

การแยกแวกติโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินร้งปลวกในประเทศไทย



นางสาวยุวดี มหาศักดิ์ศิริ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

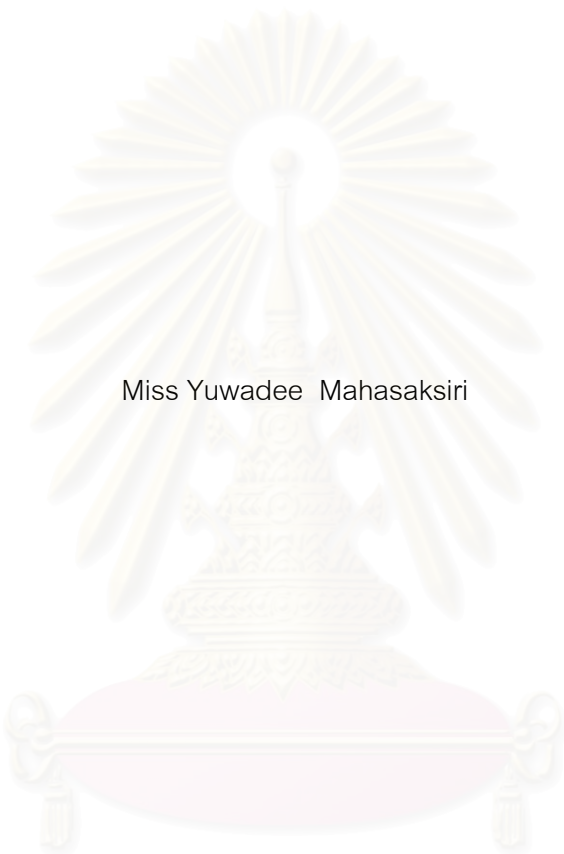
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3988-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION OF ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES FROM THAI TERMITE SOIL



Miss Yuwadee Mahasaksiri

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-3988-5

ยวดี มหาศักดิ์ศิริ : การคัดเลือกแอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินรังปลวกในประเทศไทย (ISOLATION OF ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES FROM THAI TERMITE SOIL) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ประภคิต์สิน สีนันทน์ อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. สุรัชย์ พรหมกุล หน้า. 137 ISBN 974-17-3988-5.

สามารถแยกแอกติโนมัยซีดได้ทั้งหมด 79 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดินรังปลวกจำนวน 15 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บจาก 6 จังหวัด ในประเทศไทย การทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะพบว่า แอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ Ac 9.1 เป็นสายพันธุ์เดียวที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรีย (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*) ยีสต์ (*Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae*) และรา (*Aspergillus niger*) เมื่อจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ Ac 9.1 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางชีวเคมี องค์ประกอบของผนังเซลล์ และการตรวจสอบลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA พบว่าแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ Ac 9.1 คือ *Streptomyces griseocarnius* เมื่อนำแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ Ac 9.1 ผลิตสารปฏิชีวนะโดยใช้อาหารเหลวไซเดียมเคซิเนต ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ 1% พบว่าสารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์จากส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้ง *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* และ *A. niger* ได้ เมื่อนำสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าสารดังกล่าวคือ *N*-acetyltyramine ความเข้มข้น 500 µg/ml มีความสามารถยับยั้งราก่อโรคพืช *Pythium aphanidermatum*

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372377923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : ACTINOMYCETES / STREPTOMYCES GRISEOCARNEUS / ANTIBIOTIC /

N- ACETYLTYRAMINE

YUWADEE MAHASAKSIRI : ISOLATION OF ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES FROM THAI TERMITE SOIL. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF PRAKITSIN SRIHANON, Ph.D., THESIS COADVISER : ASST. PROF SURACHAI PONPAKAKUL pp. 137 ISBN 947-17-3988-5.

Fifteen termite soil samples collected from six provinces of Thailand were used for isolation of antibiotic producing actinomycetes. Of seventy-nine isolates obtained, only isolate strain Ac 9.1 inhibited the growth of bacteria (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), yeast (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) and fungi (*Aspergillus niger*). Based on morphology, physiology, cultural characteristics, biochemical properties, cell wall compositions and 16S rRNA gene sequencing analysis, the strain Ac 9.1 was identified as *Streptomyces griseocarnius*. When sodium caseinate medium supplemented with 1% yeast extract was used to produce antibiotic by actinomyces strain Ac 9.1 it found that the ethyl acetate extract of fermentation broth of the strain significantly inhibited the growth of *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* and *A. niger*. Ethyl acetate extract from fermentation broth by mean of chromatographic techniques yielded one known compound as *N*-acetyltyramine. The structure elucidation of this compound was achieved by analysis of spectroscopic data including MS, IR and NMR spectroscopies and comparison with literature data. An antimicrobial activity test of this compound at concentration level of 500 µg/ml significantly inhibited the growth of pathogenic plant fungi, *Pythium aphanidermatum*.

Department Microbiology Student's signature _____

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature _____

Academic year 2003 Co-advisor's signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างดีของ รองศาสตราจารย์ ดร. ประทีปดีลั่น สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็น ข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไข ปรับปรุง วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ อาจารย์ ดร.จิตรตรา กาญจนประยูร ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็น ข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไข ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. จิตรตรา ที่ได้ให้การช่วยเหลือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเอกติโนมายซีต

ขอขอบคุณ นายเชิดชัย โพธิ์ศรี นายวีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร นางสาวมณฑาทิพ สุภาธรรม และนางสาว สมจินตนา ทวีพานิชย์ ที่ช่วยเหลือในการหาข้อมูล และให้คำแนะนำในการทำ วิทยานิพนธ์ และนางสาวสุนัดดา โยมญาติ ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างดินรังปลวก

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเพื่อนและพี่น้องในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้ทำกิจกรรมต่างๆร่วมกันรวมทั้งให้ คำปรึกษาและช่วยเหลือในเรื่องต่างๆด้วยดีเสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังใจ และช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

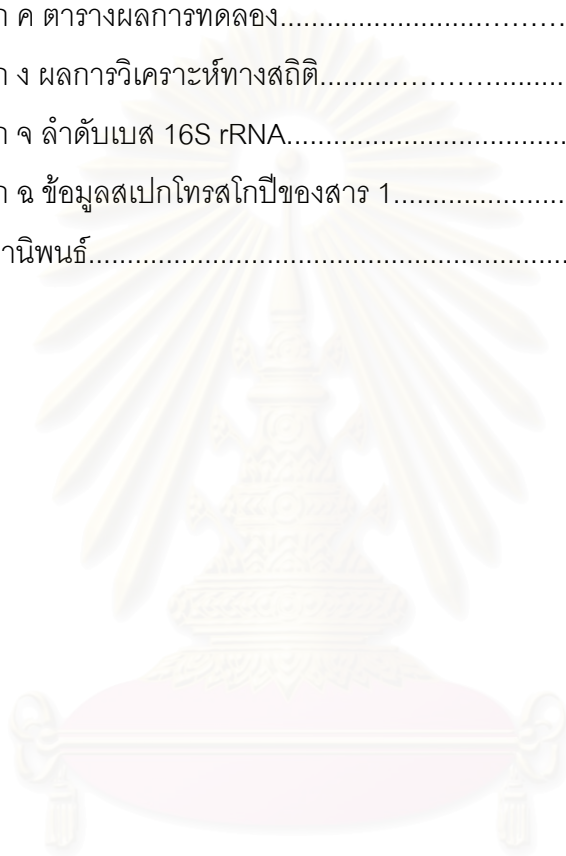
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีต	3
2.2 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีต	3
2.3 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีต	10
2.4 การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีต	13
2.5 สารปฏิชีวนะ	15
2.6 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีต	16
2.7 กลุ่มของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีต	17
2.8 รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่	21
2.9 สารปฏิชีวนะที่สร้างโดย <i>Streptomyces griseocaneus</i> และรายงานที่เกี่ยวข้อง	25
3. วิธีดำเนินการวิจัย	28
3.1 อุปกรณ์	28
3.2 สารเคมี	29
3.3 ตัวอย่างดิน	30
3.4 การแยกแอกติโนมัยซีตจากดินร้งปลวก	30
3.5 การเก็บรักษาแอกติโนมัยซีต	30
3.6 การทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีต	31
3.7 การวิเคราะห์ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบ ในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1.....	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1	32
3.9 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 โดยวิเคราะห์ ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA	36
3.10 การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว.....	39
3.11 การผลิตสารปฏิชีวนะโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1	42
3.12 การสกัดสารปฏิชีวนะจากอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใยของ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1.....	42
3.13 การแยกและทำให้สารปฏิชีวนะบริสุทธิ์	45
3.14 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์	47
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	48
4.1 ลักษณะของดินร้งปลวก	48
4.2 การแยกแอกติโนมัยซีตจากดินร้งปลวก	49
4.3 การทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีต	50
4.4 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ..	54
4.5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้	55
4.6 การวิเคราะห์ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบ ในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1.....	56
4.7 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1	57
4.8 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 โดยวิเคราะห์ ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA	66
4.9 การสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว	69
4.10 การผลิตสารปฏิชีวนะ	74
4.11 การแยกและทำให้สารปฏิชีวนะบริสุทธิ์	76
5. สรุปผลการทดลอง.....	87
รายการอ้างอิง.....	92

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	102
ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง.....	110
ภาคผนวก ค ตารางผลการทดลอง.....	113
ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	120
ภาคผนวก จ ลำดับเบส 16S rRNA.....	128
ภาคผนวก ฉ ข้อมูลสเปกโทรสโกปีของสาร 1.....	129
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	137



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดผนังเซลล์และน้ำตาลภายในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีต.....	11
2.2	จำนวนของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิโดยประมาณที่ผลิตโดยจุลินทรีย์หลายกลุ่มอ้างอิงในปี 1994.....	16
2.3	สารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย	17
3.1	ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในสารละลาย PCR 20 μ l ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ.....	38
4.1	แหล่งที่มา พีเอช และลักษณะของตัวอย่างดินรังปลวก.....	48
4.2	สายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง.....	49
4.3	ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....	50
4.4	จำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่ม.....	54
4.5	ค่า R_p ของสารสกัด และสารมาตรฐาน 2,6 diaminopimelic acid.....	57
4.6	การเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP.....	61
4.7	ความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบ.....	64
4.8	ความสามารถเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ.....	64
4.9	ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน.....	65
4.10	ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน.....	66
4.11	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 เปรียบเทียบกับ <i>Streptomyces griseocarneus</i> NCIMB 40447	68
4.12	ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบในวันที่ 3 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวไซเดียมเคซิเนต (SCB) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปไทน์ และชอยโทนเปปไทน์.....	72
4.13	ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบในวันที่ 5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวไซเดียมเคซิเนต (SCB) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปไทน์ และชอยโทนเปปไทน์.....	72
4.14	ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวไซเดียมเคซิเนต (SCB) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปไทน์ และชอยโทนเปปไทน์.....	73

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.15	น้ำหนักของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใย..... 75
4.16	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของจุลินทรีย์ทดสอบ ของสารสกัดที่ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม และ 10 มิลลิกรัม ต่อดิสค์ 8 มิลลิเมตร..... 76
4.17	การแยกสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี..... 77
4.18	บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบของสารประกอบแต่ละส่วน..... 78
4.19	แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1 79
4.20	HMQC, HMBC และ COSY สเปกตรัมของสาร 1 80
4.21	โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 เมื่อเปรียบเทียบกับ กับสาร <i>N</i> -acetyltyramine 81
4.22	คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 เปรียบเทียบกับ กับสาร <i>N</i> -acetyltyramine 81
4.23	บริเวณยับยั้งของราโรคพืช 3 ชนิด.....83
4.24	การแยกสารปฏิชีวนะจากส่วน F8 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และบริเวณยับยั้งของ <i>B. subtilis</i> และ <i>S. aureus</i> 84
4.25	การแยกสารประกอบส่วน F8/8 ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค Preparative TLC..... 85
4.26	การแยกสารประกอบส่วน F4 ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค Preparative TLC..... 85
4.27	การแยกสารประกอบส่วน F4/5 ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค Preparative TLC.....86
5.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา ความสามารถในการเจริญ ที่อุณหภูมิและพีเอช ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1..... 88

สารบัญรูป

รูปประกอบ	หน้า	
2.1	ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีต.....	4
2.2	การสร้างสปอร์เดี่ยวของ A. <i>Micromonospora</i> B. <i>Thermomonospora</i> และ C. <i>Saccharomonospora</i>	5
2.3	การสร้างสปอร์แบบ diaposous ของ <i>Micromonospora</i> B และ C การสร้างสปอร์ แบบ oligosporous ของ <i>Nocardia brevicatena</i> และ <i>Catellatospora</i>	6
2.4	การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ <i>Streptomyces</i>	8
2.5	รูปทรงของสปอร์อับสปอร์บนสายใยอาหาร.....	9
2.6	รูปทรงของอับสปอร์บนสายใยอากาศ.....	10
2.7	ผลของสารปฏิชีวนะแบบ bacteriostatic และ bactericidal ต่อ การเจริญของแบคทีเรีย	16
2.8	โครงสร้างพื้นฐานและตัวอย่างการสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides.....	18
2.9	ตัวอย่างการสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides	18
2.10	โครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline.....	19
2.11	โครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม Chloramphenicol.....	19
2.12	โครงสร้างพื้นฐานสารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide.	20
2.13	โครงสร้างสารปฏิชีวนะ lincomycin และ erythromycin.....	20
2.14	โครงสร้างสารปฏิชีวนะ nystatin.....	21
2.15	โครงสร้างสารปฏิชีวนะ amphotericin B.....	21
2.16	สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีต Manopeptimycins และ Vancocresmycin	23
2.17	สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีต Micromonosporide A, Mathemycin B, Kahakamides และ Grividomycins	24
2.18	สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีต Colubicidin A	25
2.19	โครงสร้างของ APHE-1, APHE-2, APHE-3 และ APHE-4	27
3.1	แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดสารปฏิชีวนะจากอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของ เส้นใยของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1.....	43
4.1	แผนภูมิวงกลมการจัดกลุ่มการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....	54

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปประกอบ	หน้า
4.2 การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> และ <i>A. niger</i> ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1.....	56
4.3 โครมาโทแกรมแสดงแถบของสารสกัด DAP ด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	57
4.4 สายใยอากาศของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีลักษณะขดเป็นวงซ้อนกัน (open loop) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า	58
4.5 สายสปอร์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีลักษณะค่อนข้างตรง สปอร์ต่อกันเป็นสายยาว กำลังขยาย 10,000 เท่า.....	58
4.6 แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีการสร้างสปอร์ที่ปลายเส้นใย สายสปอร์แตกออกเป็นข้อจากปลายเส้นใย กำลังขยาย 5,000 เท่า	59
4.7 แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีผิวสปอร์เรียบ รูปทรงกระบอกของภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500 เท่า.....	59
4.8 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหาร ISP 2.....	62
4.9 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหาร ISP 4.....	62
4.10 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปปโตเน ยีสต์เอทเทรก ไอรอน ออการ์ และอาหารเลี้ยงเชื้อไทโรซีน ออการ์ เมื่อเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีต Ac 9.1 เป็นเวลา 7 วัน	63
4.11 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1.....	67
4.12 แผนภูมิแสดงบริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว NB, MEB, SSB และ SCB ในวันที่ 3	70
4.13 แผนภูมิแสดงบริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว NB, MEB, SSB และ SCB ในวันที่ 5	70
4.14 แผนภูมิแสดงบริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว NB, MEB, SSB และ SCB ในวันที่ 7	71
4.15 แผนภูมิแสดงน้ำหนักเซลล์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปไทน์ ซอยโทเนเปปโทเน และ control คืออาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่ไม่เติมสารอาหาร.....	73

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปประกอบ	หน้า
4.16 โครงสร้างสาร 1 หรือสาร <i>N</i> -acetyltyramine.....	82
4.17 ความสัมพันธ์ของ H กับ C จากข้อมูล HMBC ของสาร 1.....	82
5.1 โครงสร้างสาร 1 หรือสาร <i>N</i> -acetyltyramine.....	90



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

แอกติโนมัยซีตเป็นจุลินทรีย์ที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีส่วนประกอบของผนังเซลล์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย ติดสีแกรมบวก มีความไวต่อสารปฏิชีวนะที่ทำลายแบคทีเรียแต่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ทำลายรา มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ของเบส guanine และ cytosine (%G+C) ในดีเอ็นเอสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป และมีลักษณะบางอย่างที่เหมือนกับราคือมีการสร้างเส้นใย (hyphae) แต่เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา (Sykes และ Skinner, 1973) และมีการสร้างสปอร์ อาจเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือเป็นสายสปอร์ เช่น สกุล *Actinoplans* สร้างสปอร์ (sporangiospore) ในอับสปอร์ (sporangium) (Couch, 1963 ; Vobis, 1987) โคโลนีของแอกติโนมัยซีตมีลักษณะที่บดแสง ประกอบด้วยสายใยอาหาร (substrate mycelium) และสายใยอากาศ (aerial mycelium) มีการสร้างผนังกันเส้นใยผิวโคโลนีอาจเรียบ หนูน ขรุขระ เป็นเม็ดเล็ก หรือเป็นเกล็ด โคโลนีมีสีต่างๆ เช่น สีขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง ฟ้ำ เขียว น้ำตาล และดำ

