4.11) การผลิต และการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการศึกษาหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสม ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 แล้ว จึงได้ทำการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SCB ปริมาตร 20 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นสกัดสารด้วยเอทิลอะซิเตต และเมทานอล จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนเส้นใย นำสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) แต่ละส่วนไปวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR ผลการวิเคราะห์ NMR แสดงเป็น NMR spectrum ดังรูปที่ 4.21 – 4.22

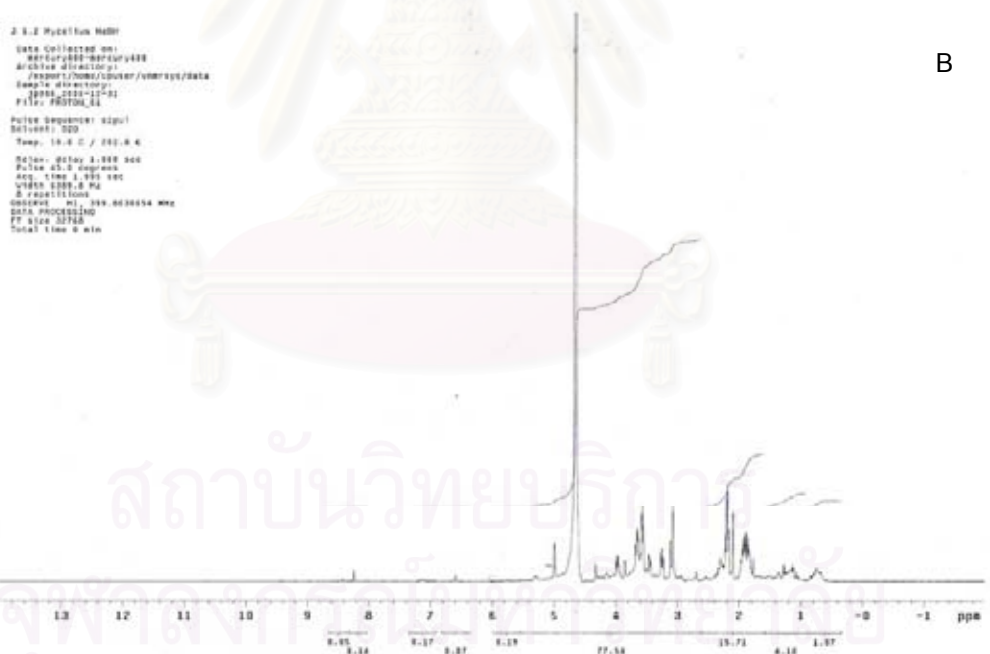
จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR พบว่าสารสกัดอย่างหยาบจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 ในตัวทำละลายเดียวกัน ทั้งในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนเส้นใย มีรูปแบบของ NMR spectrum คล้ายกัน จึงน่าจะเป็นสารเดียวกัน หรือเป็นสารในกลุ่มเดียวกัน จึงทำการรวมตัวอย่างจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนเส้นใยเข้าด้วยกัน เพื่อนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 4.21 NMR spectra ของสารสกัดส่วนเอทิลอะซิเตต จากส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) และส่วนเส้นใย (B) ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2



A



B

รูปที่ 4.22 NMR spectra ของสารสกัดส่วนเมทานอล จากส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) และส่วนเส้นใย (B) ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2

#### 4.12) การทำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้

นำสารสกัดหยาบจากส่วนเอทิลอะซิเตต ทั้งจากส่วนของเส้นใย และน้ำเลี้ยงเชื้อมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาคอลัมน์ โดยใช้เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอลในอัตราส่วนต่างๆ เป็นระบบตัวทำละลายในการชะคอลัมน์ เก็บสารที่ถูกชะออกมา (Fraction) ส่วนละ 20 มิลลิลิตร ได้สารที่แยกได้ส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 ส่วนที่แยกได้จากซิลิกาคอลัมน์ เมื่อใช้ระบบตัวทำละลายต่างๆ

ระบบตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์	ส่วนที่
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (10:90)	1-5
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (20:80)	6-10
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (30:70)	11-15
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (40:60)	16-20
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (50:50)	21-25
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (60:40)	26-30
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (70:30)	31-35
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (80:20)	36-40
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (85:15)	41-45
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (90:10)	46-50
เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (95:5)	51-57
เอทิลอะซิเตต (100%)	58-72
เมทานอล : เอทิลอะซิเตต (5:95)	73-77
เมทานอล : เอทิลอะซิเตต (10:90)	78-82
เมทานอล : เอทิลอะซิเตต (15:85)	83-86
เมทานอล : เอทิลอะซิเตต (20:80)	87-90
เมทานอล : เอทิลอะซิเตต (30:70)	91-94
เมทานอล : เอทิลอะซิเตต (40:60)	95-98
เมทานอล : เอทิลอะซิเตต (30:70)	99-102
เมทานอล : เอทิลอะซิเตต (20:80)	103-106
เมทานอล (100%)	107-200

นำส่วนต่างๆที่แยกได้มาตรวจสอบลักษณะสารองค์ประกอบด้วยวิธี TLC จากนั้นรวมส่วนที่มีลักษณะสารเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ส่วนผสมของสารที่แยกได้ 14 ส่วน ได้แก่

ส่วนผสมที่1	ส่วนที่ 1-40
ส่วนผสมที่2	ส่วนที่ 41-56
ส่วนผสมที่3	ส่วนที่ 57-58
ส่วนผสมที่4	ส่วนที่ 59-63
ส่วนผสมที่5	ส่วนที่ 64-69
ส่วนผสมที่6	ส่วนที่ 70-76
ส่วนผสมที่7	ส่วนที่ 77-80
ส่วนผสมที่8	ส่วนที่ 81-85
ส่วนผสมที่9	ส่วนที่ 86-89
ส่วนผสมที่10	ส่วนที่ 90-93
ส่วนผสมที่11	ส่วนที่ 94-96
ส่วนผสมที่12	ส่วนที่ 97-100
ส่วนผสมที่13	ส่วนที่ 101-103
ส่วนผสมที่14	ส่วนที่ 104-200

นำส่วนผสมของสารทั้ง 14 ส่วนมาตรวจสอบลักษณะสารด้วยวิธี H-NMR (ภาคผนวก จ) พบว่า ส่วนผสมที่ 4 (ส่วนที่ 59-63) เป็นส่วนที่มีลักษณะสารที่น่าสนใจ จึงนำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป และเมื่อนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC พบว่า ส่วนผสมที่ 4 มีสารองค์ประกอบอย่างน้อย 3 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก

#### 4.13) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

นำส่วนผสมของสารทั้ง 14 ส่วน มาตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ตามวิธีข้อ 3.14 พบว่า ส่วนผสมของสารบางส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบต่างกัน ส่วนผสมที่ 3 6 7 10 11 และ 12 ของสารที่แยกได้จากสารสกัดเหยาบเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์การยับยั้ง *Bacillus cereus* ส่วนผสมที่ 3 4 5 6 7 10 11 12 13 และ 14 มีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และส่วนผสมที่ 3 และ 4 มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ดังแสดงในตารางที่ 4.19 และส่วนผสมที่ 1 2 9 และ 10 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.18 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อใช้ส่วนผสมของสารที่แยกได้ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่างๆ

ส่วนผสมของสาร	จุลินทรีย์ทดสอบ					
	<i>E.coli</i> ATCC9027	<i>P.aeruginosa</i> ATCC25922	<i>B.cereus</i> ATCC1729	<i>S.aureus</i> ATCC25923	<i>C.albicans</i> ATCC 70014	<i>S.cerevisiae</i> TISTR 5169
positive	0.13	0.11	0.12	0.18	0.24	0.26
negative	0.34	0.57	0.81	1.21	0.59	0.43
1	0.57	0.22	1.04	0.88	0.50	0.84
2	0.21	0.37	0.99	0.66	0.51	0.39
3	<b>0.09</b>	<b>0.11</b>	0.65	<b>0.29</b>	0.48	0.42
4	0.26	<b>0.13</b>	0.81	<b>0.42</b>	0.54	0.44
5	0.44	<b>0.12</b>	0.76	0.66	0.59	0.41
6	<b>0.09</b>	<b>0.11</b>	0.76	0.82	0.64	0.31
7	<b>0.09</b>	<b>0.10</b>	0.69	1.05	0.70	0.37
8	0.20	0.24	0.89	0.88	0.62	0.69
9	0.20	0.20	0.99	0.87	0.49	0.48
10	<b>0.17</b>	<b>0.14</b>	0.96	0.71	0.48	0.51
11	<b>0.15</b>	<b>0.13</b>	0.93	0.74	0.43	0.45
12	<b>0.13</b>	<b>0.10</b>	0.90	0.64	0.50	0.44
13	0.23	<b>0.10</b>	0.93	0.71	0.57	0.48
14	0.58	<b>0.17</b>	0.89	1.04	0.76	0.66

หมายเหตุ: - ตัวพิมพ์หนา คือ ส่วนที่มีการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

- ใช้ Streptomycin เป็นชุดควบคุมบวกสำหรับแบคทีเรีย

- ใช้ Nystatin เป็นชุดควบคุมบวกสำหรับยีสต์

- ใช้ 95% เอทานอลเป็นชุดควบคุมลบ

ตารางที่ 4.19 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เมื่อทดสอบด้วยส่วนผสมของสารที่แยกได้

ส่วนผสมของสารที่แยกได้	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง (%)
ไม่มีเซลล์ (ชุดควบคุมบวก)	100
95% เอทานอล (ชุดควบคุมลบ)	0
1	70.69
2	78.67
3	-47.42
4	-0.74
5	6.55
6	11.60
7	1.41
8	56.67
9	92.22
10	86.77
11	29.53
12	64.01
13	61.59
14	48.02

หมายเหตุ: ตัวพิมพ์หนา คือ ส่วนที่มีการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2

ส่วนผสมที่ 4 (ส่วนที่ 59 – 63) ของสารที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ เป็นส่วนที่มีลักษณะโมเลกุลที่น่าสนใจ จึงนำมาตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ เพื่อหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) พบว่าส่วนผสมที่ 4 มีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 25 และ 5 ppm ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Saccharomyces cerevisiae* ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 200 ppm และไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 200 ppm

## บทที่ 5

### สรุป และอภิปรายผลการทดลอง

จากการแยกแอกติโนมัยซิสจากตัวอย่างดิน และทรายบริเวณชายหาด และป่าชายเลนใน 4 จังหวัด คือ จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง และเพชรบุรี จำนวนทั้งสิ้น 34 ตัวอย่าง สามารถแยกแอกติโนมัยซิสได้ทั้งหมด 77 สายพันธุ์ เมื่อนำแอกติโนมัยซิสที่แยกได้มาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ด้วยวิธี Agar cross streak สามารถจัดกลุ่มฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซิสได้เป็น 7 กลุ่ม คือ ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ยับยั้งเฉพาะยีสต์ ยับยั้งยีสต์ และรา ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และยีสต์ ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และรา ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และรา และ ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ และรา จำนวน 1 3 3 1 1 6 และ 6 สายพันธุ์ตามลำดับ

เมื่อนำแอกติโนมัยซิสที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และสกัดสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่เชื้อสร้างขึ้นมาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ด้วยวิธี MTT พบว่าแอกติโนมัยซิสที่แยกได้ส่วนใหญ่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แตกต่างกัน ทั้งนี้มีสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งแบบจำเพาะเจาะจง ได้แก่ ยับยั้งมะเร็งตับ, มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ใหญ่ จำนวน 5 3 และ 1 สายพันธุ์ตามลำดับ

สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้แบบ broad spectrum และสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งแบบจำเพาะเจาะจงเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจในการพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะ และยารักษาโรคมะเร็ง จึงได้คัดเลือกแอกติโนมัยซิส 3 สายพันธุ์ ได้แก่ P1.1 J6.2 และ J15.4 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี และยีนประมวลรหัส 16s rRNA เพื่อจำแนกชนิดของสายพันธุ์เหล่านี้

จากการวิเคราะห์ยีนประมวลรหัส 16s rRNA ของแอกติโนมัยซิสสายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 ด้วยวิธีพีซีอาร์ ออก primer โดยอ้างอิงจาก Rintala และคณะ (2001) และ Lanoot และคณะ (2005) ได้ยีนของแอกติโนมัยซิสสายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 ขนาด 1,124 1,401 และ 1,105 bp ตามลำดับ ส่งตัวอย่างยีน และ primer ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนประมวลรหัส 16s rRNA ที่สำนักงานวิจัยคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี เมื่อนำลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลจากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> พบว่าลำดับเบสของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2 มีความคล้ายกับยีนประมวลรหัส 16s rRNA ของ *Streptomyces parvulus* โดยมีความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100% สำหรับสายพันธุ์ P1.1 และ J15.4 มีความคล้ายกับ *Streptomyces* sp. หลายชนิด ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดที่แน่นอน



ของแอกติโนมัยซิสสองสายพันธุ์นี้ได้โดยใช้ข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์เพียงอย่างเดียว จึงได้มีการศึกษาสมบัติทางชีวเคมี และสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซิสทั้งสามสายพันธุ์นี้ ดังสรุปในตารางที่ 5.1

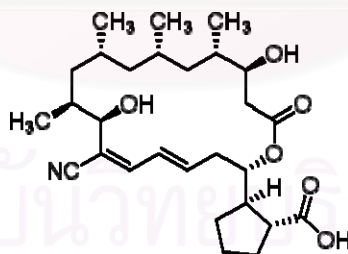
ตารางที่ 5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และการเจริญที่พีเอช 4.3 ของแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4

ลักษณะ	สายพันธุ์ P1.1	สายพันธุ์ J6.2	สายพันธุ์ J15.4
<u>สัณฐานวิทยา และสรีระวิทยา</u>			
สีของสายใยอากาศ	ขาว	ขาว	ขาว
สีสปอร์	เทา	เทา	เทา
รูปร่างสปอร์	กลม ผิวเรียบ	กลม ผิวเรียบ	กลม มีหนาม
ลักษณะสายสปอร์	เกลียว (Spira)	เกลียว (Spira)	เกลียว (Spira)
การสร้างเมลานิน	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
การสร้างรงควัตถุ	ไม่สร้าง	สร้างสารสีเหลือง	ไม่สร้าง
การรีดิวส์ไนเตรท	-	-	-
การสร้างก๊าซ H <sub>2</sub> S	-	-	-
<u>การย่อยสลาย</u>			
อะดีนีน	-	+	-
ไทโรซีน	-	-	-
แซนทีน	+	-	-
เคซีน	+	+	-
เจลาติน	-	+	+
แป้ง	+	+	+
<u>การเจริญที่อุณหภูมิ (°C)</u>			
4	-	-	-
10	+	+	+
30	+	+	+
37	+	-	-
45	-	-	-
<u>การเจริญที่พีเอช 4.3</u>	+	-	-

จากการตรวจสอบข้อมูลทางชีวเคมี พบว่าแอกติโนมัซซิส สายพันธุ์ P1.1 J6.2 และ J15.4 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces enissocaesillis* *Streptomyces parvulus* และ *Streptomyces variabilis* ตามลำดับ และได้มีการนำ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 มาใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แบบ board spectrum และมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับแบบจำเพาะเจาะจง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจ เนื่องจากในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ค้นพบสารยับยั้งเซลล์มะเร็งตับไม่มากนัก นอกจากนี้ จากการศึกษากลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งพบว่า สารสกัดจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 ทำให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพ็อทโทซิส

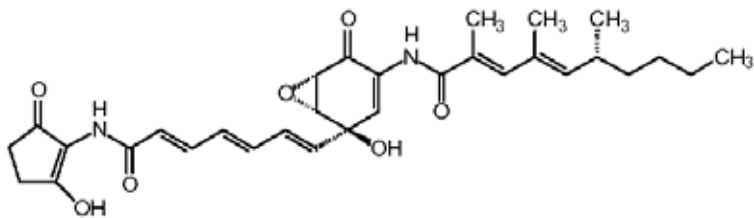
ได้มีรายงานการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดจาก *Streptomyces parvulus* ทั้งสารปฏิชีวนะ สารออกฤทธิ์ยับยั้งไวรัส มาลาเรีย และเซลล์มะเร็ง ซึ่งในปัจจุบัน สารออกฤทธิ์บางตัวได้มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และขายเชิงพาณิชย์แล้ว เช่น actinomycin D ของบริษัท Sigma และ manumycin A ของบริษัท Calbiochem และบริษัท Sigma เป็นต้น Kleeff และคณะ (2000) ได้รายงานการออกฤทธิ์ในการกระตุ้นอะพ็อทโทซิส ของ actinomycin D อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับอ่อนได้

Kawamura และคณะ (2003) พบว่า borrelidin ซึ่งสร้างจาก *Streptomyces parvulus* เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการขยายตัวของหลอดเลือด ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเยื่อปอด และกระตุ้นการตายแบบอะพ็อทโทซิสของเซลล์มะเร็ง โดยใช้กลไกการยับยั้งเอนไซม์ threonyl-tRNA synthetase โครงสร้างโมเลกุลของ borrelidin แสดงดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 โครงสร้างโมเลกุลของ borrelidin

Kainuma และคณะ (1997) พบว่า manumycin ซึ่งเป็นสารที่สร้างจาก *Streptomyces parvulus* เป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตับอ่อน 4 ชนิด คือ SUIT-2 MIAPaCa-2 AsPC-1 BxPC-3 โดยมีกลไกการทำงานคือ ยับยั้งเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดมะเร็งแบบแข่งขัน โครงสร้างโมเลกุลของ manumycin แสดงดังรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 โครงสร้างโมเลกุลของ manumycin

Inbar และ Lapidot (1988) พบสาร Tetrahydropyrimidine A [ THP(A); 2-methyl, 4-carbonyl, 5-hydroxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidine] และ Tetrahydropyrimidine B [ THP(B); 2-methyl, 4-carbonyl-3,4,5,6-tetrahydropyrimidine] จาก *Streptomyces parvulus*

การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดย *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ J6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 6 ชนิด คือ Nutrient Broth (NB) Malt Extract Broth (MEB) Soluble Starch Broth (SSB) Sodium Caseinate Broth (SCB) Glucose Yeast Extract Broth (GYM) และ Tryptic Soy Broth (TSB) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB, GYM และ TSB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้สูง

ในปี 1976 Williams และ Katz ได้พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (synthetic media) สำหรับผลิต actinomycin D ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการอะพ็อบโทซิส และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับอ่อน (Kleeff และคณะ, 2000) จาก *Streptomyces parvulus* ประกอบด้วย D-fructose L-glutamic acid L-histidine  $K_2HPO_4$   $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$   $CuCl_2 \cdot 2H_2O$   $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  และ  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  สามารถผลิต actinomycin D จาก *Streptomyces parvulus* ได้สูง (500 ถึง 600  $\mu g/ml$ ) และพบว่าปริมาณสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ที่เหมาะสม คือ 41.7 สามารถผลิตสารได้ปริมาณมากที่สุด (Williams และ Katz, 1976) ต่อมาในปี 2001 Sousa และคณะ ได้พัฒนาสูตรอาหารต่อจาก Williams และ Katz พบว่า *Streptomyces parvulus* สายพันธุ์ DAUFPE3124 สามารถผลิต actinomycin D ได้สูงขึ้น 200 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อาหารที่ประกอบด้วย 20g/l D(+)-fructose 3.57g/l L(-)-threonine 1.0g/l  $K_2HPO_4$  25mg/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  25mg/l  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  25mg/l  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  และ 25mg/l  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (Sousa และคณะ, 2001)

จากสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ แยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกา คอลัมน์โครมาโตกราฟี และทดสอบฤทธิ์ของสารที่แยกได้พบว่า สารที่ได้จากการแยกยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* อีกทั้งสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง HepG2 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ ทั้งนี้ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า สาร

สกัดหายาบสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบสามชนิดนี้ได้ ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้สูญเสียไปบางส่วน อาจมีสาเหตุเนื่องมาจาก กลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางอย่างนั้น จำเป็นต้องอาศัยสารหลายชนิดในการออกฤทธิ์ ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์จะไม่สามารถทำได้ เนื่องจากลักษณะของสารองค์ประกอบที่มีโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก แต่จากการตรวจสอบลักษณะของสารด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี พบว่า สารที่สกัดได้จาก *Streptomyces parvulus* สายพันธุ์ J6.2 นั้น มีส่วนประกอบของสารในกลุ่ม อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน

งานวิจัยนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์ คือ สามารถแยกแอกติโนมายซีสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ และเซลล์มะเร็งได้ ได้จัดจำแนกสกุล และชนิดของแอกติโนมายซีสที่แยกได้ ผลิต สกัด แยกสารให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบลักษณะของสารที่แยกได้

### ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. บริเวณชายหาด และป่าชายเลน เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จึงเป็นบริเวณที่น่าสนใจในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ร่วมกับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ
2. ตัวอย่างอื่นๆ นอกจากดิน และทราย ในบริเวณชายหาด และป่าชายเลน เช่น รากพืช ใบพืช และสัตว์ทะเล มีความน่าสนใจในการค้นหาแอกติโนมายซีส สายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นกัน
3. ปัจจัยในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีหลายประการ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ การให้อากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าปัจจัยที่จะทำให้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ปริมาณมาก จะช่วยให้การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากพอในการใช้วิเคราะห์ทางเคมี
4. เมื่อแยกสารเพื่อทำสารให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบลักษณะสารเบื้องต้นแล้ว ควรทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารแต่ละส่วนที่แยกได้ด้วย เนื่องจากฤทธิ์ของสารอาจจะสูญเสียไปในระหว่างขั้นตอนการสกัด หรือการทำสารให้บริสุทธิ์ ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดได้จะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสารหลายชนิด ที่เป็นองค์ประกอบในสารที่สกัดได้ ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในระหว่างขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์จะสามารถทำให้ทราบถึงการทำงานเบื้องต้นของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
5. ในส่วนสารสกัดจากเมทานอล เป็นส่วนที่มีปริมาณสารมาก แม้ว่าจะมีรูปแบบของข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ไม่ซับซ้อน และไม่น่าสนใจ แต่ก็ยังเป็นโอกาสในการทำสารให้บริสุทธิ์ได้ง่าย จึงควรนำมาศึกษา และวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- นางลักษณะณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป พิมพ์ครั้งที่ 3 กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ยวดี มหาศักดิ์สิริ. 2546. การแยกแอสโคดิโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินรังกปลวกในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์หลักสูตรจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ภาษาอังกฤษ

- Ben Ameer Mehdi, R., Sioud, S., Fourati Ben Fguira, F., Bejar, S. and Mellouli L. 2006. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. Process Biochemistry 41: 1506-1513.
- Benimeli, C.S., Castro, G.R., Chaile, A.P. and Amoroso, M.J. 2007. Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. strain M7. International Biodeterioration & Biodegradation 59: 148 – 155.
- Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabou, N. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg10 isolated from a Saharan soil. Microbiological Research 161: 288 – 298.
- Burkhard H. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. DDI. 8: 536-544.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S. 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiology Letters 247: 147-152.
- Castillo, M.A., Felis, N., Aragón, P., Cuesta, G. and Sabater, C. 2006. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. International Biodeterioration and Biodegradation 58: 196- 202.
- Chater, F.K., Takano, E. and Ryding, J.N. 1997. In : The society for actinomycetes Japan. Atlas of actinomycetes. Asakura Publishing, Japan.