แอกติโนมัยซีตพบได้ในสภาวะแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน น้ำ โคลน ปมรากพืช และอากาศ ในดินพบแอกติโนมัยซีตเป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรีย (Sykes และ Skinner, 1973) มีการดำรงชีวิตแบบ saprophytic เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสาร biopolymer ที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ เช่น ลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เคราติน เพคติน และไคติน โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* ส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายไคติน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน (Kutzner., 1981) นอกจากนี้มีรายงานว่า การเติมไคติน สามารถเพิ่มจำนวนแอกติโนมัยซีตในดินให้มากขึ้น (Gryndler et al., 2003) ดังนั้นดินร่วนปนปลวกจึงเป็นแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจในการแยกแอกติโนมัยซีต เนื่องจากดินร่วนปนปลวกมีการสะสมของไคตินซึ่งเกิดจากปีกและเปลือกผิวนอกของปลวกที่ตาย

แอกติโนมัยซีตเป็นแหล่ง bioactive metabolite มากมาย โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ ในปี 1995 สารปฏิชีวนะที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย 12,000 ชนิด พบว่าผลิตโดย *Streptomyces* ถึง 55% ในกลุ่มแอกติโนมัยซีตที่ไม่ใช่ *Streptomyces* 11 % แบคทีเรีย 12% และราสร้างเส้นใย 22% นอกจากสารปฏิชีวนะแล้ว แอกติโนมัยซีตยังสามารถผลิตสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง สารยับยั้งไวรัสอีกด้วย และนอกจากในด้านสาธารณสุข สารปฏิชีวนะยังถูกนำมาใช้ทางด้านการเกษตรโดยใช้ควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช เช่น การใช้ fungichomin ที่ผลิตโดย *Streptomyces padanus* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินในกล้วยที่ มีสาเหตุมาจาก *Rhizoctonia solani* (Shih et al., 2003) และใน

อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ มีการนำ virginiamycin ที่ผลิตโดย *Streptomyces virginiae* เพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (Hynes et al., 1997)

แม้ว่าสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตถูกค้นพบตั้งแต่ปี 1940 โดย Waksman และ Woodruff (Waksman และ Woodruff, 1940) แต่การค้นหาสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตยังคงดำเนินต่อไป เนื่องจากการพัฒนาของจุลินทรีย์ก่อโรคในการต้านทานสารปฏิชีวนะ เช่น ความต้านทานต่อยา methicillin ของ *Staphylococcus* (Glodman et al., 1996) การเกิดโรคใหม่เกิดขึ้นเช่น AIDS, Hanta virus, Ebola virus, *Cryptosporidium* (Strohl, 1997) และความเป็นพิษจากยาบางชนิดที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น Amphotericin B ทำให้เกิด nephrotoxicity ลดระดับการไหลของเลือดที่ไต คลื่นไส้อาเจียน และเบื่ออาหาร (Gupt et al., 2002) ดังนั้นการแยกแอกติโนมัยซีตที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์จากดินร้งปลวก อาจเป็นอีกขั้นหนึ่งในการพัฒนาอุตสาหกรรมยาต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อแยกแอกติโนมัยซีตจากดินร้งปลวกที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์จำแนกชนิดของแอกติโนมัยซีตที่คัดเลือก ผลิตสารปฏิชีวนะ สกัดแยก และวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะนั้น

ขั้นตอนการวิจัย

1. แยกแอกติโนมัยซีตจากดินร้งปลวก
2. ทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีต
3. จำแนกชนิดของแอกติโนมัยซีตที่คัดเลือกได้
4. ผลิต สกัดแยก และทำให้สารปฏิชีวนะบริสุทธิ์
5. วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ การผลิตและวิเคราะห์โครงสร้างสารปฏิชีวนะนั้น จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีต ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมยาต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

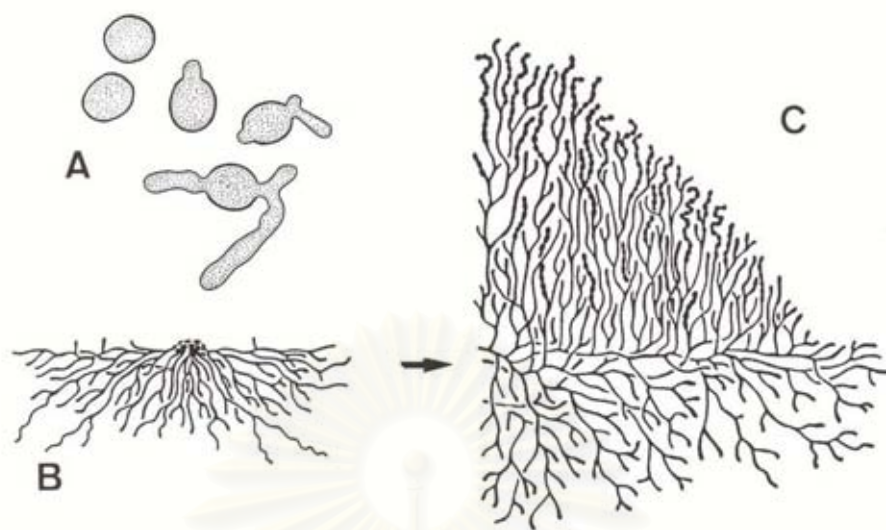
2.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีตเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ใน DNA สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป เช่น *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* (Kieser et al., 2000) แอกติโนมัยซีตถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไม่โตคอนเดรีย (Cross และ Goodfellow, 1973) นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีตยังประกอบด้วย mucopeptide (*N*-acetyl glucosamine เชื่อมกับ *N*-acetyl muramic acid) ; 2, 6- diaminopimelic acid; glutamic acid; glycine และ alanine (David, 1959; Waksman และ Henrici, 1974) ส่วนผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วย glucans, mannans และ chitin (Cummins, 1958) แต่แอกติโนมัยซีตมีลักษณะบางอย่างที่คล้ายกับราคือ มีการสร้างเส้นใย แต่เส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5–2.0 ไมโครเมตร มีการสร้างสปอร์บนสายใยอาหาร (substrate mycelium) และ/หรือสายใยอากาศ (aerial mycelium) มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือต่อกันเป็นสายยาว สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง เป็นวง ขดเป็นเกลียว อาจมีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์ (sporangium) เช่น *Actinoplanaceae* และ *Dactylosporangium* (Buchanan และ Gibbons, 1974) และพบการสร้าง clamydospores ใน *Actinosporangium violacles* (Krasil'nikov, 1981)

2.2 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีต

2.1.2 การสร้างโคโลนี

โคโลนีของแอกติโนมัยซีตเกิดจากการรวมกันของเส้นใย เป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แสดงดังรูปที่ 2.1 เริ่มจากการลงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่หัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม รูป 2.1(A) จากนั้นหัวเชื้อมีการพัฒนาเป็นสายใยอาหาร รูป 2.1(B) และสายใยอาหารเจริญโดยการแทงผ่านอาหารขึ้นมาเป็นสายใยอากาศ รูป 2.1(C) ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง จากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนีเช่น การสร้างสปอร์ การสร้างสปอร์และการแบ่งตัวของเส้นใยเริ่มจากการสร้างผนังกัน โดยทั่วไปเส้นใยมักมีผนังกันชั้นเดียวเพื่อความคงตัว และสร้างเป็นเส้นใยแข็ง (Kalakoutskii และ Agre, 1976)



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีต [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่นใน *Streptomyces* มีทั้งสายใยอาหารและสายใยอากาศซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี ใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีสายใยอากาศ ส่วน *Sporichthya* การสร้างเส้นใยถูกจำกัดทำให้มีสายใยอากาศสั้น โคโลนีอาจฟูหรือเรียบแบน บางครั้งมีลักษณะคล้ายหนัง มีความหลากหลายตั้งแต่นุ่มเหนียว จนถึงแข็ง สีของโคโลนีมีสี ขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง ฟ้ำ เขียว น้ำตาลดำ ผิวของโคโลนีอาจเรียบ นูน ขรุขระ เป็นเม็ดเล็ก หรือเป็นเกล็ด ขนาดของโคโลนีขึ้นกับสปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร

2.2.2 โครงสร้างภายในเส้นใย

เส้นใยเดี่ยวมีความหนาประมาณ 0.4 – 1.2 ไมโครเมตร มีผนังกัน และเจริญออกทางด้านปลายสามารถแตกแขนงได้ โครงสร้างหลักในเส้นใยที่แสดงว่าเป็นโปรคาริโอตคือ ในไซโตพลาสซึม ประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น polyphosphate, lipid หรือ polysaccharides เยื่อหุ้มเซลล์ติดกับไซโตพลาสซึมอาจเกิดเป็นมิโซโซม ซึ่งมักจะต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์

2.2.3 ชนิดของสปอร์

แอกติโนมัยซีตมีการสร้างสปอร์แบ่งเป็น 3 ประเภทตามลักษณะโครงสร้างภายนอกคือ สปอร์เดี่ยว เป็นสาย และสร้างสปอร์ในอับสปอร์

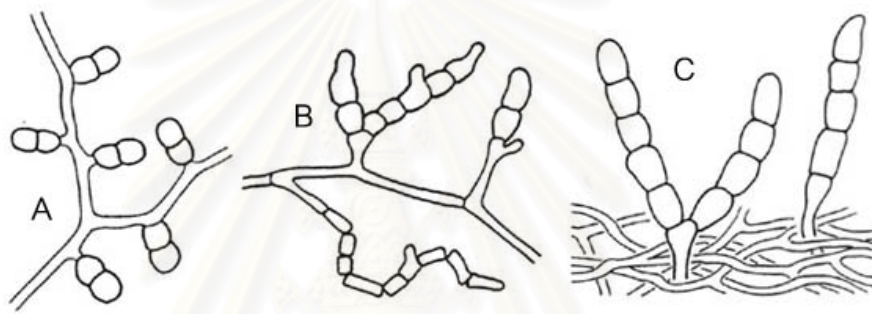
1. การสร้างสปอร์เดี่ยว การสร้างสปอร์เดี่ยวเรียกว่า monosporous พบในหลายสกุล ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (sporophore) เกิดขึ้นบนสายใยอาหาร สปอร์ติดอยู่ที่ฐานหรืออาจติดอยู่กับก้านสั้นๆ หรือแยกออกมาเดี่ยวๆ การสร้างสปอร์เริ่มจากส่วนปลายของเส้นใยมีการพองตัว จากนั้นมีการสร้างผนังกัน และสร้างเป็นผนังสปอร์ (Kawamoto, 1989) *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนสายใยอากาศ ที่ปลายก้านชูสปอร์ ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์ สกุลอื่นๆ ที่สร้างสปอร์เดี่ยวคือ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์ไม่แตกแขนง ถ้าใช้ศัพท์ทางราอาจเรียกการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* ว่า aleuriospores เพราะ สปอร์เกิดจากปลายเส้นใยที่แตกแขนงมีการโป่งออก (McCarthy, 1989) ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การสร้างสปอร์เดี่ยวของ A. *Micromonospora* B. *Thermomonospora* และ C. *Saccharomonospora* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

2. การสร้างสปอร์เป็นสาย ในแอกติโนมัยซีตมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก ตามศัพท์แล้วสามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์ โดยพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนของสปอร์ นั่นคือ di- หรือ bisporous, oligosporous และ polysporous

สาย bisporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก สปอร์ทรงรี 2 สปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนสายใยอากาศโดยตรง หรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้นๆ ลักษณะสปอร์ของ *Microbispora* แสดงดังรูป 2.3 การสร้างสปอร์เริ่มจากเส้นใยอากาศแตกหน่อออกทางด้านข้าง เป็นกิ่งสั้นๆ จากนั้นมีการพองออกและสร้างผนังกันตรงกลาง การจัดจำแนกกลุ่มใหม่และลักษณะใหม่ชี้ให้เห็นว่าลักษณะสาย disporous ไม่ได้พบในสกุล *Microbispora* เท่านั้น ลักษณะสปอร์สอง สปอร์ที่ต่อกันแนวยาวยังพบใน *Actinomadura echinospora* และ *Actinomadura rugatobispora* (Kroppenstedt et al., 1990; Miyadoh et al., 1990) นอกจากนี้สกุล *Actinobispora* มีสปอร์แบบ disporous เช่นเดียวกัน (Jiang et al., 1991)



รูปที่ 2.3 A. การสร้างสปอร์แบบ disporous ของ *Microbispora*

B. และ C. การสร้างสปอร์แบบ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

แอกติโนมัยซีตที่สร้างสปอร์แบบ oligosporous พัฒมาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ *Nocardia brevicatena* สร้างสายสปอร์สั้นๆคือ 2-7 สปอร์ดังรูป 2.3 บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ ก้านชูสปอร์และสายสปอร์มีการแตกแขนง มีการแตกหักของเส้นใยอาหาร ในสปีชีส์ *Saccharopolyspora rectivirgula* (Korn-Wendisch et al., 1989) ในสายสปอร์มีสปอร์ต่อกันน้อยกว่า 5 สปอร์ บนด้านข้างหรือปลายของก้านชูสปอร์ *N. brevicatena* และ *S. rectivirgula* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน สปีชีส์ในสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspora* สร้างสายสปอร์สั้นๆบนสายใยอากาศ จำนวนสปอร์บนสายสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์พบในสกุล *Microtetraspora* และจนถึง 10-20 สปอร์ สายสปอร์อาจตรง เป็นขอ มีลักษณะเป็นวงเปิด (open loop) หรือเป็นเกลียว (spiral) ชั้น 1 ชั้นจนถึง 4 ชั้น เช่น *Actinomadura pusila* ในสกุล *Streptoverticillium* มีลักษณะเฉพาะคือก้านชูสปอร์อยู่เป็นวงรอบเส้นใยแกน สายสปอร์เป็น

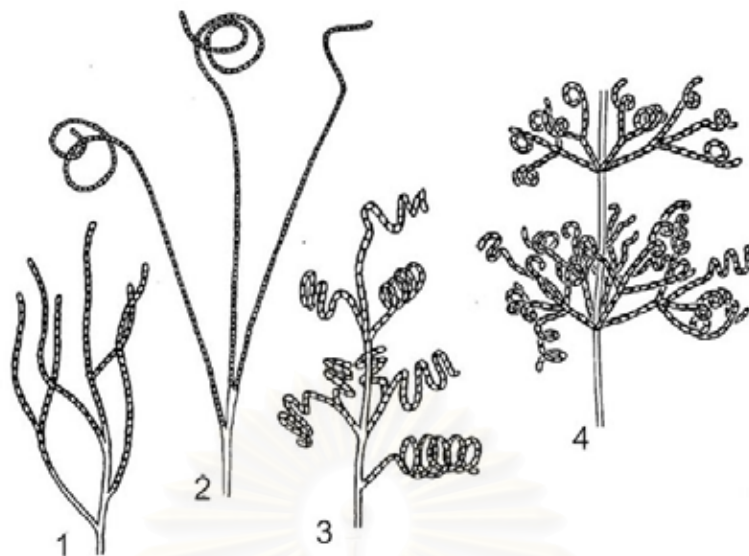
เกลียวซ้อนติดกัน เส้นใยแกนที่มีสายสปอร์จะเกิดการบิด (Locci และ Baldan, 1971) สายสปอร์สั้นอาจจะตรง โค้งงอ ปลายเป็นขอ (Locci และ Schofield, 1989) การสร้างสปอร์ในสกุล *Macrospora*, *Microcelobosporia* และ *Elytrosporangium* มีลักษณะสปอร์ใหญ่บนสายสปอร์สั้น หรือสายสั้นบนสายใยอาหาร (Cross และ Alderson, 1988) สายสปอร์สั้นพบใน *Sporichthya polymorpha* ซึ่งสายใยอากาศมีสปอร์เป็นรูปแท่งจนถึงสปอร์กลม (Lechevalier และ Lechevalier, 1989) *Catellatospora* สายสปอร์มีลักษณะตรงจนถึงโค้งงอ มีสปอร์ 5 - 30 สปอร์ ซึ่งแทงขึ้นมาจากอาหารเป็นสายสั้น ไม่แตกแขนง หรือมีก้านชู สปอร์ที่แตกแขนง แสดงดังรูปที่ 2.3 (Asano และ Kawamoto, 1986)

แอกติโนมัยซีตที่สร้างสปอร์มาก(polysporous) ที่สำคัญคือ สปีชีส์ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งมีการสร้าง สปอร์เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ สปอร์ของ *Streptomyces* และแอกติโนมัยซีตชนิดอื่นที่มี สปอร์มากมักเรียกว่า arthospores ซึ่งสอดคล้องกับ arthospores ของราในกลุ่ม Deuteromycota ที่มีการสร้างสายสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ (Ettlinger et al., 1958 ; Pridham et al., 1958 ; Korn-Wendisch และ Kutzner, 1992) การสร้างสปอร์บนสายใยอากาศของ *Streptomyces* มีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

1. Rectiflexibiles ; ลักษณะของสายสปอร์ตรง หรือโค้งงอ
2. Retinaculiaperti ; สายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิด หรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1-3 ชั้น
3. Spira ; สายสปอร์เป็นเกลียว แยกได้เป็น 2 แบบคือเป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่น และ เป็นเกลียวแบบวงเปิด เกลียวยาว ยึด ไม่ติดกันแน่น
4. Verticillati ; สายสปอร์ขดคล้ายกันหอย และแตกแขนงออกเป็นข้อ

การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาว (แสดงดังรูปที่ 2.4)

ในบางกรณีสายสปอร์เป็นเกลียวขดกันแน่นและแยกออกมาทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์หรือ pycnidia นอกจากนี้ในวงศ์ *Pseudonocardiaceae* ส่วนมากจะมีการสร้างสปอร์จำนวนมาก (Embley, 1992) *Pseudonocardia* เกิดสายสปอร์บนสายใยอาหารและสายใยอากาศ อีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวคือ *Nocardiosis* ซึ่งเกิดขึ้นบนสายใยอากาศ อาจเป็นสายตรงหรืองอ หรือซิกแซก (Meyer, 1989)



รูปที่ 2.4 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces* 4 ลักษณะคือ

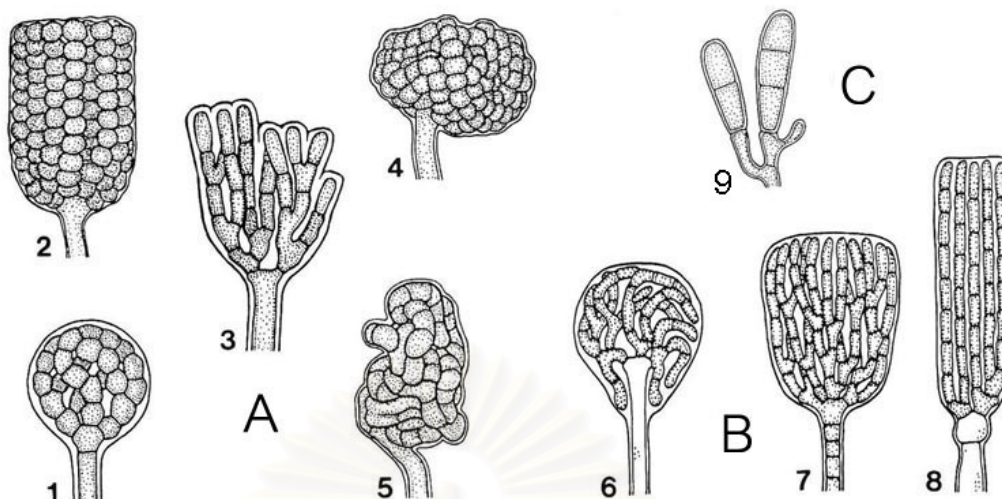
1. Rectiflexibiles 2. Retinaculiaperti 3. Spira 4. Verticillati

[ที่มาจาก Atlas of Actinomycetes (1997)]

3. การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมาย สามารถแบ่งกลุ่มการสร้างอับสปอร์ได้เป็นสองกลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหารและกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศ

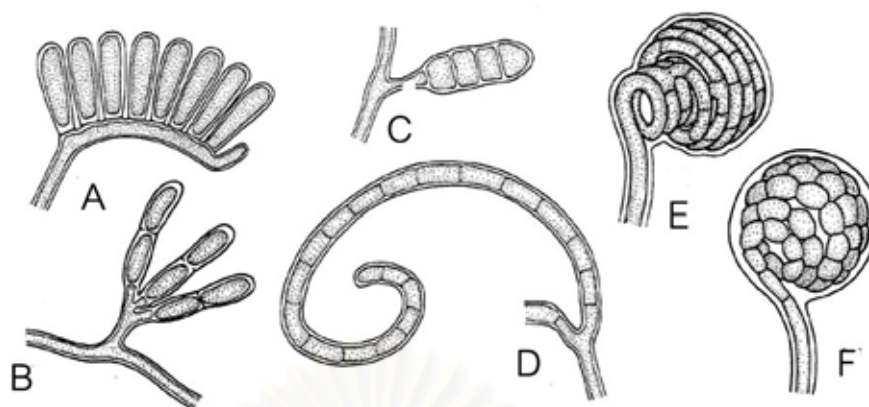
กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะ ทรงกลม หรือเกือบกลมจนถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-15 ไมโครเมตร และอยู่บนสายใยอาหารโดยตรง มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงขดกันเป็นก้อน อยู่ภายในผนังห่อหุ้มแสดงดังรูป 2.5 สปีชีส์ *Ampullariella* ในสกุล *Actinoplans* สร้างอับสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันไป คือ รูปทรงกระบอก ทรงขวด เป็นตุ่ม จนถึงไม่เป็นรูปทรงแสดงดังรูป 2.5 ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยอยู่ที่ กว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย (Couch, 1963 ; Vobis, 1987)

อีกสกุลที่มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์คือ *Pilimelia* อับสปอร์สร้างขึ้นบนผิวของอาหาร มีรูปทรงกระบอก ทรงกลม ขนาดประมาณ 10-15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกันหรือ วกวนไม่เป็นระเบียบ (Vobis, 1984) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายสกุลที่มีการสร้างอับสปอร์เช่น สกุล *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจำนวนสปอร์แบบ oligosporous คือมีสปอร์ประมาณ 2-5 สปอร์อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้ว แสดงดังรูปที่ 2.5 (Vobis และ Kothe, 1985)



รูปที่ 2.5 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนสายใยอาหาร A. สกุล *Actinoplanes* (รวมถึง *Ampullariella*): 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู 4. กิ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง
B. สกุล *Pilimelia* : 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก
C. สกุล *Dactylosporangium* : 9. รูปทรงกระบอก [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนสายใยอากาศแสดงดังรูปที่ 2.6 ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* มีอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในมีเพียงหนึ่งสปอร์ (Vobis, 1986) สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ในอับสปอร์ (Thiemann และ Beretta, 1968) สกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมีสี่สปอร์ ต่อกันเป็นหนึ่งแถว (Runmao Guizhen และ Junying, 1993) สกุล *Planopolyspora* มีสปอร์จำนวนมากภายในอับสปอร์ เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบนยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมากต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ใน (Petroliini et al., 1993) สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเป็นสปอร์เดี่ยวต่อกันเป็นสายยาวขดเป็นวงอยู่ในอับสปอร์ (Williams และ Sharples, 1976 ; Petroliini et al., 1992) ในปัจจุบันสกุล *Kutzneria* ได้ถูกแยกออกจากสกุล *Streptosporangium* มีอับสปอร์ลูกกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 48 ไมโครเมตร และมีผนังอับสปอร์บาง อยู่บนก้านชูสปอร์ยาว สกุล *Spirillospora* มีอับสปอร์เป็นทรงกลม หรือรูปร่างเหมือนหนอน (vermiform) เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-24 ไมโครเมตร สปอร์เรียงตัวเป็นสายแตกแขนง หรือเป็นวง สปอร์เป็นรูปแท่ง และโค้งงอ (Vobis, 1986)



รูปที่ 2.6 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนสายใยอากาศ

A. สกุล *Planomonospora* : monosporous, รูปทรงของ B. สกุล *Planobispora* : disporous, ทรงกระบอก C. สกุล *Planotatraspora* : tetrasporous, ทรงกระบอก D. สกุล *Planopolyspora* : polysporous, รูปทรงคล้ายท่อ E. สกุล *Spirillospora*: polysporous, ทรงกลม และ F. สกุล *Streptosporangium* : polysporous, ทรงกลม [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

2.3 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีต

โดยทั่วไปข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีตคือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่น ลักษณะของสายใยอากาศ สายใยอาหาร โคนิเดีย (conidia) และอับสปอร์ นอกจากนี้ลักษณะทางเคมีของเซลล์ คือ dibasic amino acid ในผนังเซลล์ และการวิเคราะห์น้ำตาลภายในเซลล์ที่ถูกละลาย สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีตได้อีกด้วย จากการวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีของเซลล์ Williams และคณะในปี 1989 ได้แบ่งผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีตออกได้เป็น 4 ชนิด แสดงดังตารางที่ 2.1 ผนังเซลล์ชนิด I คือมี diaminopimelic acid (DAP) ที่มีไอโซเมอร์แบบ L พบในกลุ่มของ *Streptomyces* และสกุลที่ใกล้เคียง ซึ่งทำให้สามารถจำแนกกลุ่มดังกล่าวออกจากแอกติโนมัยซีตกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดผนังเซลล์และน้ำตาลภายในผนังเซลล์ของ
แบคทีเรียแอคติโนมัยซีต (Williams et al., 1989)

ชนิดผนังเซลล์	รูปแบบของกรดอะมิโนและน้ำตาล	
I	<i>L</i> - diaminopimelic acid	ไกลซีน
II	<i>meso</i> * diaminopimelic acid	ไกลซีน
III	<i>meso</i> diaminopimelic acid	ไม่พบไกลซีน
IV	<i>meso</i> diaminopimelic acid	อะราบิโนส กาแลคโตส ไม่พบไกลซีน

* อาจพบในรูปของ 3- hydroxy aminopimelic acid

นอกจากนี้องค์ประกอบอื่นที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีต คือ ลักษณะรูปร่างและสีของสายใยและสปอร์ การสร้างรงควัตถุที่แพร่สู่อาหาร (diffusible pigment) การสร้างรงควัตถุเมลานิน และการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

ตามรายละเอียดข้างต้นสามารถใช้ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซีตออกได้เป็น 8 กลุ่มใหญ่ (Holt et al, 1994) คือ

1. Nocardioform actinomycetes

กลุ่มนี้มีลักษณะแตกต่างกัน ส่วนมากมีการแตกหักของเส้นใย บางสกุลมีการสร้างสายใยอากาศ อาจมีหรือไม่มี mycolic acids สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

- 1.1 แอคติโนมัยซีตที่พบ mycolic acid
- 1.2 *Pseudonocardia* และสกุลใกล้เคียง
- 1.3 *Nocardioides* และ *Terrabacter*
- 1.4 *Promicromonospora* และสกุลใกล้เคียง

2. Actinomycetes with multilocular sporangia

กลุ่มนี้เส้นใยมีการสร้างผนังกันแบ่งตามยาวและตามขวาง มีการสร้างอับสปอร์ขนาดใหญ่ สปอร์อาจเคลื่อนที่ได้ เช่นสกุล *Dermatophilus* และ *Geodermatophilus* เป็นต้น หรือเคลื่อนที่ไม่ได้ ได้แก่สกุล *Frankia*

3. Actinoplanetes

มีการสร้างเส้นใยที่แข็งแรง ไม่พบการสร้างสายใยอากาศหรือมีการสร้างน้อย สปอร์เคลื่อนที่ได้เกิดในอับสปอร์ (*Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium* และ *Pilimelia*) หรือสร้างสปอร์เดี่ยวที่ไม่เคลื่อนที่ได้แก่ *Micromonospora* หรือสปอร์ต่อกันเป็นสายได้แก่

Catellatospora ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP และไกลซีน ในเซลล์ที่ถูกย่อยพบอะราบิโนส และไซโลส

4. Streptomyces และสกุลที่ใกล้เคียง

ผนังเซลล์ประกอบด้วย L-DAP และไกลซีน มีการสร้างสายใยอากาศ สปอร์ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ *Streptomyces* และ *Streptovercillium* ในสกุลอื่นคือ *Intrasporangium*, *Kineosporia* และ *Sporichthya* มีการสร้างสายใยอากาศน้อย หรือไม่สร้าง และมีการสร้างสปอร์ในลักษณะที่แตกต่างกันไป

5. Maduromycetes

สร้างสปอร์สายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ มีการสร้างสปอร์สองสปอร์พบในสกุล *Microbispora* การสร้างสปอร์สี่สปอร์ พบในสกุล *Microtetraspora* และใน *Actinomadura* มีการสร้างสปอร์ที่หลากหลาย ในบางสกุลมีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์และสปอร์เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Planobispora*, *Planomonospora* และ *Spirillospora* หรือสปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ ได้แก่ *Streptosporangium* ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP ในเซลล์ที่ถูกย่อยพบ madurose

6. Thermomonospora และสกุลใกล้เคียง

สร้างสปอร์บนสายใยอากาศ อาจเป็นสปอร์เดี่ยว ได้แก่ *Thermomonospora* สปอร์ต่อกันเป็นสาย พบใน *Actinosynnema* และ *Nocardiopsis* หรือสร้างสปอร์ในโครงสร้างที่คล้ายกับอับสปอร์คือ *Streptoalloterichus* ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP

7. Thermoactinomycetes

ประกอบด้วยสกุล *Thermoactinomyces* เพียงสกุลเดียว สร้างสปอร์เดี่ยวซึ่งเป็น endospore มีการสร้างทั้งสายใยอากาศ และสายใยอาหาร ทุกสปีชีส์เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง(thermophilic) ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP

8. สกุลอื่นๆ

เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจัดเข้าในกลุ่มอื่นได้ ประกอบด้วยสกุล *Kitasatospora*, *Glycomyces*, *Kibdelosporangium* และ *Saccharothrix* ทุกสกุลมีการสร้างสายสปอร์บนสายใยอากาศ

2.4 การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีต

พบแอกติโนมัยซีตได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ในดินสามารถพบแอกติโนมัยซีตเป็นที่สองรองจากแบคทีเรีย (Sykes และ Skinner, 1973) ดำรงชีวิตแบบ saprophytic เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลายสาร biopolymers ที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น ลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน เคราติน และไคติน นอกจากนี้ในปมรากพืชพบแอกติโนมัยซีตที่สามารถตรึงไนโตรเจนคือสกุล *Frankia* อาศัยอยู่ร่วมกับไม้ดอกมากกว่า 200 สปีชีส์ (Mincer et al., 2002) บริเวณผิวดิน (0-20 ซม.) มีประชากรของแอกติโนมัยซีตสูงกว่าในดินที่ลึกลงไป 21 – 40 ซม. (Yang et al., 2003) ในการสำรวจความหลากหลายของแอกติโนมัยซีตในดินในป่าเขตร้อน ประเทศสิงคโปร์ พบแอกติโนมัยซีตสกุล *Streptomyces* มากที่สุด รองลงมาคือ *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Actinomadura*, *Nonomuria*, *Nocardia* และ *Streptosporangium* ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าป่าฝนเขตร้อนมีความหลากหลายของแอกติโนมัยซีตมาก จึงเป็นแหล่งหนึ่งที่สำคัญในการค้นพบสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ (Wang et al., 1999) ในแหล่งดินภูเขาที่เก็บจากระดับความสูง 3,000 – 3,900 เมตร จากระดับน้ำทะเล ในมณฑลยูนนาน ประเทศจีน พบ *Streptomyces* ถึง 99% ของแอกติโนมัยซีตที่พบทั้งหมด (Xu et al., 1996) แม้ในดินตัวอย่างที่แตกต่างกัน มักพบ *Streptomyces* จำนวนมากที่สุดในกลุ่มแอกติโนมัยซีต ดังรายงานของ Park และคณะ (1999) ทำการแยกแอกติโนมัยซีตจากตัวอย่างดินจากถ้ำหินปูนและดินบริเวณรากพืช สามารถแยกแอกติโนมัยซีตได้ทั้งหมด 162 สายพันธุ์จากดินในถ้ำ และจากดินบริเวณรากพืช 295 สายพันธุ์ พบว่า *Streptomyces* เป็นสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในทั้งสองแหล่ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความหลากหลายของ แอกติโนมัยซีตที่สามารถยับยั้งราจากดินใน 14 เขตที่แตกต่างกัน ทางตะวันตกของประเทศเกาหลี สามารถแยกแอกติโนมัยซีตได้ทั้งหมด 1,510 สายพันธุ์ พบว่า *Streptomyces* เป็นประชากรหลักในทุกดินตัวอย่าง และมากกว่า 50% ของแอกติโนมัยซีตทั้งหมดที่สามารถยับยั้งราได้คือสกุล *Streptomyces* (Lee และ Hwang, 2002)