- Connell, N. D. 2001. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. Current Opinion in Biotechnology 12: 446- 449.
- Cross, T. 1994. The actinomycetes In: Holt, G.J., Krieg, R.N., Sneath, H.A.P., Staley, T.J. and Williams, T.S. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins. U.S.A
- Cross, T. and Goodfellow, M. 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. London: Academic Press.
- David, G.H.G. 1959. The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition. J Gen Microbiol. 21: 612 – 621.
- Dermain, A.J. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 52: 455 – 463.
- Edwards, D.I. 1980. Antimicrobial drug action. The Macmillan Press LTD, Hong Kong.
- El-Tarabily, A. K. and Sivasithamparam, K. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biology and Biochemistry 38: 1505- 1520.
- Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S., Ameer-Mehdi, R., Mellouli, L. and Laatsch, H. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Research in Microbiology 156: 341 – 347.
- Georgopapadakou, H.N. 1995. Drug transport in antimicrobial and anticancer chemotherapy. Marcel Dekkel, Inc. U.S.A.
- Gorajana, A., Venkatesan, M., Vinjamuri, S., Kurada, V.V.S.N.B., Sujatha P., Jangam, P., Poluri, E. and Zeeck, A. 2006. Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN<sub>1</sub>/7. Microbiological Research (In press)
- Goshev, I., Gousterova, A., Vasileva-Tonkova, E. and Nedkov, P. 2005. Characterization of the enzyme complexes produced by two newly isolated thermophilic actinomycete strains during growth on collagen-rich materials. Process Biochemistry 40: 1627 – 1631.

- Grigorevski-Lima, A.L., Silva-Filho, R.G., Linhares, L.F. and Coelho, R.R.R. 2006. Occurrence of actinomycetes in indoor air in Rio de Janeiro, Brazil. Building and Environment 41: 1540 – 1543.
- Gryndler, M., Jansa, J., Hrselova, H., Chvatalova, I. and Vosatka, M. 2003. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. Appl soil Eco. 22: 283 – 287.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43: 895 – 914.
- Hardt, H.I., Jensen, R.P. and Fenical, W. 2000. Neomarinone, and new cytotoxic marinone derivatives, produced by a marine filamentous bacterium (actinomycetales). Tetrahedron Letters 41: 2073 – 2076.
- Hayakawa, M., Momose, Y. and Nonomura, H. 1996. A method for the selective isolation of *Microtetraspora giauca* and related four-spored actinomycetes from soil. J Appl Bacteriol. 80: 375 – 386.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Shealth, P.H.A., Staley, J.T. and William, H.J. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins. U.S.A.
- Ignacio, G., Angel, A., Annaliesa, A. and Olga, G. 2005. **Actinomycetes** isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiology Ecology 54: 401-415.
- Igarashi, Y. 2003. Secondary metabolites of endophytic actinomycetes. The international society for the biology of Actinomycetes 13<sup>th</sup> symposium and world federation of culture collections. Technical report 8:34.
- Igarashi, Y., Trujillo, E.M., Martinez-Molina, E., Yanase, S., Miyanaga, S., Obata, T., Sakurai, H., Saiki, I., Fujita, T. and Furumai, T. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupine* sp. nov. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 17: 3702 – 3705.
- Inbar, L. and Lapidot, A. 1988. The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. The Journal of Biological Chemistry 263: 16014 – 16022.

- Kainuma, O., Asano, T., Hasegawa, M., Kenmochi, T., Nakagohri, T., Tokoro, Y. and Isono, K. 1997. Inhibition of growth and invasive activity of human pancreatic cancer cells by a farnesyltransferase inhibitor, manumycin. Pancreas 4: 379-383.
- Kawamura, T., Liu, D., Towle, M.J., Kageyama, R., Tsukahara, N., Wakabayashi, T. and Littlefield, B.A. 2003. Anti-angiogenesis effects of borrelidin are mediated through distinct pathways: threonyl-tRNA synthetase and caspases are independently involved in suppression of proliferation and induction of apoptosis in endothelial cells. J Antibiot. 8: 709 – 715.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. And Hopwood, D. P. 2002. Practical Streptomyces Genetics. John Innes Foundation, Norwich.
- Kleeff, J., Kronmann, M., Sawhney, H. and Korc, M. 2000. Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. Int J Cancer. 3: 339 – 407.
- Kurtboke, I.D., Chen, C.F. and Williams, S.T. 1992. Use of polyvalent phage for reduction of streptomycetes on soil dilution plates. Journal of Applied Bacteriology 72: 103 – 111.
- Lam, S.K. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Current Opinion on Microbiology 9: 245 – 251.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, C. M., Dawyndt, P., Liu, Z., Huang, Y. and Swings, J. 2005. Grouping of streptomycetes using 16S- ITS RFLP fingerprinting. Research in Microbiology 156: 755- 762.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek 78: 399 – 405.
- Lee, J. Y. and Hwang. B. K. 2002. Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol. 48: 407-417.
- Mayer, M.S.A. and Gustafson, R.K. 2006. Marine Pharmacology in 2003–2004: Anti-tumour and cytotoxic compounds. European Journals of Cancer 42: 2241-2270.
- Michel, K.H. and Yao, R.C. 1994. New *Streptosporangium carneum* cultures-used for producing antibiotic A84575 cpds. used for treating bacterial infections in mammals. US patent 5 : 286, 648.



- Oliveira, R.S., Castro, P.M.L., Dodd, J.C. and Vosátka, M. 2005. Synergistic effect of *Glomus intraradices* and *Frankia* spp. on the growth and stress recovery of *Alnus glutinosa* in an alkaline anthropogenic sediment. Chemosphere 60: 1462-1470.
- Palaga, T., Kataoka, T., Woo, J.T. and Nagai, K. 1996. Suppression of apoptotic cell death of IL-3-dependent cell line by ER/ SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors upon IL-3 deprivation. Exp.Cell. Res. 228: 92-97.
- Pettit, R.G., Tan, R., Melody, N., Kieilty, M.J., Pettit, K.R., Herald, L.D., Tucker, E.B., Mallavia, P.L., Doubek, L.D. and Schmidt, M.J. 1999. Antineoplastic agents part 409: Isolation and structure montanastatin from a terrestrial actinomycete. Bioorganic & Medicinal Chemistry 7: 895 – 899.
- Rintala, H., Nevalainen, A., Rönkä, E. and Suutari, M. 2001. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. Molecular and Cellular Probes 15: 337- 347.
- Selvin, J., Joseph, S., Asha, K.R.T., Manjusha, W.A., Sangeetha, V.S., Jayaseema. D.M., Antony, M.C. and Vinitha, D. 2004. Antibacterial potential of antagonistic *Streptomyces* sp. isolated from marine sponge *Dendrilla nigra*. FEMS Microbiology Ecology 50: 117 – 122.
- Sharma, D.A., Kainth, S. and Gill, K.P. 2006. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. Journal of Food Engineering 77: 486 – 491.
- Shih, H. D., Lui, Y. C., Hsu, F. L., Mulabagal, V., Dodda, R. and Hauang, J. W. 2003. Fungichomin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizotonia solani*. J. Agri. Food. Chem. 51: 95-99.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340.
- Sneader, W. 2005. Drug discovery a history. John Willey and Sons, LTD. UK.
- Sousa, M.F.V.Q., Lopes, C.E. and Junior, N.P. 2001. A chemically define medium for production of actinomycin D by *Streptomyces parvulus*. Brazilian Archives of Biology and Technology 44: 227 – 231.

- Sponga, F., Cavaletti, L., Lazzarini, A., Borghi, A., Ciciliato, I., Losi, D. and Marinelli, F. 1999. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. Journal of Biotechnology 70: 65-69.
- Stamford, T.L.M., Stamford, N.P., Coelho, L.C.B.B. and Araújo J.M. 2002. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. Bioresource Technology 83: 105–109.
- Sujatha, P., Bapi Raju, K.V.V.S.N., Ramana, T. 2004. Studies on a new marine streptomycete BT -408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiological Research 160:119-126.
- Sykes, G. and Skinner, F.A. 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical importance. Academic Press, New York.
- Tanawan, K., Pornchai, O., Weena, J., Monraudee, C. and Surat, L. 2005. Antiproliferative activities of three Thai medicinal plants on human cancer cells. Siriraj Med J. 57: 491 – 495.
- The Society for actinomycetes Japan. 1997. Atlas of actinomycetes. Askura Publishing Co., LTD. Japan.
- Tresner, D.H. and Danga, F. 1958. Hydrogen sulfide production by *Streptomyces* as a criterion for species differentiation. Journal of Bacteriology 76: 239 – 244.
- Vobis, G. 1997. Morphology of actinomycetes. In : The society for actinomycetes Japan. Atlas of actinomycetes. Asakura Publishing, Japan.
- Waksman, S.A. and Woodruff, H.B. 1940. Bacteriostatic and Bactericidal substances produced by a soil actinoyces. J Bacteriol. 40: 609.
- Williams, K.W. and Katz, E. 1977. Development of a chemically define medium for the synthesis of actinomycen D by *Streptomyces parvulus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 11: 281 – 290.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Huang, Y. and Yuen, K. 2006. Genomic evidence for antibiotic resistance gene of actinomycetes as origins of antibiotic resistance gene in pathogenic bacteria simply because actinomycetes are more ancestral than pathogenic bacteria. Medical Hypotheses 67: 1297- 1304.
- Xu, L.H., Li, Q.R. and Hang, C.L. 1996. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. Appl Environ Microbiol. 62: 244 – 248.

Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H. and Su, W. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. FEMS Microbiology Letters 188: 87 – 91.

Zhou, Z., Miwa, M. and Hogetsu, T. 1999. Analysis of genetics structure of a *Suilus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New Phytol. 144: 55 – 63.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหาร สารเคมี และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. Starch Casein Agar

Starch	10	กรัม
Casein (vitamin free)	0.3	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
KNO <sub>3</sub>	2	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
NaCl	2	กรัม
Agar	18	กรัม
Water	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 – 7.2 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

เติม cyclohexamide และ nystatin อย่างละ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองینگฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิ 50 °C

#### 2. Mueller-Hinton agar

Beef extract	2.0	กรัม
Acid casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.3 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 3. Sabouraud Agar

Bacto peptone	10.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.6 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 4. Sabouraud Broth

Bacto peptone	10.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 5.6 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 5. PDA (Potato dextrose agar)

Potato	200.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 6. TSA (Tryptic Soy Agar)

Bacto tryptone	17.0	กรัม
Bacto soytone	3.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 7. TSB (Tryptic Soy Broth)

Bacto tryptone	17.0	กรัม
Bacto soytone	3.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
$K_2HPO_4$	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 8. Manitol Mungbean

ถั่วเขียวบด	20.0	กรัม
น้ำประปา	500	มิลลิลิตร
ต้มจนเดือด (10-15 นาที)		
D-manitol	20.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water (เติมน้ำอีก 500 ml)	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 9. SCA (Sodium Caseinate Agar)

Sodium Caseinate	2.0	กรัม
$K_2HPO_4$	0.5	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$FeCl_3$	0.01	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 10. SCB (Sodium Caseinate Broth)

Sodium Caseinate	2.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.2	กรัม
FeCl <sub>3</sub>	0.01	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 11. NA (Nutrient Agar)

Beef extract	1.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 12. NB (Nutrient Broth)

Beef extract	1.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 13. MEA (Malt Extract Agar)

Malt extract	2.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 14. MEB (Malt Extract Broth)

Malt extract	2.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 15. SSA (Soluble Starch Agar)

Soluble Starch	10.0	กรัม
Glycerol	10.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 16. SSB (Soluble Starch Broth)

Soluble Starch	10.0	กรัม
Glycerol	10.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 17. GYM (Glucose Yeast Malt Extract)

Glucose	4.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Calcium carbonate	2.0	กรัม



Water 1,000 มิลลิลิตร  
ปรับ pH เป็น 7.2 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

#### 18. Tryptone Yeast Extract Agar (ISP1)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast Extract	3.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

#### 19. Yeast Malt Extract Agar (ISP2)

Malt extract	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

#### 20. Oat Meal Agar (ISP3)

ข้าวโอ๊ต (oat meal)	20	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 30)
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ต้มข้าวโอ๊ตในน้ำกลั่นประมาณ 20 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงไป  
อาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เติม Trace salts solution ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่  
อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

#### 21. Inorganic Salts Starch Agar (ISP4)

Soluble starch	10.0	กรัม
$K_2HPO_4$	1.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0	กรัม

NaCl	1.0	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	กรัม
$\text{CaCO}_3$	2.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 30)
Agar	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.2 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

#### 22. Glycerol Asparagine Agar (ISP5)

Glycerol	10.0	กรัม
L- Asparagine	1.0	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 30)
Agar	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.2 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

#### 23. Peptone Yeast Extract Iron Agar (ISP6)

Bacto peptone	15.0	กรัม
Proteose peptone	5.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.0	กรัม
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0.08	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 24. Nitrate Agar

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
KNO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 25. Tyrosine Agar

Glycerol	15.0	กรัม
L- Tyrosine	0.5	กรัม
L- Asparagine	1.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 30)
Agar	20.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.2 – 7.4 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

## 26. Modified Bennett's Agar

Beef extract	1.0	กรัม
Glycerol	10.0	กรัม
Bacto peptone	2.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.3 ینگ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

## 27. Bennett's Agar

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Bacto peptone	2.0	กรัม
Beef extract	1.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน

## 28. Basal Medium Agar

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

## 29. Carbon Utilization Agar

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.64	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.38	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 31)
Agar	12.0	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ینگฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

## 30. Trace Salts Solution

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
$\text{MnCl}_2$	0.1	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เดิมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส

## 31. Pridham and Gottlieb trace salts solution

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.64	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.11	กรัม
$\text{MnCl}_2$	0.79	กรัม
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เดิมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส

## 32. 0.5 McFarland Standard

$\text{BaCl}_2$	0.048	M	ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
$\text{H}_2\text{SO}_4$	0.36	M	ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร

อ่านค่าความทึดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.08 – 0.10

## 33. Vanillin solution

Vanillin	4.5	กรัม
95% ethanol	95	มิลลิลิตร
Sulfuric acid	0.5	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องในขวดสีชา

## ภาคผนวก ข

## อาหาร สารเคมี และวิธีเตรียมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

## 1. RPMI1640 (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ผงสำเร็จรูป	10.4	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 ด้วย 1N HCl ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านหัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมครอนเมตร ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขนาด 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพันพาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 2. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่มี 10 % Fetal bovine serum (working medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (stock reagent)	90	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	10	มิลลิลิตร
Gentamycin (100 mg/ml)	100	ไมโครลิตร

## 3. MTT solution

MTT	50	มิลลิกรัม
PBS (สำหรับทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่านั้น)	10	มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อผสมให้เข้ากัน กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมครอนเมตร (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) แบ่งใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ที่ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มด้วยแผ่นพอยด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ MTT เป็นสารก่อมะเร็ง ต้องสวมถุงมือก่อนชั่งหรือเตรียมสารทุกครั้ง

## 4. 1X PBS ปริมาตร 1 ลิตร

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	3.63	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	กรัม

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 5. 0.04 N HCl ใน isopropanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตวง isopropanol 80 มิลลิลิตร ในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร

เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ด้วย isopropanol ปิดฝา และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

## สารเคมี และวิธีการเตรียมที่ใช้ในเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

1. 1 M Tris-HCl (pH 8) ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 0.5 M EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) ปริมาตร 1 ลิตร

EDTA	186.10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Washing buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

PVP (Polyvinylpyrrolidone)	2	กรัม
Ascorbic acid	1.76	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)
2-mercaptoethanol	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 2X CTAB lysis buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

CTAB	4	กรัม
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	8	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)
NaCl	16.36	กรัม
2-mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร



เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. Chloroform/isoamyl alcohol (24: 1 v/v) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

Chloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

6. 20 % Polyethylene glycol 6000 (PEG) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

Polyethylene glycol 6000	20	กรัม
NaCl	14.61	กรัม

เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. Tris-EDTA buffer (TE buffer) ปริมาตร 1 ลิตร

1 M Tris-HCl (pH 8)	10	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)
0.5 M EDTA (pH 8)	2	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. Ethidium bromide, 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. 1.5% Agarose gel (w/w)

Agarose	1.65	กรัม
0.5 X TBE (pH 8)	110	มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)
Ethidium bromide	4	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วหลอมโดยใช้ความร้อนจนใสเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## ภาคผนวก ง

### วิธีการทดลอง

1. การวัดค่า pH ของดิน (ค่าความเป็นกรด - ด่าง ของดิน)  
 ชั่งดินตัวอย่าง 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (1:1) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน (rotary shaker) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน และนำไปวัดค่า pH ด้วย pH meter
  
2. เทคนิคการทำ slide culture  
 นำแผ่น cover slip ที่ปราศจากเชื้อวางลงในจานเลี้ยงเชื้อ เทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทับแผ่น cover slip และทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นตัดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่อยู่บนแผ่น cover slip ออกเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส โดยให้เหลืออาหารไว้บางส่วน เชียสปอร์ของแอกติโนมัยซิสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ หลุมที่ตัดเอาไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 14 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ จากนั้นตัดแผ่น cover slip ที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ มาย้อมด้วยสี lacto phenol cotton blue แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
  
3. การเตรียมตัวอย่างเพื่อส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
  - 3.1) การตรึงตัวอย่าง ทำโดยการนำตัวอย่างที่ต้องการจะศึกษามาตัดให้เป็นชิ้นขนาดที่เหมาะสม นำไปอังด้วยไอของออสเมียมเตตราออกไซด์ (osmium tetroxide; OsO<sub>4</sub>) บ่มในที่ชื้น อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง ภายในตู้ดูดควัน
  - 3.2) การขจัดน้ำออก (dehydration) โดยการนำตัวอย่างแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 30, 50, 70, 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขั้นตอนละ 10 – 20 นาที จากนั้น แช่ในเอทานอลบริสุทธิ์ 10 นาที อีก 3 ครั้ง
  - 3.3) การทำตัวอย่างให้แห้ง โดยการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยการใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical dryer, model SAMDRI-780)
  - 3.4) นำตัวอย่างไปติดยังแท่นทองเหลือง ด้วยการติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (electronconductive adhesive)
  - 3.5) นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Ion sputter coater, model JSC- 110
  - 3.6) นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด JEOL รุ่น JSM-5410 LV, Japan

**ภาคผนวก จ**  
**ตารางแสดงผลการทดลอง**

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ด้วยสารสกัดจาก  
แฉกตีนมัยซีส ทดสอบด้วยวิธี MTT

ชื่อตัวอย่าง	ค่า OD 540 เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT test									
	KatolIII		HepG2		SW620		BT474		Jurkat	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
no cell	0.059	0.046	0.121	0.048	0.136	0.068	0.076	0.05	0.065	0.066
no sample	0.311	0.287	0.142	0.157	0.795	0.819	0.121	0.128	0.619	0.572
5 ul EtOH	0.244	0.195	0.153	0.14	0.582	0.513	0.101	0.08	0.423	0.412
P1.1	0.256	0.204	0.142	0.135	0.348	0.577	0.076	0.07	0.41	0.417
P3.1	0.172	0.151	0.11	0.125	0.481	0.51	0.08	0.076	0.431	0.517
P3.2	0.206	0.201	0.16	0.096	0.5	0.307	0.111	0.077	0.455	0.302
P4.1	0.129	0.125	0.116	0.08	0.272	0.221	0.067	0.06	0.276	0.303
P7.2	0.148	0.127	0.098	0.085	0.437	0.413	0.072	0.075	0.779	0.317
P15.1	0.198	0.12	0.074	0.113	0.27	0.336	0.065	0.071	0.307	0.322
P16.1	0.148	0.148	0.085	0.119	0.305	0.404	0.086	0.075	0.346	0.413
P17.1	0.182	0.216	0.147	0.083	0.48	0.288	0.09	0.069	0.341	0.284
P18.1	0.171	0.158	0.088	0.068	0.278	0.219	0.078	0.069	0.284	0.269
P19.1	0.132	0.116	0.065	0.066	0.367	0.342	0.077	0.083	0.272	0.271
J1.1	0.126	0.072	0.068	0.069	0.139	0.205	0.073	0.089	0.29	0.295
J1.2	0.124	0.132	0.094	0.092	0.257	0.336	0.085	0.081	0.315	0.384
J1.4	0.061	0.055	0.071	0.051	0.148	0.059	0.077	0.056	0.245	0.226
J1.5	0.177	0.163	0.075	0.088	0.377	0.387	0.058	0.058	0.269	0.27
J2.2	0.089	0.067	0.062	0.061	0.176	0.159	0.05	0.064	0.256	0.26
J4.2	0.185	0.102	0.078	0.086	0.225	0.306	0.063	0.067	0.32	0.326
J5.3	0.091	0.127	0.068	0.109	0.312	0.426	0.066	0.063	0.303	0.435
J6.1	0.104	0.123	0.128	0.068	0.612	0.386	0.078	0.06	0.482	0.249
J6.2	0.174	0.211	0.054	0.055	0.298	0.091	0.062	0.085	0.277	0.28
J6.3	0.135	0.134	0.088	0.079	0.19	0.161	0.07	0.071	0.316	0.27
J6.4	0.122	0.081	0.069	0.098	0.175	0.204	0.067	0.067	0.285	0.273

ตารางที่ 1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆด้วยสารสกัดจาก  
 แอคติโนมัซซิส ทดสอบด้วยวิธี MTT