จากรายงานข้างต้น ชี้ให้เห็นว่า *Streptomyces* เป็นประชากรหลักของแอกติโนมัยซีตที่อาศัยอยู่ในดิน ดังนั้นสกุลอื่นที่นอกเหนือจาก *Streptomyces* จึงจัดเป็นแอกติโนมัยซีตที่หายาก (rare actinomycetes) เช่น *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Planobispora*, *Streptosporangium* และ *Planomonospora* (Lazzarini et al., 2000) จึงมีวิธีที่จำเพาะในการแยกแอกติโนมัยซีตกลุ่มนี้ ดังรายงานต่อไปนี้

Suzuki และคณะ (2001) แยกสกุล *Planomonospora* จากดิน โดยใช้อาหาร Humic acid-trace salts gellan gum (pH 9) เป็นอาหารที่ใช้คัดเลือก โดย *Planomonospora* สร้างอับสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถแยกสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้จากอับสปอร์ โดยใช้ 0.1 % skim milk 5 mM *N*-cyclohexyl-2-amino-ethanesulfonic acid (CHES) (pH 9) เป็นสารละลายในการล้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ออกมา จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 °C เป็นเวลา 90 นาที แยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที วิธีนี้สามารถแยกสกุล *Planomonospora* ได้ 246 สายพันธุ์ จากดินตัวอย่างทั้งหมด 1,200 ตัวอย่าง และมีรายงานว่า *Planomonospora parontospora* var. *antibiotica* สร้างสารปฏิชีวนะ sporangiomycin (Thiemann et al., 1968)

Suzuki และคณะ (2000) แยกสกุล *Actinobispora* จากดิน โดยการอบดินตัวอย่างที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.85% NaCl 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสปอร์ เจือจางสารละลายสปอร์ด้วย 0.85% NaCl และนำมาสเปรทบนอาหาร Humic acid-vitamin gellan gum (HVG) ที่เติมสารปฏิชีวนะ leucomycin 1 µg/ml nivobiocin 1 µg/ml, tunicamycin 0.5 µg/ml, cycloheximide 50 µg/ml และ nystatin 50 µg/ml การใช้วิธีนี้สามารถแยกสกุล *Actinobispora* ได้ 18% ของตัวอย่างดิน

Suzuki และคณะ (1999) แยกสกุล *Sporichthya* จากดิน ที่มีการสร้าง zoospore โดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 60 นาที เพื่อลดจำนวนของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่แอกติโนมัยซีต จากนั้นเติมสารละลาย 0.1% skim milk ใน 10 mM MOPs (morpholinepropanesulfonic acid) (pH 8) ในดินที่อบแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 60 นาที แยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000x g เป็นเวลา 10 นาที เจือจางสปอร์ใน 0.85% NaCl นำสารละลายสปอร์ สเปรทบนอาหาร Humic acid-vitamin agar (HVG)

Hayakawa และคณะ (1996) แยก *Microtetraspora glauca* และแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใกล้เคียงจากดิน นำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 110 °C อุณหภูมิ 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปิเปตสารละลายดิน 0.5 มิลลิลิตรที่ระดับการเจือจาง 10^{-1} เติมนลงในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (5 mmol/l pH 7.0) 5 มิลลิลิตร ที่มีการเติม benzethonium 0.05% บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร สเปรทบนอาหาร LSV-SE agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 20 mg norfloxacin 20 mg และ nalidixic acid 10 mg/l

Hayakawa และคณะ (1995) แยก *Actinomadura viridis* จากดิน นำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 60 นาที เจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.0 % นำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.2 มิลลิลิตร มาสเปรทบนอาหาร Humic acid-

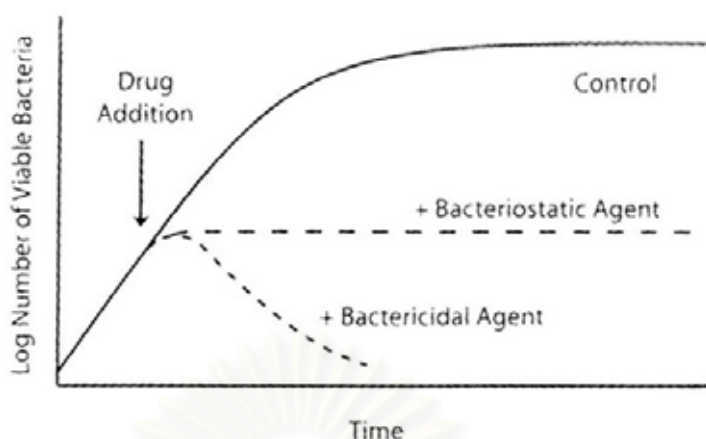
vitamin (HV) agar ที่ผสม kanamycin, josamycin, lysozyme และ nalidixic acid มีรายงานว่าสกุล *Actinomadura* สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ maduramicin, esperamicins และ pradimicins (Kroppenstedt et al., 1990)

จากรายงานข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าการแยกแอกติโนมัยซีต ในสกุลที่จำเพาะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลักด้วยกันคือ pretreatment อาจทำโดยการอบดินด้วยความร้อน ใช้สารเคมี เพื่อทำลายแบคทีเรียที่ไม่สร้างเส้นใย หรือใช้ polyvalent phage เพื่อลดจำนวนของ *Streptomyces* (Kurtboke et al., 1992) ที่เป็นประชากรหลักในดิน และสองคือ การใช้อาหารที่จำเพาะต่อสายพันธุ์นั้นๆ อาจมีการเติมสารปฏิชีวนะในความเข้มข้นที่สายพันธุ์นั้นต้านทานได้ และสามารถยับยั้งสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้การเติมสารบางอย่างสามารถกระตุ้นการเจริญของแอกติโนมัยซีต ดังรายงานของ Grynder และคณะ (2003) พบว่าการเติมไคตินเป็นการเพิ่มจำนวนแอกติโนมัยซีตในดินมากขึ้น

2.5 สารปฏิชีวนะ (antibiotic)

สารปฏิชีวนะหมายถึงสารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ โดยส่วนมากจะเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีมวลโมเลกุลต่ำ สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ความเข้มข้นน้อยๆ (Demain, 1999) และจะไม่รวมถึงสารสกัดจากพืชหรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ เพราะสารเหล่านี้ใช้ความเข้มข้นสูงในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ ปัจจุบันสารปฏิชีวนะอาจรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้สารปฏิชีวนะเป็นต้นแบบด้วย (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

การทำงานของสารปฏิชีวนะแบ่งออกเป็น 2 แบบคือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbistatic และฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbicidal ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbistatic ร่างกายจะกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้ระบบการป้องกันของร่างกายคือ phagocytosis การผลิตแอนติบอดี การผลิต interferon เมื่อมีการติดเชื้อจากไวรัส หรือ กลไกการปฏิเสธรของลำไส้โดยเกิดอาการท้องเสีย อาเจียน ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbicidal จะฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการทำให้เซลล์แตก แต่ร่างกายยังคงได้รับผลจากสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น (Edwards, 1980) รูปที่ 2.7 แสดงการทำงานของสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเรียกว่า bacteristatic เช่นการทำงานของ chloramphenicol และสารปฏิชีวนะที่ฆ่าเซลล์แบคทีเรียเรียกว่า bactericidal ซึ่งสังเกตจากจำนวนของแบคทีเรียลดลง เช่นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycosides



รูป 2.7 ผลของสารปฏิชีวนะแบบ bacteriostatic และ bacteriocidal ต่อการเจริญของแบคทีเรีย
[ที่มา Scholar และ Pratt, (2000)]

2.6 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีต

แอกติโนมัยซีตเป็นแหล่งที่สำคัญของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ ในปี 1994 Berdy อ้างอิงโดย Kieser และคณะ (2000) รายงานว่า แอกติโนมัยซีตผลิตสารปฏิชีวนะ 66% ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ทั้งหมด รองลงมาคือรา 22% และแบคทีเรีย 12% แสดงดังตารางที่ 2.2 ในกลุ่มของแอกติโนมัยซีตที่ผลิตสารปฏิชีวนะ ผลิตโดย *Streptomyces* 80% รองลงมาคือ *Micromonospora*

ตารางที่ 2.2 จำนวนของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิโดยประมาณที่ผลิตโดยจุลินทรีย์หลายกลุ่ม อ้างอิงในปี 1994 [ที่มา Kieser และคณะ (2000)]

แหล่งที่ได้	สารเมตาบอไลต์		
	สารปฏิชีวนะ	สารอื่นๆ	ปริมาณรวม
แบคทีเรีย	1400 (12%)	240 (9%)	1640 (11%)
แอกติโนมัยซีต	7900* (66%)	1220* (40%)	9120* (61%)
รา	2600 (22%)	1540 (51%)	4140 (28%)
จุลินทรีย์ทุกชนิด	11900 (100%)	3000 (100%)	14900 (100%)

* หมายถึง สามารถพบได้จาก *Streptomyces* ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และพบได้จากแอกติโนมัยซีตกลุ่มอื่น ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

2.7 กลุ่มของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีต

1. สารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides

สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย amino sugar ที่เชื่อมกันแบบ glycoside linkage โครงสร้างพื้นฐานแสดงดังรูปที่ 2.8

กลไกการออกฤทธิ์ แบบ bactericide ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยจับกับไรโบโซมในสหรัฐอเมริกาสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมี 8 ชนิด แสดงดังตารางที่ 2.3 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycosides แสดงดังรูปที่ 2.8 และ 2.9

ตารางที่ 2.3 สารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย

สารปฏิชีวนะ	ผลิตโดย
1. Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>
2. Neomycin	<i>S. fradiae</i>
3. Kanamycin	<i>S. kanamyceticus</i>
4. Tobramycin	<i>Streptomyces</i> sp.
5. Paromomycin	<i>S. rimosus</i>
6. Gentamicin	<i>Micromonospora purpura</i>
7. Netilmicin	<i>Micromonospora</i> sp.
8. Amikacin	ผ่านขั้นตอนทางเคมีของ kanamycin

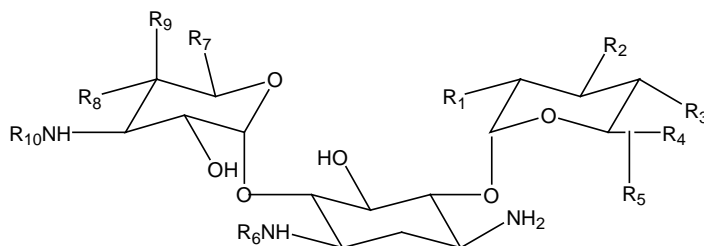
ที่มา Scholar และ Pratt, (2000) ; Edwards, D., (1980)

2. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline

สูตรโครงสร้างพื้นฐาน ซึ่งได้มาจาก hydronaphthacene nucleus ที่มีวงต่อกัน 4 วง รูปโครงสร้าง tetracycline และอนุพันธ์ แสดงดังรูปที่ 2.10

กลไกการออกฤทธิ์ เป็นแบบ bacteriostatic กับจุลินทรีย์แบบ broad-spectrum ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึงเป็น bactericide ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยจับกับไรโบโซม และ mRNA

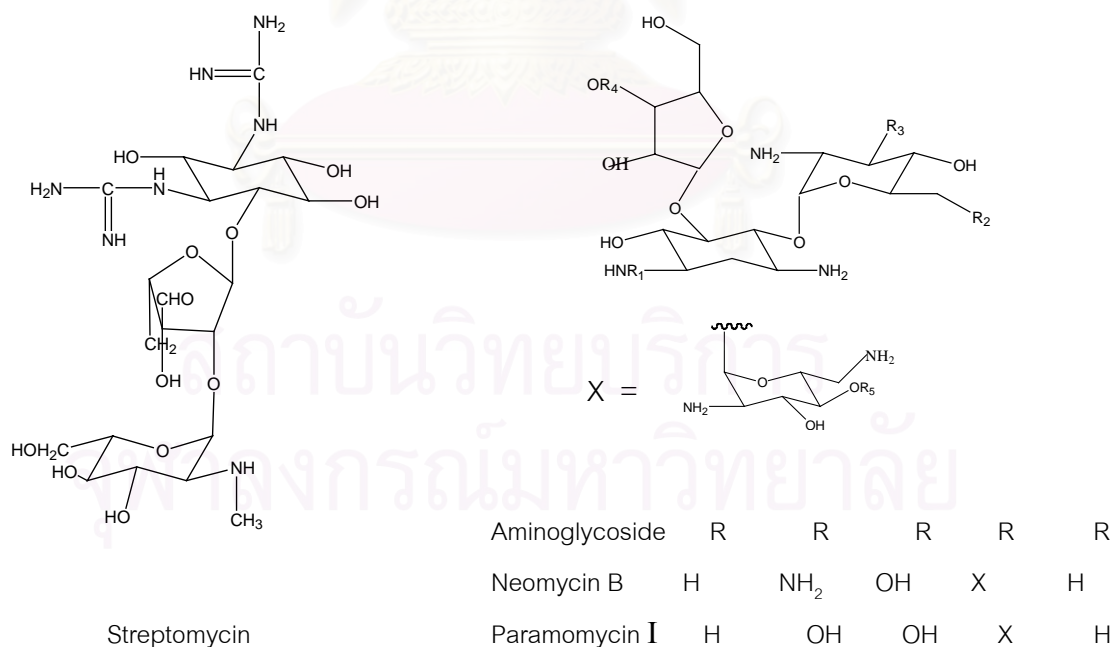
Tetracycline ผลิตโดย *Streptomyces* หลายสปีชีส์ สารประกอบในกลุ่มนี้มีการค้นพบครั้งแรกในปี 1948 คือ chlortetracyclin (aureomycin)



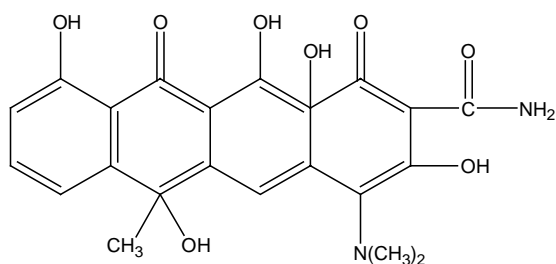
Aminoglycoside	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
Kanamycin A	OH	OH	OH	H	NH ₂	H	CH ₂ OH	OH	H	H
Kanamycin B	NH ₂	OH	OH	H	NH ₂	H	CH ₂ OH	OH	H	H
Kanamycin C	NH ₂	OH	OH	H	OH	H	CH ₂ OH	OH	H	H
Amikacin	OH	OH	OH	H	NH ₂	COR'	CH ₂ OH	OH	H	H
Tobramycin	NH ₂	H	OH	H	NH ₂	H	CH ₂ OH	OH	H	H
Gentamicin B	OH	OH	OH	H	NH ₂	H	H	CH ₃	OH	CH ₃
Netilmicin	-	-	-	-	-	CR''	H	CH ₃	OH	CH ₃

R' = CHO(CH₂)₂NH₂ R'' = CH₂CH₃

รูปที่ 2.8 โครงสร้างพื้นฐานและตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides (Mingot-Lecercq et al., 1999)



รูปที่ 2.9 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides (Mingot-Lecercq et al., 1999)



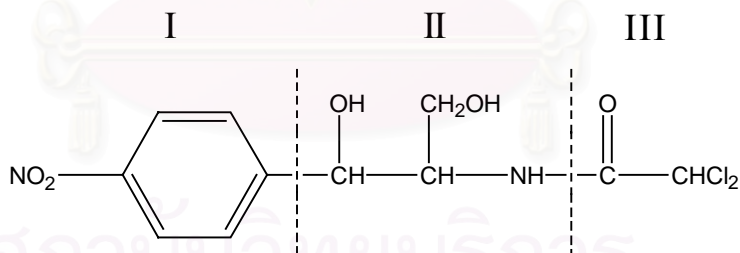
รูปที่ 2.10 โครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline (Scholar และ Pratt, 2000)

3. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Chloramphenicol

สูตรโครงสร้างพื้นฐาน แสดงดังรูป 2.11 **I** วงอะโรมาติก **II** ส่วนนี้มีการขยายได้ การแทนที่ไม่ทำให้ลดประสิทธิภาพ bacteriostatic **III** acyl side chain

กลไกการออกฤทธิ์ เป็นแบบ bacteriostatic หยุดการสังเคราะห์โปรตีนอย่างรวดเร็ว แต่ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

Chloramphenicol เป็นสารปฏิชีวนะตัวแรกที่เป็น broad spectrum ผลิตจากแอคติโนมัยซีตที่แยกได้จากดินคือ *Streptomyces venezuelae*



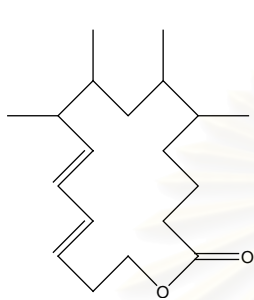
รูปที่ 2.11 โครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม Chloramphenicol (Scholar และ Pratt, 2000)

4. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide

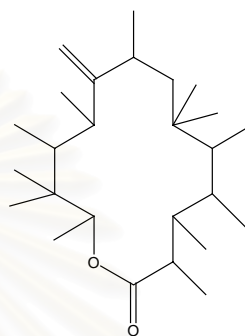
สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ประกอบด้วยอะตอมคาร์บอนมากกว่า 20 อะตอมขึ้นไป โดยมี macrocyclic lactone ring เป็นองค์ประกอบ สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ 16 member's และ 14 member's macrolides แสดงดังรูปที่ 2.12

กลไกการออกฤทธิ์ เป็นแบบ bacteriostatic ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยจับกับ 50S subunit ของ 70S ไรโบโซม

สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ erythromycin ผลิตโดย *Streptomyces erythreus* และ lincomycin ผลิตโดย *S. linconensis* สูตรโครงสร้าง erythromycin และ lincomycin แสดงดังรูปที่ 2.13

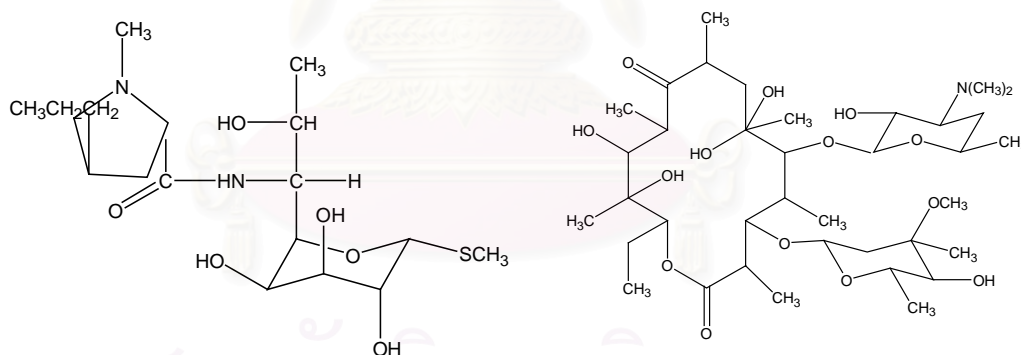


16 member's macrolides



14 member' s macrolides

รูปที่ 2.12 โครงสร้างพื้นฐานสารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide (ดวงพร คันธโชติ, 2530)



Lincomycin

Erythromycin A

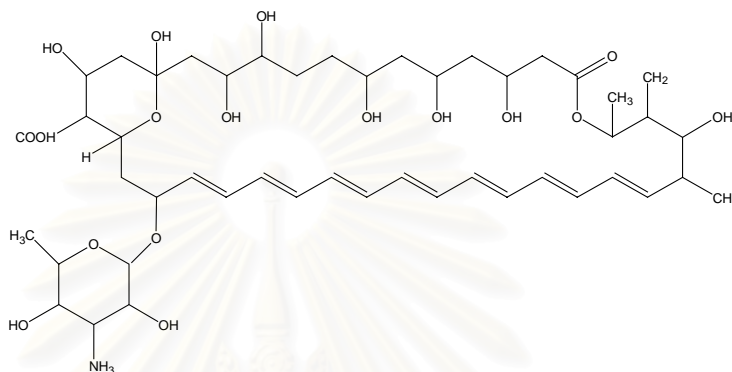
รูปที่ 2.13 โครงสร้างสารปฏิชีวนะ lincomycin และ erythromycin (Nakajima, 1999)

5. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Polyene

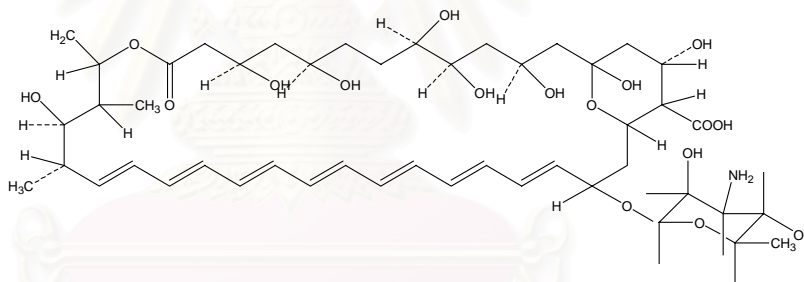
สูตรโครงสร้างพื้นฐาน เป็นสารประกอบขนาดใหญ่ ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำคือส่วน hydroxylate และส่วนที่เป็น lipophilic คือส่วนที่ต่อกัน 4-7พันธะคู่ (Scholar และ Pratt, 2000)

กลไกการออกฤทธิ์ มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้คุณสมบัติ selective permeability เสียไป

nystatin และ amphotericin B เป็นสารปฏิชีวนะที่สำคัญในกลุ่มนี้ ผลิตโดย *Streptomyces noursei* และ *S. nodosus* ตามลำดับ (Edwards, 1980) ทั้งสองชนิดมีขอบเขตการยับยั้งเหมือนกันคือ ยับยั้งการเจริญของยีสต์ และราต่างๆ แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโปรโตซัว หรือไวรัส (ดวงพร 2530) โครงสร้าง nystatin และ amphotericin B แสดงดังรูปที่ 2.14 และ 2.15 ตามลำดับ



รูปที่ 2.14 โครงสร้างสารปฏิชีวนะ nystatin (ดวงพร คันธโชติ, 2530)



รูปที่ 2.15 โครงสร้างสารปฏิชีวนะ amphotericin B (Scholar และ Pratt, 2000)

2.8 รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่

แม้ว่าการค้นพบสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีตเกิดขึ้นตั้งแต่ปี 1940 โดย Waksman และ Woodruff ซึ่งค้นพบ actinomycin (Waksman และ Woodruff, 1940) แต่การค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ยังดำเนินต่อไป ด้วยเหตุผลต่อไปนี้คือ จุลินทรีย์ก่อโรคมักมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะมากขึ้น เกิดวิวัฒนาการของโรคชนิดใหม่ เช่น AIDS, Hanta virus, Ebola virus, *Cryptosporidium*, legionnaires' disease, Lyme disease, *Escherichia coli* 0157:H7 การดำรงอยู่ของแบคทีเรียที่ดื้อยา เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ในคนไข้ที่เป็น cystic fibrosis และ ความเป็นพิษของสารประกอบที่พบในปัจจุบัน (Strohl, 1997) รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแอคติโนมัยซีตมีดังนี้

Mellouli และคณะ (2003) พบแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่คือ *Streptomyces sp.* US24 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียง (98%) กับ *Streptomyces caelestis* ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ niddamycin และ celesticetin แต่จากข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปี พบว่าสารปฏิชีวนะที่ *Streptomyces sp.* US24 สร้างขึ้นมีคุณสมบัติไม่ตรงกับ niddamycin และ celesticetin สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก

Singh และคณะ (2003) พบ Mannopectimycins α β γ δ และ ϵ (รูปที่ 2.16) ซึ่งเป็น สารปฏิชีวนะไกลโคเปปไทด์แบบวง ที่ผลิตจาก *Streptomyces hygroscopicus* LL – AC98 Mannopectimycins ϵ เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์มากที่สุดคือสามารถยับยั้ง Staphylococci ที่ดื้อ ยา methicillin และ Enterococci ที่ดื้อยา vancomycin

Hoppmann และคณะ (2002) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่คือ Vancoresmycin (รูปที่ 2.16) ที่ผลิตโดย *Amycolatopsis sp.* ST 101170 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus spp.* ที่ดื้อยา vancomycin แต่ไม่มีฤทธิ์กับ แบคทีเรียแกรมลบและรา

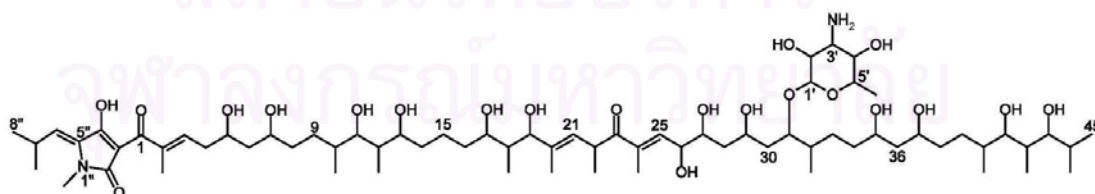
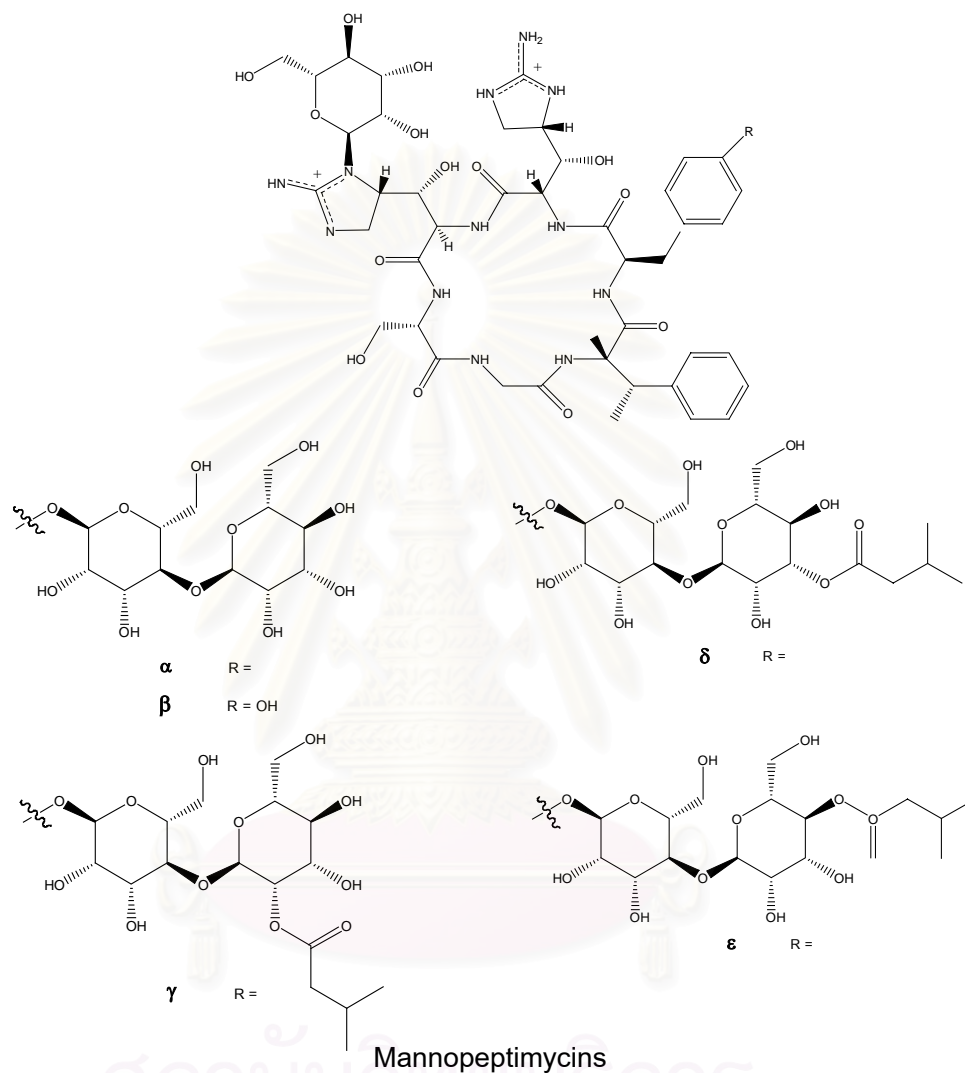
Schumacher และคณะ (2001) พบ Kahakamides A และ B (รูปที่ 2.17) เป็น neosidomycin ชนิดใหม่ ที่ผลิตโดย *Nocardiosis dassonvillei* ที่แยกจากดินตะกอนในแหล่ง น้ำตื้น บนเกาะ Kauai รัฐฮาวาย พบว่า Kahakamides A มีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis* ส่วน Kahakamides B มีสารไม่เพียงพอในการทดสอบ

Ohta และคณะ (2001) พบ Micromonospolide A (รูปที่ 2.17) ซึ่งเป็น macrolide ชนิด ใหม่ ที่ผลิตจาก *Micromonospora sp.* ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งตัวอ่อนของปลาดาว (*Asterina pectinifera*) ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml

Mukhopadhyay และคณะ (1999) พบ Methemycin B (รูปที่ 2.17) เป็นสารยับยั้งรา แบบ Macrolactone ชนิดใหม่ที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีตสปีชีส์ HIL Y – 8620959 มีฤทธิ์ยับยั้งรา ก่อโรคในพืช เช่น *Alternaria mali* P37 ที่ค่า MAC (minimum active concentration) 62.5 mg/l

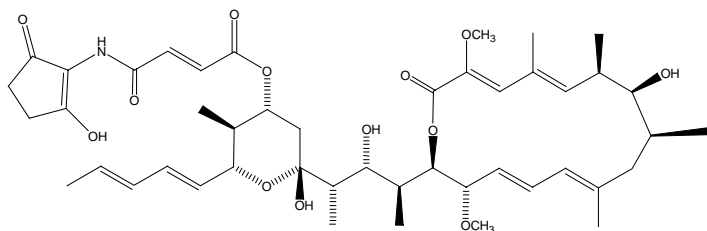
Kong และคณะ (1999) พบ Colubridin A (รูปที่ 2.18) เป็นสารปฏิชีวนะแบบ macrolide ชนิดใหม่ที่ผลิตจาก *Streptomyces sp.* มีฤทธิ์ยับยั้งได้เดือนฝอย และแบคทีเรียแกรมบวกอย่างมี ประสิทธิภาพ แต่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้น้อย

Mukhopadhyay และคณะ (1998) พบ Gravidomycins (รูปที่ 2.17) อยู่ใน class Streptogramin ผลิตโดย *Streptomyces* sp. HIL Y – 8240155 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมบวกที่ดื้อยา แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และรา

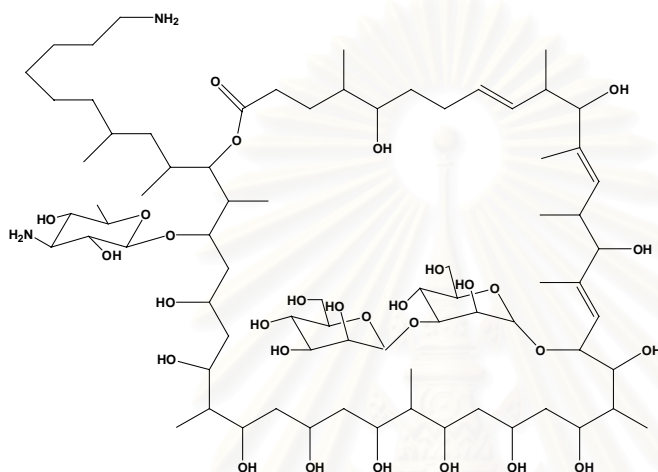


Vancoresmycin

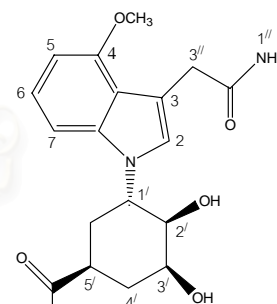
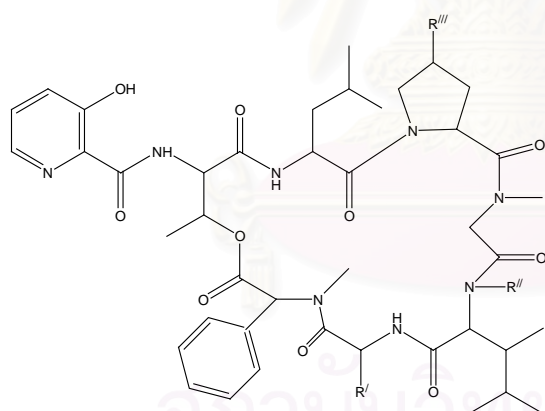
รูปที่ 2.16 สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สร้างโดยแอคติโนมัยซีต manopeptimycins และ vancoresmycin



Micromonosporide A

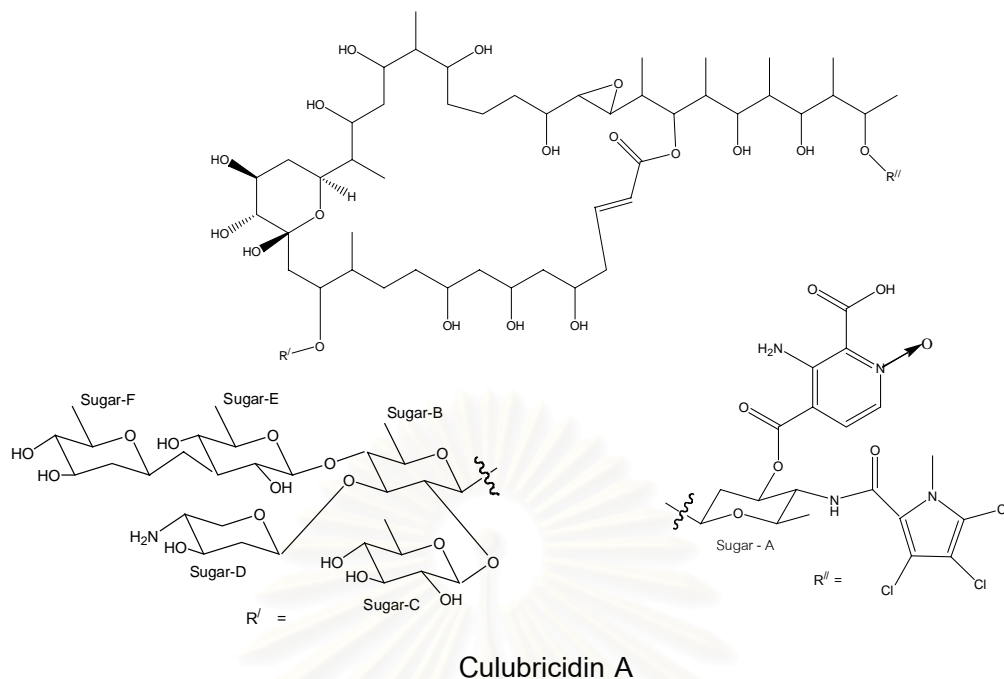


Methemycin B



	R ^I	R ^{II}	R ^{III}	Kahakamide A	R = OCH ₃
Grividimycin I	H	CH ₃	OH	Kahakamide B	R = NH ₂
Grividimycin II	H	CH ₃	OH		
Grividimycin III	CH ₃	H	OH		

รูปที่ 2.17 สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สร้างโดยแอคติโนมัยซีต Micromonosporide A, Mathemycin B, Kahakamides และ Grividomycins



รูปที่ 2.18 สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สร้างโดยแอคติโนมัยซีต Colubricidin A

2.9 สารปฏิชีวนะที่สร้างโดย *Streptomyces griseocarneus* และรายงานที่เกี่ยวข้อง

จาก Bergey's manual of systematic bacteriology Volume 4(1989) รายงานว่า *Streptovorticillium griseocarneum* ATCC 12628 ค้นพบโดย Benedict, Stodola, Shotwell, Borud และ Linderfeller (1950) สร้างสารปฏิชีวนะ hydroxystreptomycin และ rotaventin

Soliveri และคณะ (1987) ค้นพบ สารปฏิชีวนะยับยั้งรา 2 ชนิดคือ PA-5 และ PA-7 ซึ่งผลิตโดย *Streptovorticillium* sp 43/16 ที่แยกได้จากดินในประเทศสเปน สารปฏิชีวนะ 2 ชนิดนี้สกัดจากส่วนของเส้นใยด้วยเมทานอล และทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ และวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวดูดซับคือ LH-20 Sephadex เมื่อทำการจำแนกสาร PA-5 และ PA-7 โดยใช้ข้อมูลจาก Elemental analysis, UV visible spectra และ IR spectra พบว่าเป็นสารปฏิชีวนะกลุ่ม pentaene และ heptaene macrolide มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{22}H_{40}O_{10}N$ และ $C_{39}H_{68}O_{19}N$ ตามลำดับ สารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์และราก่อโรค

Soliveri และคณะ (1988) ศึกษาถึงผลของสารอาหารชนิดต่างๆต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ PA-5 และ PA-7 ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะ macrolide polyene ที่ผลิตโดย *Streptovorticillium* sp 43/16 พบว่าภาวะการผลิตที่เหมาะสมคือการใช้ L-proline และ glycine เป็นแหล่งไนโตรเจน

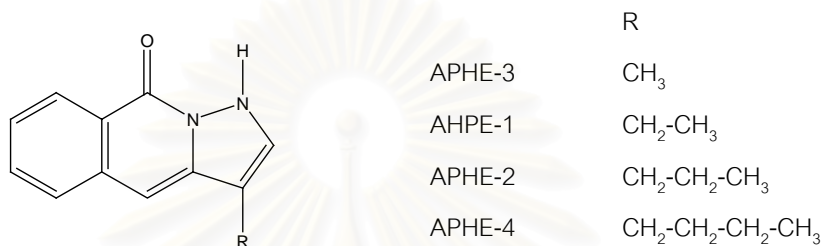
นอกจากนี้การใช้แมงกานีสเป็น metallic ion สามารถกระตุ้นการผลิตสารปฏิชีวนะได้อย่างมีนัยสำคัญ ความต้องการฟอสเฟตในปริมาณที่เหมาะสมคือ 50 mM ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ *Streptomyces* ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ macrolide polyene แมงกานีสมีความสำคัญในการผลิต การผลิต PA-5 และ PA-7 เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นถึง 40 mM แต่เมื่อความเข้มข้นสูงมากขึ้นจะยับยั้งการผลิต นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเติมเกลือแอมโมเนียมและกรดอะมิโน L-cysteine และ/หรือ L-valine เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นให้ผลลบต่อการผลิตสารปฏิชีวนะทั้งสองชนิด

Witt และ Stackebrandt (1990) ทำการวิเคราะห์ phylogenetic ของ *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* จำนวน 40 สายพันธุ์ ใน 37 สปีชีส์ เพื่อศึกษาระดับความสัมพันธ์ภายในกลุ่มโดยวิธี DNA-DNA hybridization และเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่าสกุล *Streptoverticillium* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับ สกุล *Streptomyces* จึงจัดให้สกุล *Streptoverticillium* ในบางสปีชีส์ ให้อยู่ในสกุล *Streptomyces* รวมถึง *Streptoverticillium griseocarneum* จึงถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *Streptomyces griseocarneus*

Fidalgo และคณะ(1992) ได้จำแนก *Streptoverticillium* sp 43/1 ว่าเป็น *Streptoverticillium griseocarneum* NCIMB 40447 และพบว่าผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ คือ AHPE-1 และ APHE-2 ซึ่งพบในทั้งส่วนของเส้นใยและอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสกัดเส้นใยด้วยอะซีโตน และสกัดอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ จากนั้นนำสารสกัดทั้งสองส่วนมารวมกัน และทำทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับคือ ซิลิกาเจล และชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำส่วนที่มีฤทธิ์จากวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีมาทำบริสุทธิ์ด้วย semipreparative HPLC ได้สาร AHPE-1 และ APHE-2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง สารทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งเซลล์เนื้องอก (antitumor) และยับยั้งได้น้อยต่อแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และราเส้นใย และไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ

Fidalgo และคณะ(1992) วิเคราะห์โครงสร้างของสารปฏิชีวนะ pyrazolo-isoquinolinone คือ AHPE-1 และ APHE-2 ที่ผลิตโดย *Streptoverticillium griseocarneum* NCIMB 40447 โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจาก NMR, 2D NMR และ mass spectra พบว่า AHPE-1 และ APHE-2 สูตรโมเลกุล คือ $C_{13}H_{12}N_3O$ และ $C_{14}H_{14}N_2O$ ตามลำดับ โครงสร้างของ AHPE-1 และ APHE-2 แสดงดังรูปที่ 2.19

APHE-2 และเมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งจุลินทรีย์ของ APHE-1, APHE-2, APHE-3 และ APHE-4 พบว่า สารปฏิชีวนะที่มีสาย aliphatic ยาวกว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่า แต่ immunomodulatory activity กลับลดลง APHE ทั้ง 4 ชนิดไม่สามารถยับยั้ง *Penicillium oxalicum* และ *Aspergillus niger* แต่ทำให้อัตราการเจริญของราลดลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุม และไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้



รูปที่ 2.19 โครงสร้างของ AHPE-1, APHE-2, APHE-3 และ APHE-4

Cruz และคณะ (1999) ศึกษาถึงผลของสารอาหารต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ pyrazoloisoquinolinone (APHE) โดย *Streptomyces griseocarneus* NCIMB 40447 (เปลี่ยนชื่อจาก *Streptoverticillium griseocarneum* NCIMB 40447) ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต APHE-1 ถึง APHE-3 คือการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ L-lysine เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยพบ APHE-3 มากที่สุด ในการผลิตที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และใช้ propionate และ butyrate เป็น precursor จะเพิ่มการผลิต APHE-1 และ APHE-2 แต่กลับลดการผลิต APHE-3 และพบว่าความต้องการสารอาหารในการผลิต APHE-3 นั้นแตกต่างจาก APHE-1 และ APHE-2

Cruz และคณะ (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ของการผลิตสารปฏิชีวนะ APHE (1,2 และ 3) กับวงจรชีวิต โดยเฉพาะระหว่างการสร้างสปอร์ของ *Streptomyces griseocarneus* NCIMB 40447 โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง Bennett medium พบว่ามีการสร้างเส้นใยและ สปอร์อย่างหนาแน่น ในสภาวะนี้มีการผลิตสารปฏิชีวนะ APHE (1,2 และ 3) ในการศึกษาพบว่า การผลิต APHE-3 เกิดขึ้นระหว่างการสร้างสปอร์ และพบมาในสปอร์ ส่วน APHE-1 และ APHE-2 พบมากในเส้นใย สารประกอบ APHE พบใน Streptomyces เกือบทุกชนิดที่นำมาศึกษา ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเป็นสารที่สร้างขึ้นในวงจรชีวิตของจุลินทรีย์กลุ่มนี้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D-0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) รุ่น 25 manometer บริษัท Dwyer instruments, U.S.A.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น J-30I บริษัท Beckman, Irell และ
- เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A2000S บริษัท Sartorius, Germany
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น 4001/4 บริษัท Spectronic Unicam, U.S.A.
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus optical, Japan
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน [Transmission electron microscope(TEM)] รุ่น JEM-200CX บริษัท Jeol, Japan.
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด [Scanning electron microscope(SEM)] รุ่น JEM-T220A บริษัท Jeol, Japan.
- เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.
- เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N series บริษัท EYELA, Japan
- หลอดยูวี (UV lamp) ความยาวคลื่น 365 และ 254 นาโนเมตร รุ่น V01 7887 บริษัท Vilber Lourmat, France
- อ่างอัลตราโซนิก (sonicator) รุ่น RX 100 บริษัท Bและelin electronic, Thail และ
- เครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (freeze dryer) รุ่น 77520 บริษัท Labconco, U.S.A.
- เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Ep 2000/9771 บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) รุ่น TW20 บริษัท Julabo, Germany
- ฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิเมตร บริษัท Boeco, Germany

- paper disc เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. อย่างหนา บริษัท Toyo Rhoshi Kaisha, Ltd., Japan
- TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F₂₅₄ บริษัท Merck, Germany
- TLC cellulose บริษัท TCI, Japan

3.2 สารเคมี

- L- อะราบิโนส (*L*-arabinose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- เดกซ์แทรน (dextran) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- D- ฟรุคโตส (*D*-fructose) บริษัท Merck. Germany.
- D- กาแลคโตส (*D*-galactose) บริษัท Merck. Germany
- มีโซ-อินโนสิทอล (*meso*-inositol) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- D- แลคโตส (*D*-lactose) บริษัท Merck. Germany.
- D- แมนนิทอล (*D*-mannitol) บริษัท Difco Laboratories.
- D- แมนโนส (*D*-mannose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- L- แรมโนส (*L*-rhamnose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ซาลิซิน (salicin) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ซูโครส (sucrose) บริษัท Merck. Germany
- ไซโลส (xylose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) บริษัท Merck. Germany.
- โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) บริษัท Merck. Germany.
- โซเดียมมาโลเนท (sodium malonate) บริษัท Merck. Germany
- L- แอสปาราจีน (*L*-asparagine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- L- โพรลีน (*L*-proline) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- L- อาร์จินีน (*L*-arginine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- L- ฮิสทีดีน (*L*-histidine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- L- เมทไธโอนีน (*L*-methionine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- โพแทสเซียม ไนเตรท (potassium nitrate) บริษัท Merck. Germany
- L- ฟีนิลอะลานีน (*L*-phenylalanine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- L- เซรีน (*L*-serine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- L- ทีโอนีน (*L*-threonine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.

- L- วาลีน (L-valine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- สารมาตรฐาน 2,6-diaminopimelic acid บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ซิลิกาเจล 60 (No 9385) ขนาดอนุภาค 0.040–0.063 มม. (230–400 mesh ASTM) บริษัท E. Merck, Germany
- ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน เอทิลแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล เป็นตัวทำละลายชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม (commercial grade) ทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นทุกครั้ง ก่อนการใช้ในการทดลอง

3.3 ตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินรังปลวกจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย ตัวอย่างละประมาณ 30-100 กรัม บันทึกสถานที่เก็บ ลักษณะและสี ของดิน วัดพีเอช (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ตากแดดให้แห้ง บด ร่อนด้วยตะแกรงร่อน ใส่ถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.4 การแยกแอกติโนมัยซีตจากดินตัวอย่าง

นำดินตัวอย่างอบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่แอกติโนมัยซีต และเจริญได้รวดเร็ว จากนั้นชั่งดิน 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 200 rpm. ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ได้สารแขวนลอยดินระดับการเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นลดระดับการเจือจางเป็น 10^{-2} – 10^{-6} (serial ten fold dilution) ปิเปตสารแขวนลอยดิน 0.1 มิลลิลิตรจากระดับ 10^{-4} – 10^{-6} สเปรด (spread) บนอาหาร sodium caseinate agar (SCA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยเติม cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 7-14 วัน คัดเลือกแอกติโนมัยซีตที่โคโลนีมีลักษณะแตกต่างกัน ชีด (streak) ทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร SCA เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวยีส oat meal agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 10)

3.5 การเก็บรักษาแอกติโนมัยซีต

ชีดแอกติโนมัยซีตบนอาหารผิวยีส oat meal agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 7-14 วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์มากพอ เติมสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ลูป (loop) ชูดสปอร์ให้หลุด แล้วกรองสปอร์แขวนลอยที่ได้ในสารละลาย กลีเซอรอล ด้วยสำลีปลอดเชื้อ เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.6 การทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีด

3.6.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ (test organism)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม
<i>Candida albicans</i> ATCC 70014	ยีสต์ (รา ไม่สร้างเส้นใย)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169	ยีสต์ (รา ไม่สร้างเส้นใย)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	รา มีการสร้างเส้นใย

3.6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3)	สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย
Malt extract agar (MEA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5)	สำหรับเลี้ยงยีสต์และรา

3.6.3 ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีดโดยวิธี agar cross streak method (Waksman, S.A. 1950)

โดยขีดแอกติโนมัยซีดที่ต้องการทดสอบเป็นแนวยาวตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงขีดจุลินทรีย์ทดสอบตามขวางเป็นแนวตั้งฉากกับแอกติโนมัยซีด บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน 1-2 วัน วัดความกว้างของบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของจุลินทรีย์ทดสอบ คัดเลือกแอกติโนมัยซีดที่สร้างสารปฏิชีวนะพิจารณาจากจำนวนจุลินทรีย์ทดสอบที่สามารถยับยั้งได้ และความกว้างของบริเวณที่มีการยับยั้ง

3.7 การวิเคราะห์หา 2,6-diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ Ac 9.1 (Cross และ Goodfellow, 1973)

3.7.1 แอกติโนมัยซีดสายพันธุ์อ้างอิง

- *Streptomyces aminophilus* ATCC 14961

3.7.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

เลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 และแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์อ้างอิง ในอาหารยีสต์ เอกแทรก เดกซ์โตรส (yeast extract dextrose medium) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) บ่มเป็นเวลา 3-4 วัน ที่อุณหภูมิ 27 °C แล้วแยกเซลล์โดยการปั่น นำเซลล์มาผสมกับเอทานอล ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นแยกเซลล์ด้วยการปั่น ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 °C นำเซลล์แห้งมาผสมกับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล ตั้งไว้ 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 °C จากนั้นนำมากรองเอาส่วนน้ำใส เติมนิวทานอล 1-2 หยด ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบชนิดขององค์ประกอบผนังเซลล์ด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เทียบกับสารมาตรฐาน 2,6-diaminopimelic acid (DAP) และแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์อ้างอิง

3.7.3 วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Staneck และ Robert, 1974)

ใช้แผ่น TLC cellulose F ขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร จุดสารสกัดจากวิธี 3.7.2 ห่างจากขอบล่างประมาณ 1.5 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ในถังโครมาโทกราฟีที่อิมตัวด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งเป็นสารผสม เมทานอล:น้ำ:กรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มอล:ไพรีดีน ในอัตราส่วน 80:26:4:10 เพื่อให้เกิดการแยก หลังจากวัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 1 เซนติเมตรซึ่งทำเครื่องหมายไว้ นำแผ่น TLC ออกมาผึ่งให้แห้ง ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของตำแหน่งสารโดยพ่นด้วยสารละลาย 0.5 % นินไฮดรินในอะซีโตนลงบนแผ่น TLC นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 2-3 นาที จะเกิดจุดสีน้ำตาลม่วง วัดค่า R_f คือระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ เปรียบเทียบค่า R_f ของ DAP ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 และแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์อ้างอิงกับค่า R_f ของสารมาตรฐาน DAP