ชื่อ ตัวอย่าง	ค่า OD 540 เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT test									
	Katolll		HepG2		SW620		BT474		Jurkat	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
J8.1	0.132	0.12	0.11	0.099	0.365	0.46	0.086	0.073	0.313	0.37
J9.1	0.227	0.274	0.133	0.098	0.471	0.239	0.089	0.059	0.296	0.267
J9.5	0.19	0.202	0.056	0.06	0.346	0.305	0.06	0.054	0.256	0.245
J10.1	0.086	0.087	0.075	0.073	0.189	0.205	0.053	0.056	0.233	0.244
J12.1	0.096	0.065	0.056	0.059	0.154	0.142	0.065	0.07	0.251	0.272
J12.3	0.163	0.144	0.154	0.113	0.373	0.503	0.092	0.075	0.326	0.403
J12.4	0.081	0.085	0.173	0.054	0.202	0.096	0.1	0.073	0.335	0.272
J13.3	0.131	0.242	0.075	0.073	0.219	0.236	0.079	0.072	0.258	0.236
J13.4	0.196	0.105	0.103	0.078	0.233	0.246	0.075	0.073	0.287	0.275
J13.6	0.216	0.169	0.127	0.183	0.444	0.554	0.074	0.088	0.369	0.424
J14.3	0.19	0.169	0.097	0.091	0.264	0.329	0.082	0.079	0.281	0.331
J15.1	0.105	0.269	0.167	0.105	0.103	0.085	0.082	0.055	0.334	0.312
J15.2	0.269	0.309	0.124	0.092	0.328	0.371	0.063	0.058	0.33	0.309
J15.4	0.216	0.299	0.184	0.096	0.496	0.559	0.063	0.067	0.331	0.336
J16.2	0.168	0.147	0.073	0.125	0.374	0.435	0.067	0.072	0.345	0.379
J19.2	0.325	0.256	0.141	0.142	0.086	0.975	0.111	0.126	0.682	0.858
no cell	0.077	0.069	0.079	0.058	0.083	0.063	0.058	0.051	0.075	0.067
5ul EtOH	1.022	0.987	0.131	0.165	0.94	0.915	0.154	0.161	0.377	0.323
J20.1	1.061	1.274	0.164	0.18	0.915	0.962	0.138	0.142	0.518	0.593
J20.2	0.853	0.963	0.155	0.17	0.728	0.778	0.116	0.161	0.401	0.456
B2.4	0.898	0.892	0.118	0.122	0.602	0.599	0.133	0.084	0.404	0.317
R1.2	0.1005	0.946	0.124	0.098	0.575	0.538	0.078	0.084	0.311	0.296
R1.3	0.972	0.1005	0.09	0.095	0.333	0.334	0.06	0.056	0.294	0.28
R3.1	0.846	0.829	0.124	0.145	0.618	0.713	0.088	0.097	0.307	0.305

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญด้วยส่วนผสมของสารที่สกัดได้จากแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2

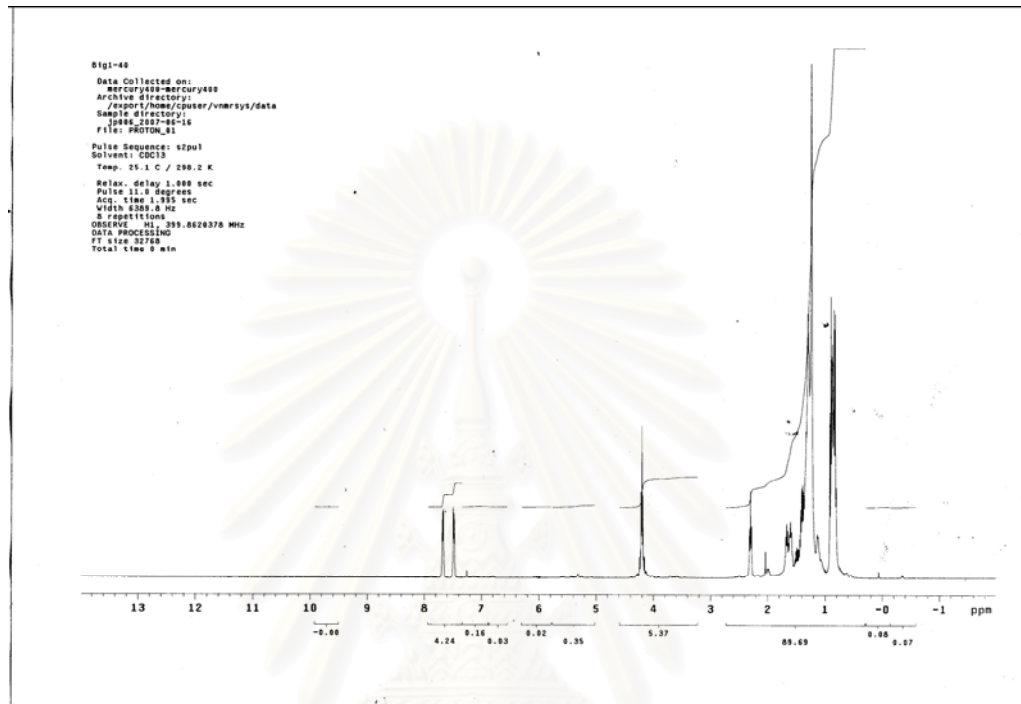
	<i>B. cereus</i>				<i>S. aureus</i>			
	1	2	3	mean	1	2	3	mean
positive	0.12	0.13	0.13	0.13	0.11	0.12	0.11	0.11
negative	0.16	0.34	0.34	0.34	0.56	0.60	0.55	0.57
fraction1	0.62	0.52	0.19	0.57	0.19	0.24	0.23	0.22
fraction2	0.17	0.20	0.27	0.21	0.38	0.37	0.36	0.37
fraction3	0.09	0.09	0.09	0.09	0.11	0.11	0.10	0.11
fraction4	0.49	0.24	0.28	0.26	0.13	0.13	0.12	0.13
fraction5	0.43	0.44	0.33	0.44	0.12	0.12	0.12	0.12
fraction6	0.09	0.09	0.10	0.09	0.11	0.12	0.10	0.11
fraction7	0.49	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10
fraction8	0.22	0.19	0.19	0.20	0.27	0.23	0.22	0.24
fraction9	0.23	0.20	0.23	0.22	0.20	0.21	0.19	0.20
fraction10	0.19	0.18	0.14	0.17	0.14	0.14	0.13	0.14
fraction11	0.16	0.14	0.15	0.15	0.13	0.14	0.13	0.13
fraction12	0.14	0.13	0.12	0.13	0.10	0.11	0.10	0.10
fraction13	0.21	0.12	0.36	0.23	0.10	0.11	0.10	0.10
fraction14	0.59	0.57	0.19	0.58	0.17	0.17	0.17	0.17
	<i>E. coli</i>				<i>P. aeruginosa</i>			
	1	2	3	mean	1	2	3	mean
positive	0.11	0.12	0.32	0.12	0.19	0.17	0.42	0.18
negative	0.69	0.99	0.74	0.81	1.10	1.40	1.14	1.21
fraction1	0.88	1.12	1.13	1.04	0.80	0.96	0.02	0.88
fraction2	0.85	1.12	0.99	0.99	0.54	0.81	0.63	0.66
fraction3	0.53	0.80	0.63	0.65	0.26	0.31	0.56	0.29
fraction4	0.65	0.95	0.82	0.81	0.41	0.42	0.63	0.42
fraction5	0.65	0.93	0.70	0.76	0.61	0.78	0.58	0.66
fraction6	0.66	0.91	0.71	0.76	0.78	0.94	0.75	0.82
fraction7	0.65	0.76	0.66	0.69	1.12	1.18	0.86	1.05
fraction8	0.78	1.06	0.82	0.89	0.84	1.00	0.79	0.88
fraction9	0.91	1.13	0.93	0.99	0.78	0.95	0.87	0.87
fraction10	0.91	1.11	0.87	0.96	0.53	0.75	0.86	0.71
fraction11	0.86	1.08	0.84	0.93	0.49	0.80	0.93	0.74
fraction12	0.84	1.02	0.83	0.90	0.45	0.70	0.76	0.64
fraction13	0.88	1.02	0.88	0.93	0.58	0.80	0.74	0.71
fraction14	0.78	1.03	0.85	0.89	0.86	1.12	1.13	1.04

ตารางที่ 2 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบการยับยั้ง  
การเจริญด้วยส่วนผสมของสารที่สกัดได้จากแอกติโนมัยซิส สายพันธุ์ J6.2

	<i>C. albicans</i>				<i>S. cerevisiae</i>			
	1	2	3	mean	1	2	3	mean
positive	0.20	0.29	0.23	0.24	0.25	0.26	0.38	0.26
negative	0.66	0.62	0.50	0.59	0.38	0.49	0.41	0.43
fraction1	0.50	0.48	0.53	0.50	0.75	0.78	0.98	0.84
fraction2	0.53	0.54	0.47	0.51	0.42	0.43	0.31	0.39
fraction3	0.51	0.50	0.44	0.48	0.40	0.44	0.41	0.42
fraction4	0.59	0.57	0.46	0.54	0.34	0.56	0.42	0.44
fraction5	0.62	0.61	0.54	0.59	0.35	0.51	0.38	0.41
fraction6	0.59	0.72	0.60	0.64	0.31	0.35	0.28	0.31
fraction7	0.71	0.73	0.66	0.70	0.28	0.47	0.35	0.37
fraction8	0.65	0.57	0.64	0.62	0.82	0.77	0.47	0.69
fraction9	0.41	0.54	0.51	0.49	0.46	0.54	0.45	0.48
fraction10	0.40	0.51	0.54	0.48	0.44	0.55	0.55	0.51
fraction11	0.44	0.49	0.35	0.43	0.35	0.46	0.55	0.45
fraction12	0.48	0.55	0.47	0.50	0.39	0.43	0.51	0.44
fraction13	0.49	0.63	0.59	0.57	0.47	0.50	0.46	0.48
fraction14	0.73	0.80	0.75	0.76	0.59	0.73	0.65	0.66

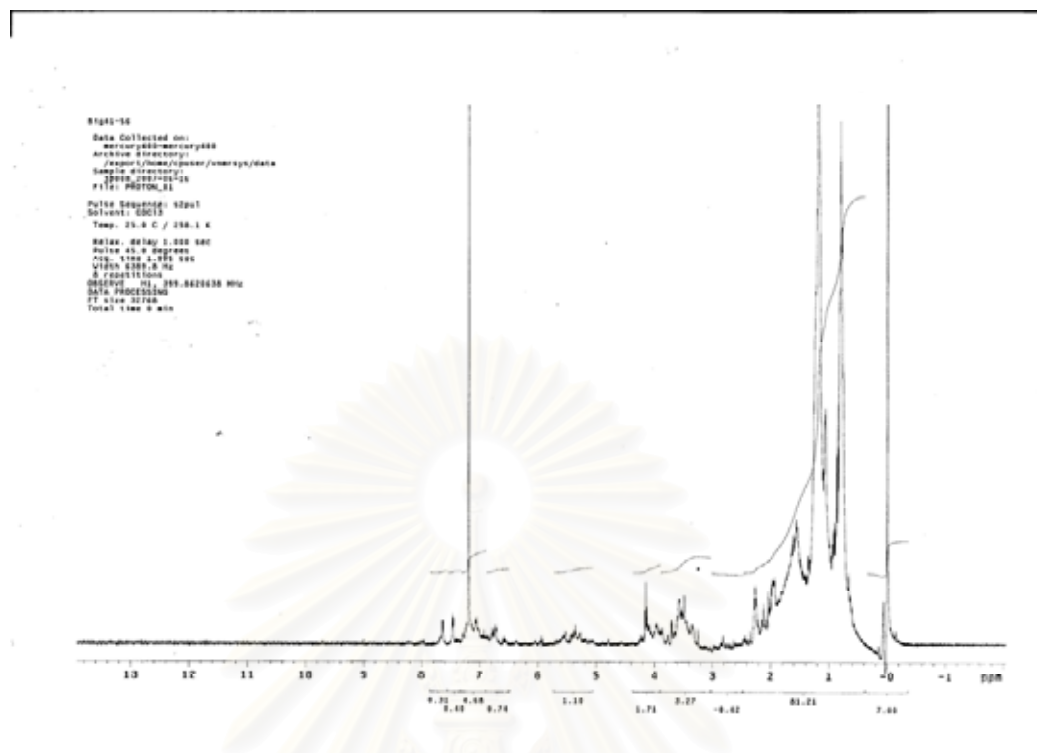
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ  
ข้อมูลสเปกโทรสโกปี