3.8 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

ศึกษาการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ตามวิธีที่รายงานโดย Williams และคณะ (1983) และ Bergey's manual of systematic Bacteriology Volume 4. (Williams et al., 1989) โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างรงควัตถุเมลานิน การทดสอบทางชีวเคมี การย่อยสลายสาร ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆและความเป็นกรด-ด่างที่ 4.3 และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่างๆ

3.8.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ใช้เทคนิค slide culture (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP4 inorganic salt starch agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เพื่อศึกษาลักษณะของสายใยอากาศ สายใยอาหาร และจำนวนวันที่มีการสร้างสปอร์ จากนั้นนำไปศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

บันทึกลักษณะการแตกออกของเส้นใยอาหาร ลักษณะของสายสปอร์ การเรียงตัวของ สปอร์ จำนวนสปอร์ ลักษณะพื้นผิวของสปอร์ และโครงสร้างอื่นเช่น sclerotia

3.8.2 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP (International Streptomyces Project) (ภาคผนวก ก หมายเลข 8-13) ชนิดต่างๆได้แก่

ISP1 - TYEA	Trypton-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 iron agar

ซิดแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP1-6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7- 14 วัน บันทึกการเจริญ สีของสายใยอาหาร สายใยอากาศ การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ และการสร้างสปอร์

3.8.3 การสร้างรงควัตถุเมลานิน

เลี้ยงแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหารเปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรกท์ไฮร์ออน อการ์ (peptone yeast extract iron agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 13) และ ไทโรซีน อการ์ (tyrosine agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 15) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 โดยจะเกิดสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.8.4 ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท

แทง (stab) แอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไนเตรท อการ์ (nitrate agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 16) ในหลอดทดลองขนาด 16 X 150 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 ° เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ โดยหยดสารละลายเอ (ละลาย sulfanilic acid 0.8 กรัม ใน 5 นอร์มอล กรดอะซิติก 100 มล.) และสารละลายบี (ละลาย alpha-naphthylamine 0.5 กรัม ใน 5 นอร์มอล กรดอะซิติก 100 มล.) ลงในหลอดทดลอง ซึ่งจะเกิดสีแดง แต่ถ้าการทดสอบไม่เกิดสีแดงอันเนื่องมาจากไนไตรท์ถูกสลายต่อไปเป็นแอมโมเนีย และก๊าซไนโตรเจน ต้องทดสอบขั้นที่สองโดยเติมผงสังกะสีลงไป ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ (Shirling และ Gottlieb, 1966)

3.8.5 การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

แทง (stab) แอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารที่มีเปปโตเนเป็นองค์ประกอบ ในหลอดทดลองขนาด 16 X 150 มิลลิเมตร ใส่กระดาษเลดอะซีเตทที่ขึ้น (lead acetate strip) ไว้ภายในอย่าให้ถูกอาหาร (หนีบปลายกระดาษไว้กับจุกหลอด) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ° เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จากกระดาษเลดอะซีเตทจะเปลี่ยนเป็นสีดำ (Shirling และ Gottlieb, 1966)

3.8.6 การศึกษาสมบัติการย่อยสลายสาร (degradation activity)

โดยขีดแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ (modified bennett agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 17) ซึ่งประกอบด้วย 0.5%อะดีนีน (adenine), 0.5%ไทโรซีน (tyrosine), 0.4%ไซแลน (xylan), 0.4%แซนทีน (xanthine), 0.1%เคซีน (casein), 0.4%เจลาติน (gelatin) และ 0.1%แป้ง (starch) ตรวจสอบการย่อยสลายโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงความใส บริเวณรอบหรือใต้โคโลนีในอาหารวุ้น ยกเว้น การย่อยสลายเจลาติน และแป้ง ตรวจสอบโดยสังเกตจากวงใสหลังจากเททับด้วยสารละลาย แอซิดิไฟด์ เมอคิวริกคลอไรด์ (acidified HgCl₂) และไอโอดีน (iodine) ตามลำดับ

3.8.7 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

โดยขีดแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ (modified bennett agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 17) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° และ 45 ° สังเกตการเจริญหลังจากวันที่ 7 และ 14 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 10 ° สังเกตอัตราการเจริญหลังจาก 2 และ 4 สัปดาห์

3.8.8 การตรวจสอบการเจริญที่ความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 4.3

โดยขีดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 17) ที่มีพีเอช เท่ากับ 4.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C สังเกตการเจริญหลังจาก 7 และ 4 สัปดาห์

3.8.9 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

ตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนดังต่อไปนี้

- 0.1 % L- อัจฉิน
- 0.1 % L- ฮีสติดีน
- 0.1 % L- เมทไธโอนีน
- 0.1 % โฟแทสเซียม ไนเตรท
- 0.1 % L- ฟีนิลอะลานีน
- 0.1 % L- ซีรีน
- 0.1 % L- ธีโอนีน
- 0.1 % L- วาลีน

โดยขีดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม (basal medium agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 18) ที่ประกอบไปด้วยสารประกอบไนโตรเจนแต่ ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15 วัน ตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนโดยเทียบการเจริญ กับชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม ที่ไม่ได้เติมสาร และชุดควบคุมคืออาหาร เบซอล มีเดียม ที่ประกอบด้วย 0.1% L- แอสปาราจिन หรือ 0.1 % L- โปรลีน

3.8.10 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

ตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนดังต่อไปนี้

- 1.0 % L- อะราบิโนส
- 1.0 % เดกซ์แทรน
- 1.0 % D- ฟรุคโตส
- 1.0 % D- กาแลคโตส
- 1.0 % มีโซ-อินโนซิทอล
- 1.0 % D- แลคโตส
- 1.0 % D- แมนนิทอล
- 1.0 % D- แมนโนส

- 1.0 % L- แรมโนส
- 1.0 % ซาลิซิน
- 1.0 % ซูโครส
- 1.0 % ทรีฮาโลส
- 1.0 % ไชโลส
- 1.0 % ไชเดียมอะซิเตต
- 1.0 % ไชเดียมซิเตรต
- 1.0 % ไชเดียมมาโลเนต

โดยซี้ดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิลิเซชัน อการ์ (carbon utilization agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 19) ที่ประกอบด้วยสารประกอบคาร์บอนแต่ ละชนิด ตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนโดยเปรียบเทียบการเจริญกับอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิลิเซชัน อการ์ ที่ไม่ได้เติมสาร และอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิลิเซชัน อการ์ ที่ประกอบด้วย 1.0% กลูโคส ป่มที่อุณหภูมิ 30 ° เป็นเวลา 15 วัน

3.9 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ ประมวลรหัสของ 16S rRNA

โดยส่งตัวอย่างแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหาร ISP1-TYEA (Trypton-yeast extract agar) (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) ไปวิเคราะห์ที่ Asian Natural Environmental Science Center, the University of Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

3.9.1. การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

เลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหาร ISP1-TYEA (Trypton-yeast extract agar) เป็นเวลา 7 วัน ตัดผิวหน้าโคโลนีใส่ในหลอดขนาด 2.0 มิลลิลิตร บดด้วย FastPrep FP120 homogenizer (Savant instruments, INC., NY) ใน washing buffer(0.1M Tris-HCl) (pH 8.0), 2-mercaptoethanol 2%, polyvinylpyrrolidone 1% และ ascorbic acid 0.05 M) ปั่น เหวี่ยงที่ 1.500 rpm 2 นาที 18 ° ทำซ้ำ 3 ครั้ง เทส่วนใส่ทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาสกัด ดีเอ็นเอด้วย Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Zhou et al., 1999) โดยใส่ตัวอย่างใน CTAB buffer (CTAB 2%, Tris-HCl (pH 8.0) 0.1 M, EDTA (pH 8.0) 20 mM, NaCl 1.4 M และ 2-mercaptoethanol 0.5%) ป่มที่อุณหภูมิ 65 ° เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำละลายผสม

chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v/v) ปริมาตรเท่าตัวของ CTAB buffer นำไปปั่นตกตะกอนที่ 1,500 rpm 7 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนมาเติมสารละลายผสม chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v/v) ปั่นตกตะกอนอีกครั้ง เก็บน้ำใสส่วนบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol เก็บไว้ที่ 0 °C 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จะได้สาย DNA ที่กั้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง ล้าง DNA ด้วย 80% เอทานอล ปั่นเหวี่ยง 1,800 rpm 4 °C 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระบายให้แห้ง ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer 100 µl [Tris-HCl (pH 8) 10 mM และ EDTA 1 mM] เติม ribonuclease solution (RNase, Nippon Gene) 10 mg/ml 1 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 30 นาที เพื่อกำจัด RNA ตกตะกอน DNA อีกครั้งโดยเติม PEG solution (20%polyethylene glycol (MW 6000) ใน 2.5 M NaCl) 60 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm 4 °C 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 80% เอทานอล ปั่นตกตะกอน ระบายจนแห้ง ละลาย DNA ใน TE buffer 100 µl (Tris-HCl (pH 8) 10 mM และ EDTA 1 mM) เก็บที่ -30 °C จนกว่าจะนำมาใช้

3.9.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ออกแบบไพรเมอร์ (primer) อ้างอิงข้อมูล Kataoka และคณะ (1997) เพื่อใช้ในการกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ไพรเมอร์ดังกล่าวคือ

forward primer WAT1 (5' – TCA CGG AGA GTT TGA TCC TG – 3')

reverse primer WAT2 (5' – GCG GCT GCT GGC ACG TAG TT – 3')

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้โครโมโซมอดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ Ac 9.1 ซึ่งสกัดด้วยวิธีของ Zhou และคณะ ในปี 1999 ตามวิธีในข้อ 3.9.1 เป็นแม่แบบ (template) ในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ประกอบด้วย สารผสม dNTP, forward primer, reverse primer, เอนไซม์ Ampli Taq gold (Ampli Taq Gold kit, Perkin Elmer, Branchburj, NJ), PCR บัฟเฟอร์, แมกนีเซียมคลอไรด์, BSA (bovine serum albumin) และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบปริมาตร 20 µl ส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในสารละลาย PCR 20 μ l ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ

รีเอเจนต์	ความเข้มข้นสุดท้าย
สารผสม dNTP (dNTP mixture)	0.2 mM
Primer 1 (forward)	0.5 μ M
Primer 2 (reverse)	0.5 μ M
แมกนีเซียมคลอไรด์	1.5 mM
แม่แบบ(template)	5 ng
เอนไซม์ Ampli Taq gold	0.5 U
1X PCR บัฟเฟอร์	-
BSA(bovine serum albumin)	200 ng/ μ l

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย 2 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทั้งหมด 38 รอบปฏิกิริยา ประกอบด้วยขั้น Denature ที่ 94 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 9 นาที Annealing ที่ 50 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่ 72 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนที่ 2 เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทั้งหมด 1 รอบปฏิกิริยา ประกอบด้วยขั้น Denature ที่ 94 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 50 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่ 72 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (PCR product) ที่ -30 $^{\circ}$ C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.9.3 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบยีนที่มีขนาด 500 เบส โดยเตรียมอะกาโรสเจล 1.2% ซึ่งหลอมในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัว (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) ในอัตราส่วน 5:2 หยอดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลแซมเบอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสแพร์ ดีเอ็นเอแลคเคอร์ + 1.5 กิโลเบสแพร์

3.9.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

ภายหลังการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแล้ว เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ทำการโคลนโดยใช้ pT7 Blue3 cloning kit (Novagen WI) จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีการแทรก (insert) ของตำแหน่ง 16S rRNA มาทำการตรวจสอบว่ามีการเชื่อมกันระหว่าง 16S rRNA กับ พลาสมิด อย่างสมบูรณ์ โดยการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย M13 reverse และ U19 primer นำ PCR product ที่มีการแทรกของ plasmid อย่างสมบูรณ์มาทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดยใช้ Thermo Sequence Pre-mixed Cycle Sequencing kit (Hitachi Instrument Service Co.) โดยใช้ T7 และ U19 forward primer ที่ติดฉลากด้วย fluorescence dry คือ Texas Red (Hitachi Instrument Service Co.) โดยใช้เครื่อง SQ-5500E sequencer (Hitachi Electronics Engineering Co., Tokyo) นำลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ ประมวลรหัสของ 16S rRNA ที่ได้มาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์ [http:// www.ddbj.nig.ac.jp](http://www.ddbj.nig.ac.jp) (ตุลาคม, 2543)

3.10 การศึกษาการสร้างสรรค์ปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว

จากการทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสรรค์ปฏิชีวนะโดยวิธี agar cross streak พบว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 เป็นสายพันธุ์เดียวที่สร้างสรรค์ปฏิชีวนะแบบ broad spectrum คือยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ยีสต์ *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* และรา *Aspergillus niger* จึงคัดเลือกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาทำการผลิตสารปฏิชีวนะ

3.10.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอย

ซิดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหารวุ้นเลี้ยง oat meal agar อายุ 7–10 วัน ซึ่งมีสปอร์เจริญเต็มที่ เติมสารละลาย tween 80 ปราศจากเชื้อ ความเข้มข้น 0.01% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้ลูบเปียสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย กรองสปอร์ จากนั้นนำมาเจือจางด้วยสารละลายนอร์มัลซาลีน (0.85% NaCl) ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์

3.10.2 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 3.10.1 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหาร Yeast malt extract broth (YMEB) 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วย rotary shaker 200 rpm. ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

3.10.3 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

เตรียมอาหารเหลว 4 ชนิด คือ Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4), Malt Extract Broth (MEB)(ภาคผนวก ก หมายเลข 5), Sodium caseinate broth (SCB)(ภาคผนวก ก หมายเลข 2) และ Soluble starch broth (SSB)(ภาคผนวก ก หมายเลข 21) ชนิดละ 50 มิลลิลิตร ใน erlenmayer flask ขนาด 250 มล. ใส่หัวเชื้อจากข้อ 3.10.2 ปริมาณ 1% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงในแต่ละฟลาस्क บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วย rotary shaker 200 rpm. เก็บตัวอย่างในช่วง 3 5 และ 7 วัน จากนั้นกรองแยกส่วนของเส้นใยออก นำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อไประเหยน้ำออกด้วยเครื่อง vacuum evaporator ให้มีปริมาตรลดลง 10 เท่า จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปตรวจหาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี agar well ต่อไป

3.10.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี agar well(Murray และ Baron, 1999)

3.10.4.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบซี้ด (steak) บนอาหาร NA เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เชี่ยโคโลนีเดี่ยว 4-5 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จนสังเกตเห็นว่าหลอดเชื้อขุ่น ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard ซึ่งประกอบด้วย BaCl_2 0.048 M ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ NH_2SO_4 0.36 M ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร โดยอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml

3.10.4.2 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบซี้ด (steak) บนอาหาร Sabouraud agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 48 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เชี่ยโคโลนี

เดี่ยวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอย่างน้อย 1 มม. จำนวน 5 โคโลนี ละลายใน 0.85% NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว วัดความขุ่นด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ให้มีค่าความดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 McFarland Standard ได้สารละลายเซลล์ประมาณ 1×10^6 - 3×10^6 CFU/ml

3.10.4.3 การเตรียมวุ้นใยสำหรับทดสอบ

เลี้ยงราในอาหารผิวเหียง PDA (ภาคผนวก ก หมายเลข 22) 3-5 วัน หรือจนมีการสร้างสปอร์ เต็ม 0.85% NaCl ใช้ลูป (loop) ขูดสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย กรองสปอร์ จากนั้นเจือจางด้วยสารละลายนอร์มัลซาลีน (0.85 % NaCl) ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ 1×10^6 - 3×10^6 โดยนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemocytometer)

3.10.4.4 การทดสอบโดยวิธี Agar well

นำจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.10.4.1 - 3.10.4.3 มานับจำนวนจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Plate count ได้จำนวนของจุลินทรีย์ทดสอบแสดงดังตารางที่ 3.2 จากนั้นใช้ไม้พินสำลีที่ปราศจากเชื้อ จุ่มลงในหลอดเชื้อ ปิดสำลีกับข้างหลอดพอหมาดๆ บ้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (Difco[®] Mueller-Hinton agar) (สำหรับแบคทีเรียทดสอบ) อาหาร Sabouraud agar (สำหรับยีสต์ทดสอบ) และอาหาร PDA (สำหรับราทดสอบ) ที่มีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตรให้ทั่ว ในลักษณะสามทิศทาง ทิ้งไว้ 3-5 นาทีเพื่อให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง แต่ไม่เกิน 15 นาที จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนอาหารแข็งในแนวทะแยงมุม นำชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ ออกโดยใช้ needle ใช้ปิเปตดูดสารที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่เจาะไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบ ส่วนยีสต์และราทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดบริเวณที่เกิดวงใส (clear zone) โดยตัวควบคุมบวกคือของแบคทีเรียคือ streptomycin ยีสต์คือ nystatin และราคือ cycloheximide และตัวควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ไม่มีการลงเชื้อ