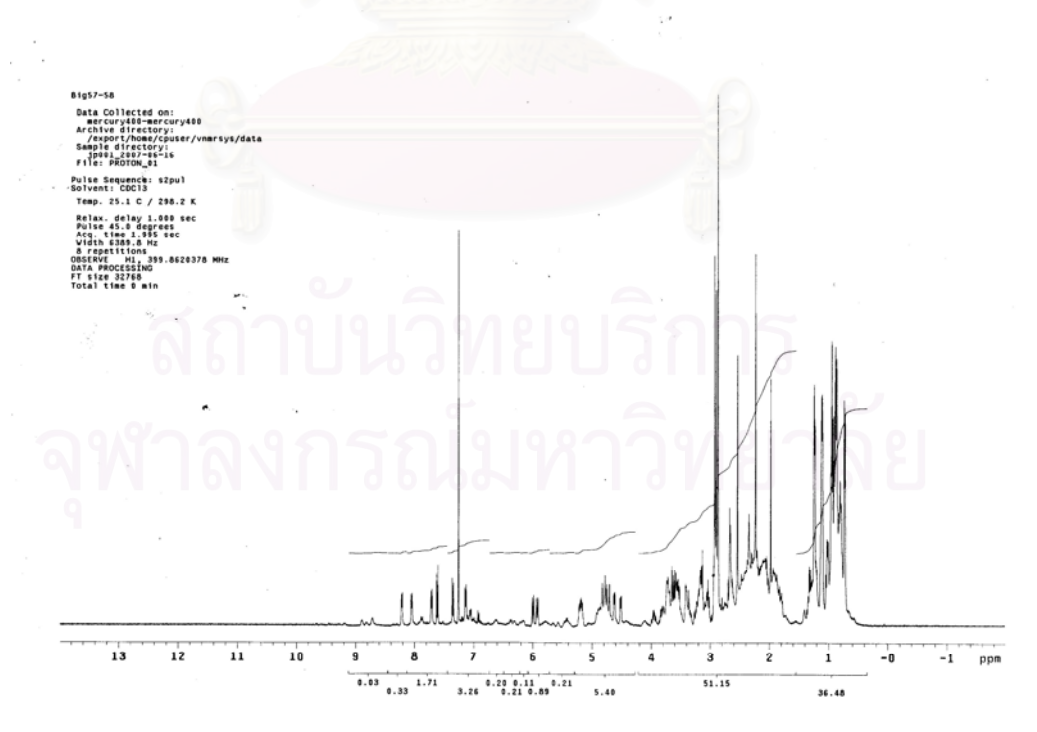


รูปที่ 1 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 1 (ส่วนที่ 1 – 40)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

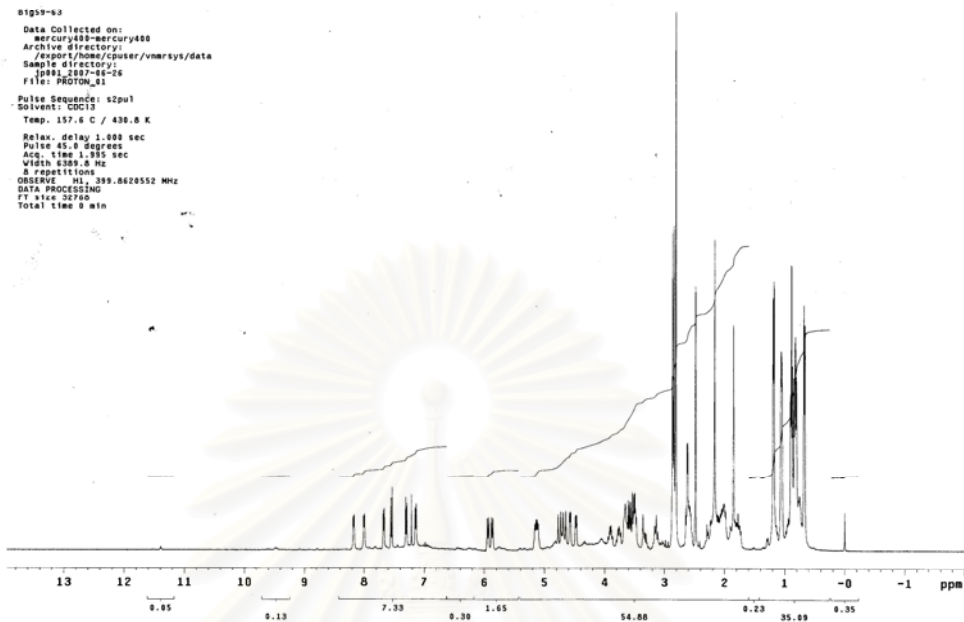


รูปที่ 2 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 2 (ส่วนที่ 41-56)

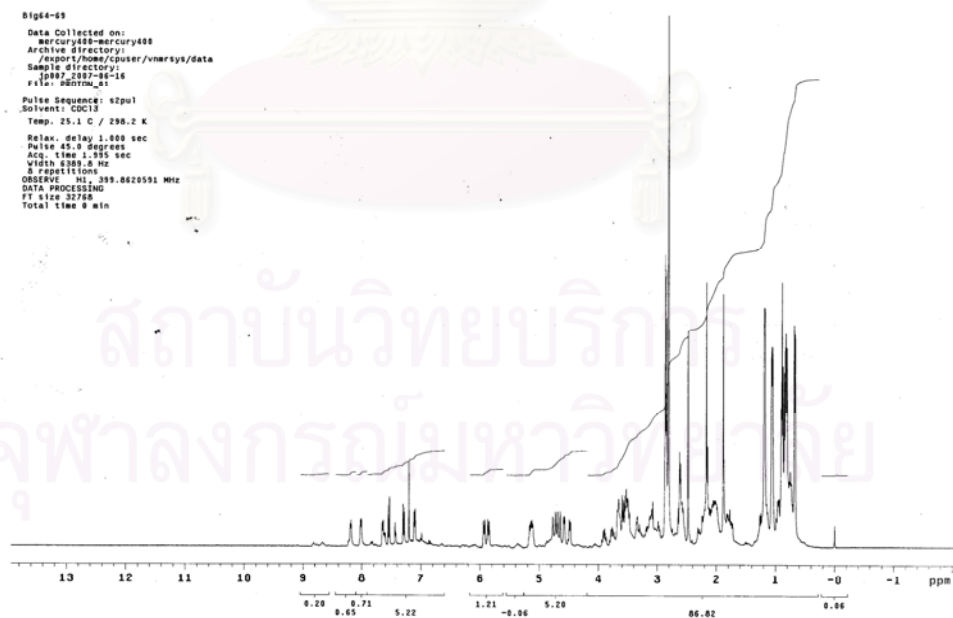


รูปที่ 3 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 3 (ส่วนที่ 57-58)

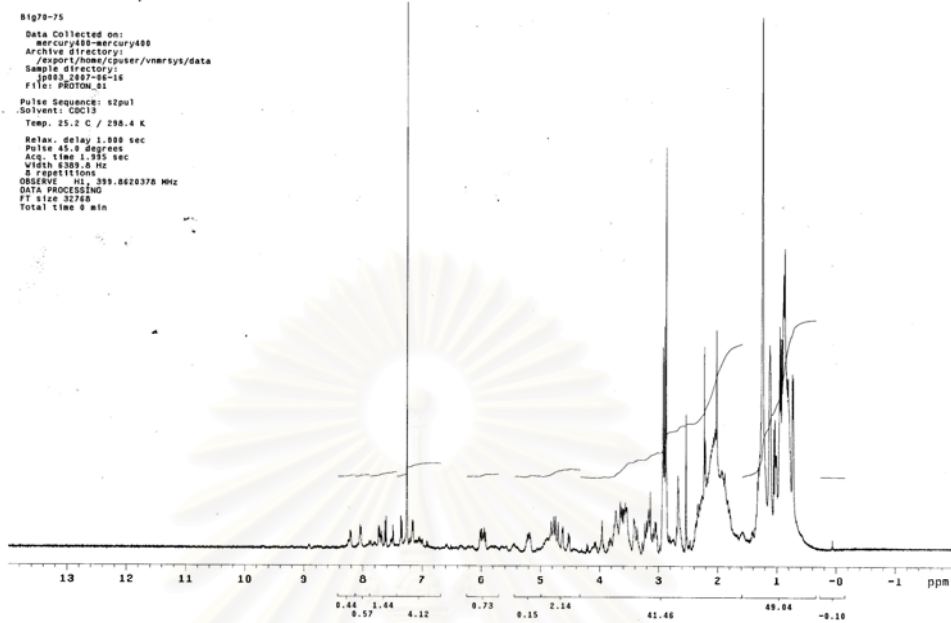




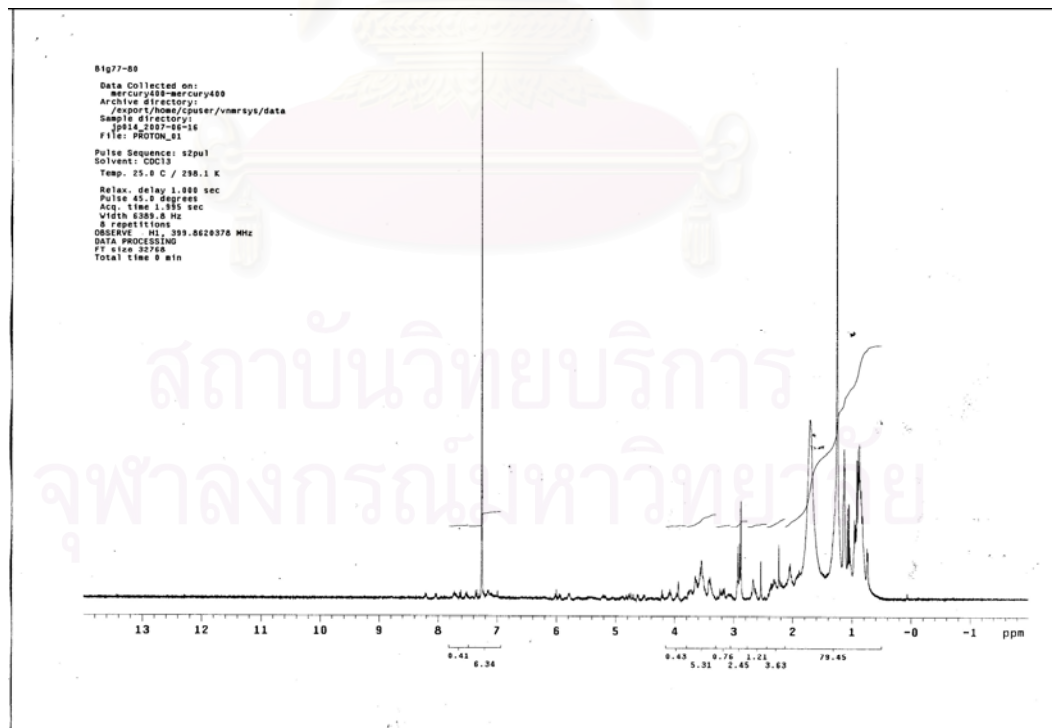
รูปที่ 4 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 4 (ส่วนที่ 59-63)



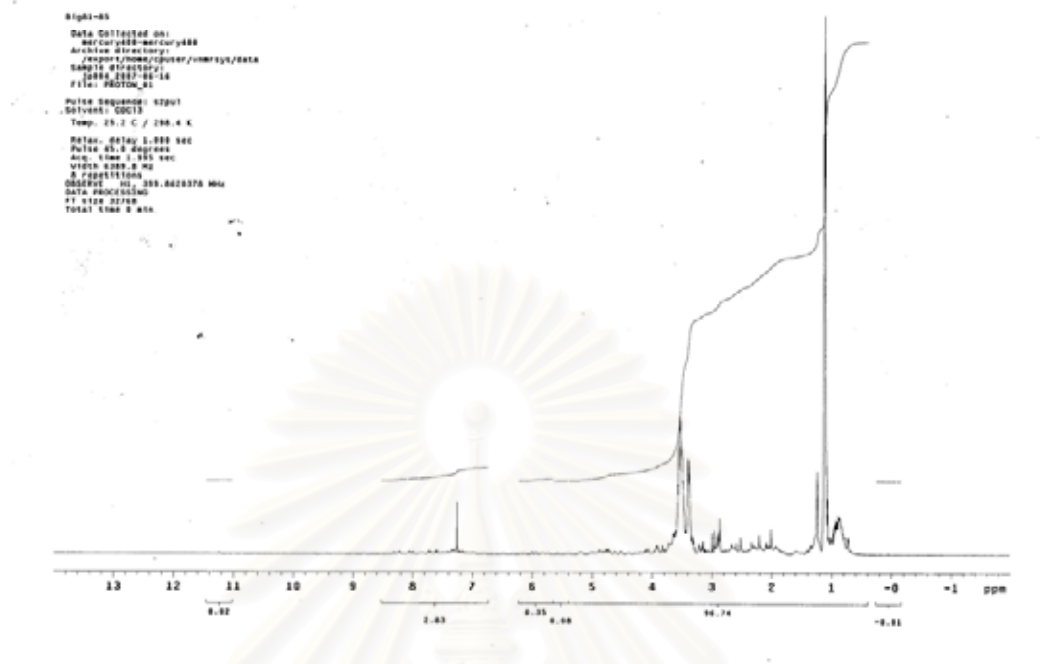
รูปที่ 5 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 5 (ส่วนที่ 64-69)



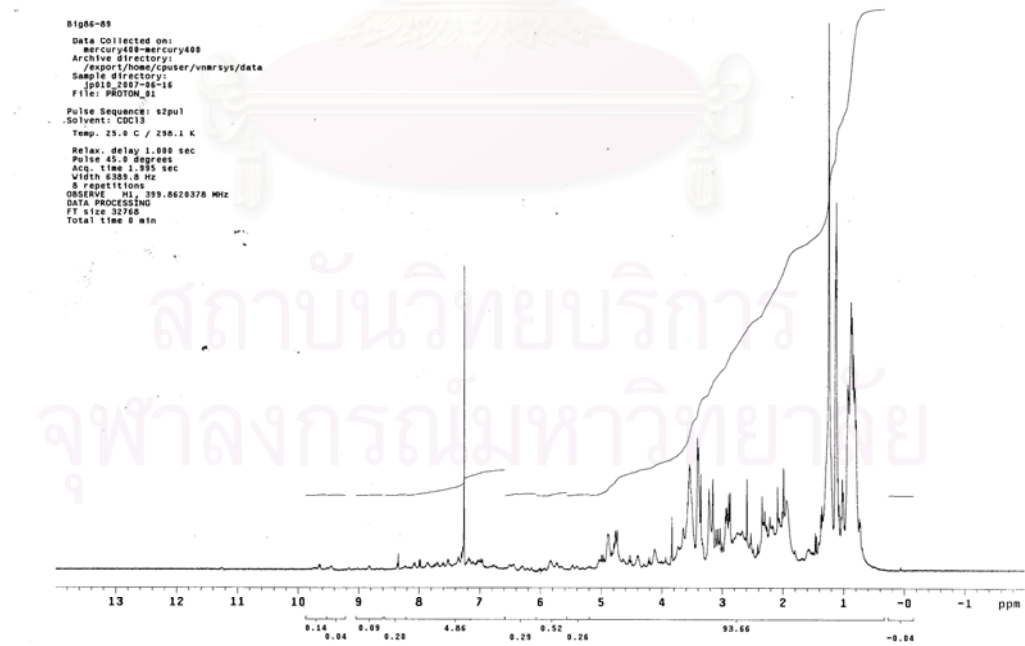
รูปที่ 6 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 6 (ส่วนที่ 70-76)



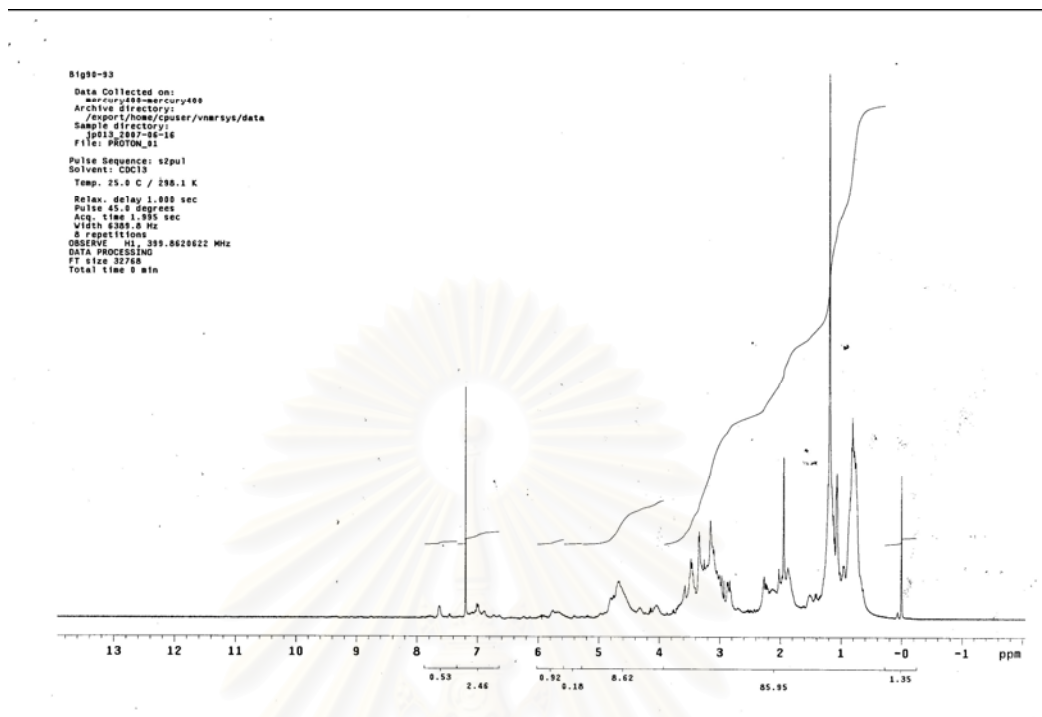
รูปที่ 7 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 7 (ส่วนที่ 77-80)



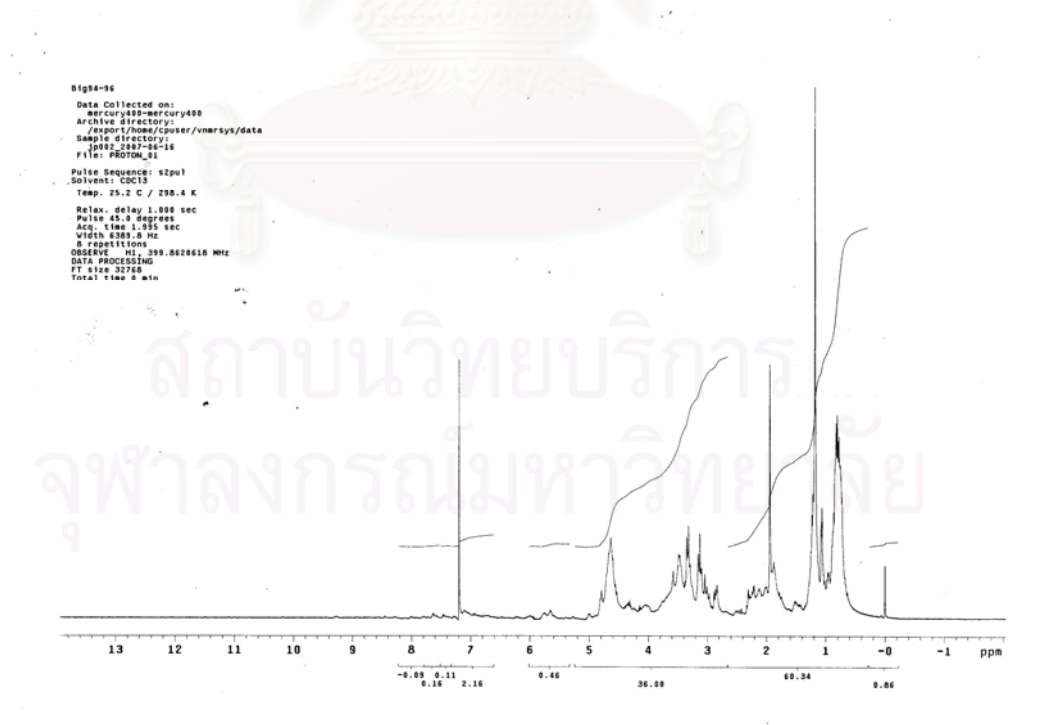
รูปที่ 8 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 8 (ส่วนที่ 81-85)



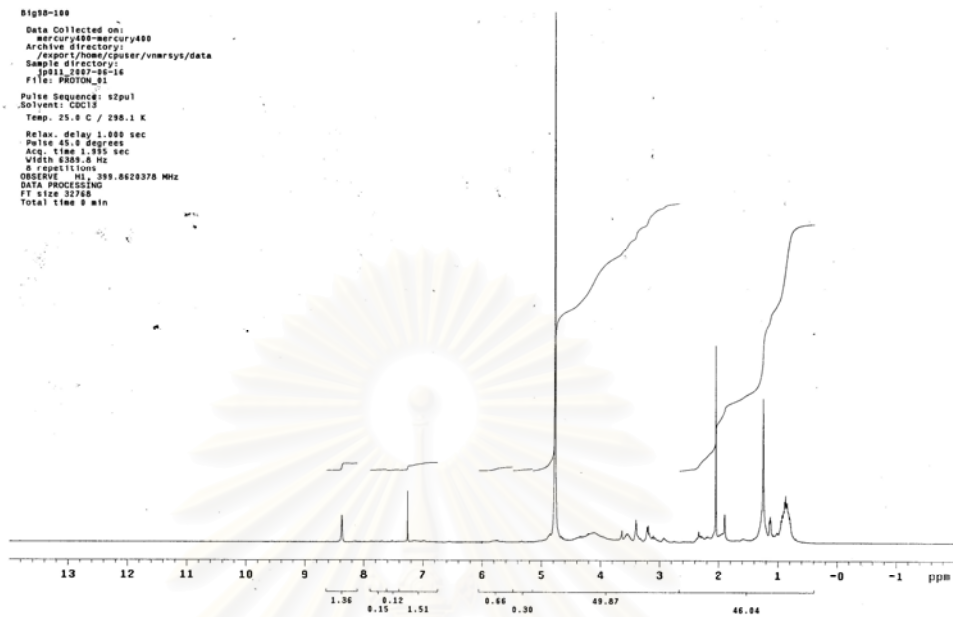
รูปที่ 9 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 9 (ส่วนที่ 86-89)



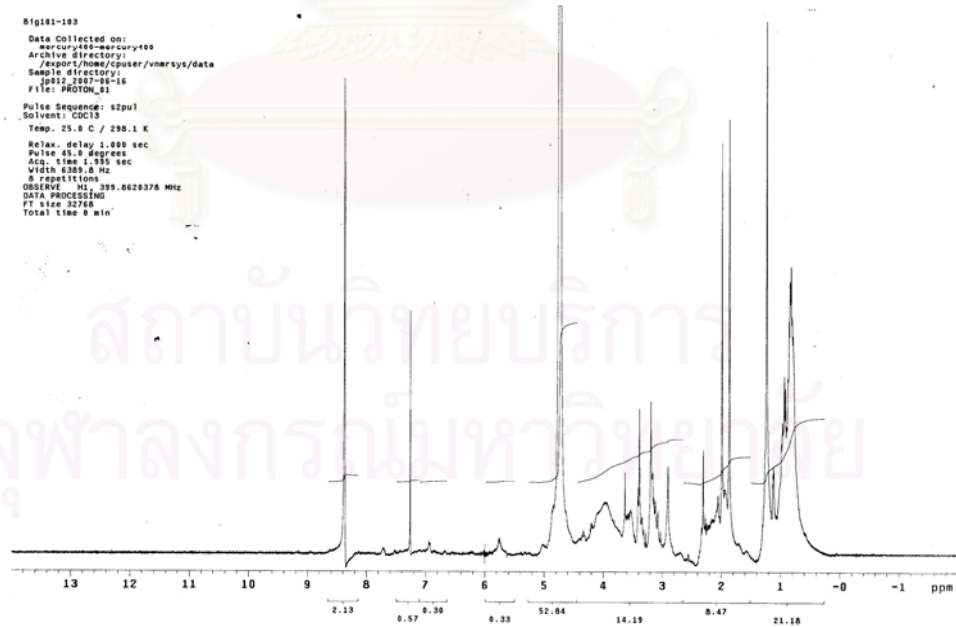
รูปที่ 10 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 10 (ส่วนที่ 90-93)



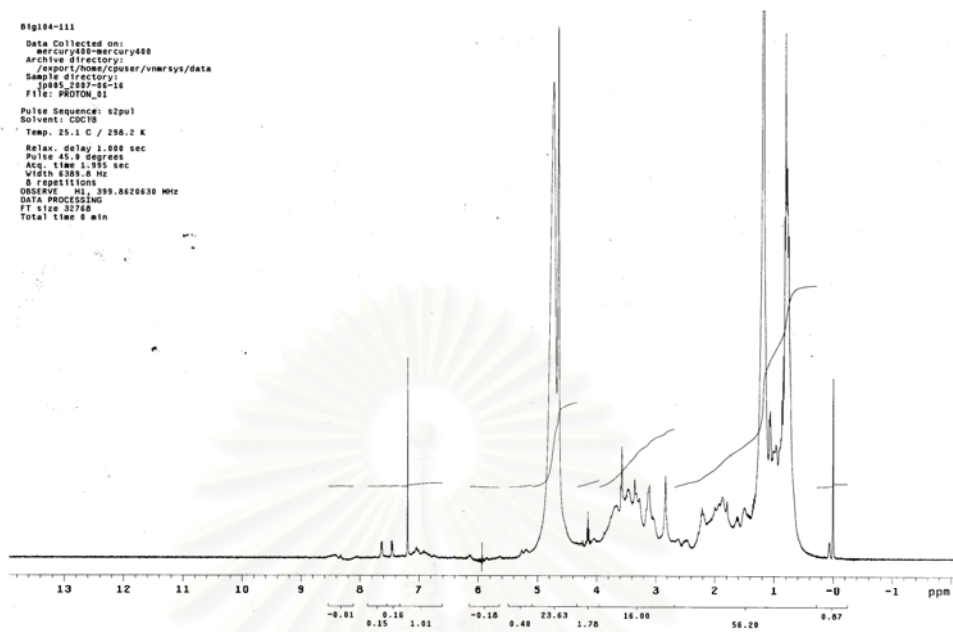
รูปที่ 11 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 11 (ส่วนที่ 94-96)



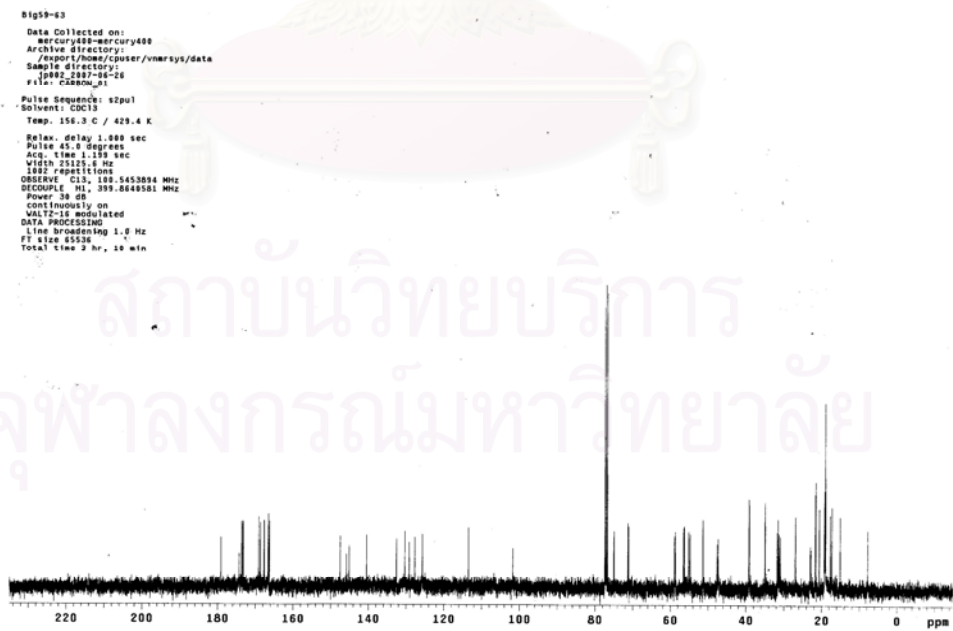
รูปที่ 12 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 12 (ส่วนที่ 97-100)



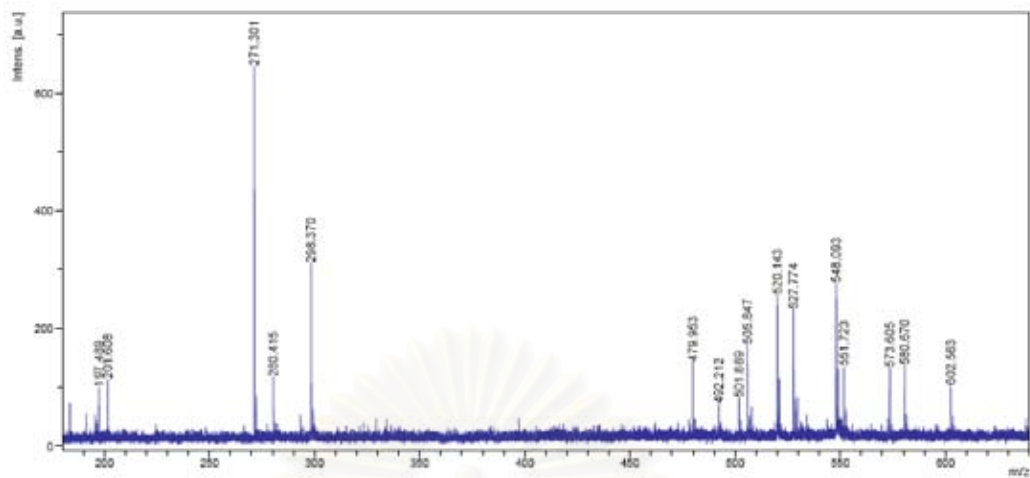
รูปที่ 13 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 13 (ส่วนที่ 101-103)



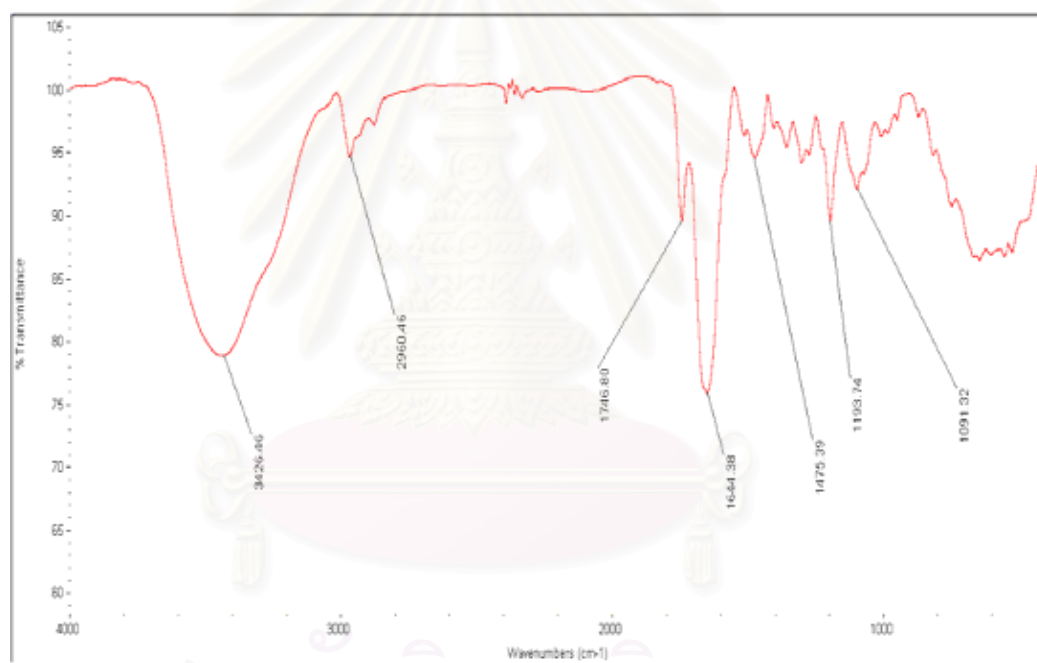
รูปที่ 14 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 14 (ส่วนที่ 104-200)



รูปที่ 15 คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของส่วนผสมที่ 4 (ส่วนที่ 59 - 63)



รูปที่ 16 แมสสเปกตรัมของส่วนผสมที่ 4 (ส่วนที่ 59 – 63)



รูปที่ 17 อินฟราเรดสเปกตรัมของส่วนผสมที่ 4 (ส่วนที่ 59 – 63)

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณัฐชัย เก่งพิพัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 31 ธันวาคม 2525 ที่อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี เป็นบุตรของ นายณัฐพัชร์ เก่งพิพัฒน์ และนางสุรक्षा เก่งพิพัฒน์ เข้าศึกษาในระดับประถมศึกษา และมีมัธยมศึกษาที่โรงเรียนกรุงเทพคริสเตียนวิทยาลัย จากนั้นสอบเข้าศึกษาต่อในระดับอุดมศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีเดียวกัน

### ผลงานทางวิชาการ

“Investigation the denitrification method for reduces TKN to be less than 5 mg/l” งานวิจัยในการฝึกงาน (student trainee project) บริษัท อายิโนะโมะไต้ะ (ประเทศไทย) จำกัด โรงงานปทุมธานี ปีการศึกษา 2543

“การติดตามการย่อยสลายพีแนมทรีนของเชื้อ *Sphingobium* sp. สายพันธุ์กลาย P2::gfp ในระบบบึงเวสดินจำลอง” งานวิจัยในระดับปริญญาตรี (senior project) ในหลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2544

“Screening for antimicrobial and antitumor activity of actinomycetes isolated from beaches and mangroves in Thailand” การนำเสนอผลงาน (poster presentation) ในงานประชุมวิชาการ สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ปีการศึกษา 2549

### ทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ปีการศึกษา 2549

ทุนอุดหนุนการศึกษา ปีการศึกษา 2549

ทุนผู้ช่วยสอน ปีการศึกษา 2550