ตารางที่ 3.2 ปริมาณจุลินทรีย์ทดสอบ(CFU/ml) ที่มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard

จุลินทรีย์ทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสง(OD)	ปริมาณจุลินทรีย์ทดสอบ(CFU/ml)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.108	3.32×10^8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.096	3.13×10^8
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.101	6.30×10^7
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.099	6.70×10^7
<i>C. albicans</i> ATCC 70014	0.094	2.85×10^6
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5169	0.102	3.73×10^6

3.10.5 การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะเมื่อมีการเติม 1% โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร ของสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และซอโยโทนเปปโทน

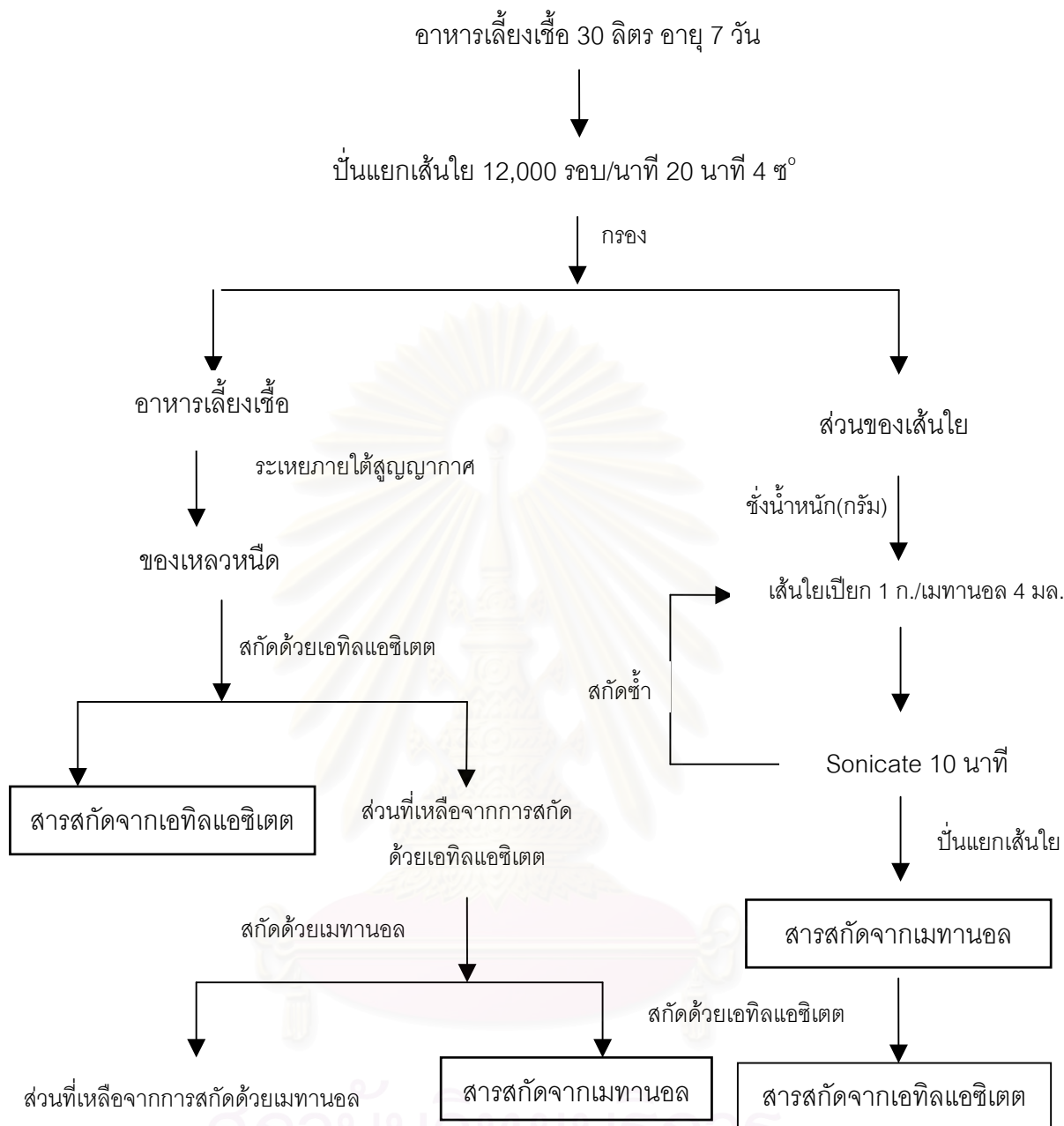
เติมหัวเชื้อจากข้อ 3.10.2 ให้มีปริมาณ 1%ของปริมาตรอาหารเลี้ยง ลง ในอาหาร SCB ที่มีการเติม 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ของสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และซอโย โทนเปปโทน เลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.10.3 และข้อ 3.10.4

3.11 การผลิตสารปฏิชีวนะโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

ผลิตสารปฏิชีวนะโดยใช้อาหาร SCB ที่มีการเติม 1% สารสกัดจากยีสต์ โดยเลี้ยงแอกติ-โนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ตามวิธีข้อ 3.10.3 ปริมาตรอาหาร 30 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นปั่น แยกส่วนของเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ที่ อุณหภูมิ 4 °C กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ซึ่งน้ำหนักของเส้นใยเปียก นำเส้นใยและ อาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดต่อไป

3.12 การสกัดสารปฏิชีวนะจากอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใยของแอกติโนมัยซีต สายพันธุ์ Ac 9.1

การสกัดสารปฏิชีวนะจากอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใยของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีขั้นตอนการดำเนินงานแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดสารปฏิชีวนะจากอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใยของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

3.12.1 การสกัดสารปฏิชีวนะจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเส้นใยออกตามวิธีข้อ 3.11 มาระเหยน้ำออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 °C จนมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียว ชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต โดยใช้กรวยแยก เติมเอทิลแอซิเตต ในปริมาตร 1:1 แยกส่วนสารสกัด

จากเอทิลแอลกอฮอล์ ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้งหรือจนกว่าไม่มีสารละลายปนอยู่ในเอทิลแอลกอฮอล์ซึ่งตรวจสอบโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี จากนั้นระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 °C จนแห้ง ซึ่งน้ำหนัก นำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์มาสกัดต่อด้วยเมทานอล ในปริมาตร 1:1 ทำการสกัด 3 ครั้งหรือจนกว่าไม่มีสารละลายปนอยู่ในเมทานอลตรวจสอบโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 °C จนแห้ง ซึ่งน้ำหนัก

3.12.2 การสกัดสารปฏิชีวนะจากส่วนของเส้นใย

นำส่วนของเส้นใยที่ได้จากการปั่นแยก มาสกัดด้วยเมทานอลในอัตราส่วนน้ำหนักเส้นใยเปียก 1 กรัม/เมทานอล 4 มิลลิลิตร นำไปวางไว้ในอ่างอัลตราโซนิก 10 นาที ปั่นแยกส่วนสารสกัดเมทานอลกับเส้นใยด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่ 4 °C 10 นาที สกัดซ้ำ 3 ครั้งหรือจนกว่าไม่มีสารละลายปนอยู่ในเมทานอลซึ่งตรวจสอบโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี จากนั้นระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 °C ซึ่งน้ำหนัก จากนั้นนำสารสกัดจากเส้นใยด้วยเมทานอลมาสกัดต่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ วิธีการสกัดเช่นเดียวกับสกัดด้วยเมทานอล ขั้นตอนการสกัดสารปฏิชีวนะจากอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใย แสดงดังรูปที่ 3.1

จากนั้นนำสารสกัดเมทานอล และเอทิลแอลกอฮอล์ จากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจากเมทานอล และเอทิลแอลกอฮอล์ จากส่วนของเส้นใย มาทดสอบโดยวิธี disk diffusion

3.12.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจากส่วนของเส้นใยด้วยวิธี disk diffusion (Murray และ Baron, 1999)

เตรียมจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีข้อ 10.4.1–10.4.3 และลงเชื้อตามวิธีข้อ 10.4.4 จากนั้นเตรียมดิสก์ทดสอบโดยเปิดสารสกัดที่ต้องการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบปริมาตร 80 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษวงกลมมาตรฐาน (paper disk) อย่างหนา เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด จากนั้นวางแผ่นดิสก์บนผิวหน้าของอาหารที่เลี้ยงเชื้อทดสอบไว้ในแนวทแยงมุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบ ส่วนยีสต์และราทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดบริเวณที่เกิดวงใส (clear zone) โดยตัวควบคุมบวกคือของแบคทีเรียคือ streptomycin ยีสต์คือ nystatin และราคือ cycloheximide และตัวควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ไม่มีการลงเชื้อ

3.13 การแยกและทำให้สารบริสุทธิ์

3.13.1 วิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี

เป็นการเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารบริสุทธิ์ออกจากสิ่งเจือปน โดยใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F₂₅₄ และใช้สารละลายเช่น เมทานอล เอทิลเอซิเตต คลอโรฟอร์ม เฮกเซน เป็นต้น ในอัตราส่วนที่เหมาะสมในการแยกสารบริสุทธิ์ การตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC หลังจากดีเวลลอป (develop) โดยอบแผ่น TLC ในภาชนะที่อ้อมตัวด้วยไอของไอโอดีน หรือส่องภายใต้รังสี ยู วี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือพ่นด้วยสาร anisaldehyde ในกรดซัลฟิวริก (หรือ vanillin) หลังจากให้ความร้อนกับแผ่น TLC สีของสารจะปรากฏ จากนั้นนำไปวัดค่า R_f

3.13.2 วิธี preparative TLC (PTLC)

เป็นวิธีการทำสารให้บริสุทธิ์ หลักการเช่นเดียวกับวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 20 x 20 ซม. และตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC หลังจากดีเวลลอป (develop) โดยส่องภายใต้รังสี ยู วี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร จากนั้นขีดแถบของซิลิกาเจลที่ปรากฏแถบของสารออกมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม กรองส่วนของซิลิกาเจลออก นำส่วนของสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ ซึ่งน้ำหนัก ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารโดยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี

3.13.3 การแยกสารสกัดในเอทิลเอซิเตตจากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำสารสกัดในเอทิลเอซิเตตจากอาหารเลี้ยง 5.463 กรัม มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจล 60 No. 9385 เป็นตัวดูดซับ (350 กรัม) ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่างๆกันเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปหามาก คือ คลอโรฟอร์ม สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล และเมทานอล เก็บสารละลายที่ชะครั้งละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาตรวจสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน จากนั้นนำส่วนที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

3.13.4 การแยกสารจากส่วน F8

นำสารจากส่วน F8 353.2 มิลลิกรัมซึ่งได้จากการแยกสารสกัดในเอทิลแอลกอฮอล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟีและเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบพบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus* มีบริเวณยับยั้งกว้างกว่าทุกส่วนจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจล 60 No. 9385 เป็นตัวดูดซับ (60 กรัม) ชะคอลลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่างๆกันเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปหามาก คือ สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน คลอโรฟอร์ม สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล และเมทานอล เก็บสารละลายที่ชะครั้งละ 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาตรวจสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ผลการแยกสารจากส่วน F8 แสดงไว้ในส่วนของผลการทดลอง

3.13.5 การแยกสารจากส่วน F4

นำสารจากส่วน F4 130.5 มิลลิกรัมซึ่งได้จากการแยกสารสกัดในเอทิลแอลกอฮอล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟี และเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบพบว่าเป็นส่วนเดียวที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ 4 ชนิดคือ *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* จึงนำส่วน F4 ซึ่งเป็นผลึกรูปเข็มปนอยู่ในน้ำมันสีเหลืองมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกผลึกด้วยสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเฮกเซน แยกส่วนน้ำมันสีเหลืองออก นำส่วนผลึกที่ยังไม่บริสุทธิ์มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เฮกเซนและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 15:85

3.13.6 การตกผลึก

สารประกอบที่มีการตกผลึก สามารถแยกผลึกออกจากสิ่งเจือปนโดยละลายผลึกในตัวทำละลายที่ระเหยง่ายเช่น เฮกเซน เอทิลแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม จนอิมิตัว แยกส่วนที่ละลายมาตกผลึกอีกครั้ง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.14 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์

3.14.1 NMR spectroscopy

บันทึกด้วยเครื่อง Varian รุ่น Mercury 400 สำหรับหาโปรตอนและคาร์บอน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม โดยวัดค่าเคมีคัลชิฟต์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) สารตัวอย่างที่ใช้ ตรวจวัดโดยละลายใน CDCl_3 หรือ CD_3OD หรือ D_2O

3.14.2 Infrared spectroscopy

บันทึกด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet Impact model 410 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร สารตัวอย่างที่ใช้ วัดเตรียมโดยผสมกับโพตัสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นแผ่น (pellet) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร

3.14.3 Mass spectrometry

บันทึกด้วยเครื่อง Fison Instruments Mass Spectrometer model Trio 2000 ของบริษัท Fisons Instruments ประเทศอังกฤษ ใช้ Electron Impact source (EI) ซึ่งมีความต่าง ศักย์ 70 อิเล็กตรอนโวลต์ กระแส 300 ไมโครแอมป์ อุณหภูมิ 180-300 °C สำหรับบันทึกแมสสเปกตรัม

3.14.4 เครื่องวัดจุดหลอมเหลว (Melting point apparatus)

ใช้เครื่อง Fisher Johns Melting Point Apparatus, Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับหาจุดหลอมเหลว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะของตัวอย่างดินรังปลวก

ทำการเก็บตัวอย่างดินรังปลวกจาก 6 จังหวัด ในประเทศไทย จำนวน 15 ตัวอย่างโดยตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมได้มีเนื้อดิน สี และค่า pH แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มา พีเอช และลักษณะของตัวอย่างดินรังปลวก

ตัวอย่างดิน	ที่มาของดิน	ค่า pH	ลักษณะของดินรังปลวก
1	อ. เมือง จ. สระแก้ว	8.38	ดินร่วน สีน้ำตาลแดง
2	อ. อรัญประเทศ จ. สระแก้ว	6.43	ดินร่วน สีดำ
3	อ. เขาฉกรรจ์ จ. สระแก้ว	4.80	ดินเหนียวปนทราย สีน้ำตาล
4	อ.วัฒนานคร จ. สระแก้ว	7.92	ดินร่วน สีเหลืองน้ำตาล
5	อ. มโนรม จ. ชัยนาท	4.56	ดินร่วน ปนทราย สีน้ำตาล
6	อ. เมือง จ. ชัยนาท	3.88	ดินเหนียว จับเป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาล
7	อ. สรรคบุรี จ. ชัยนาท	4.25	ดินร่วน สีน้ำตาลแดง
8	อ.บ้านตาก จ. ตาก	4.25	ดินปนทราย จับตัวเป็นก้อน สีดำ
9	อ. สอยดาว จ. จันทบุรี	6.37	ดินร่วนบริเวณป่ายูคาลิปตัส สีดำ
10	อ. ท่าเกษม จ. สระแก้ว	7.64	ดินร่วน สีดำ
11	อ. เมือง จ. สระแก้ว	7.53	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาลอ่อน
12	อ. ปะนาเร จ. ปัตตานี	6.26	ดินร่วน สีเทาเข้ม
13	อ. สายบุรี จ. ปัตตานี	5.72	ดินร่วน สีน้ำตาล
14	อ. ปาย จ. แม่ฮ่องสอน	5.74	ดินร่วนแข็ง สีน้ำตาลดำ
15	อ. ปางมะผ้า จ. แม่ฮ่องสอน	7.08	ดินร่วน สีน้ำตาลดำ

4.2 การแยกแอกติโนมัยซีตจากดินตัวอย่าง

จากการแยกแอกติโนมัยซีตจากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ โซเดียมเคซีเนต ออการ์ พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยซีตได้จำนวน 79 สายพันธุ์ เรียงตามลำดับตัวอย่างดินที่นำมาแยก ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง

ลำดับตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีตที่แยกได้	รวม
1	Ac1.1	1
2	Ac2.1, Ac2.2	2
3	Ac3.1, Ac3.2, Ac3.3	3
4	Ac4.1, Ac4.2, Ac4.3, Ac4.4, Ac4.5	5
5	Ac5.1, Ac5.2, Ac5.3, Ac5.4, Ac5.5, Ac5.6, Ac5.7	7
6	Ac6.1, Ac6.2, Ac6.3, Ac6.4, Ac6.5, Ac6.6, Ac6.7, Ac6.8, Ac6.9, Ac6.10	10
7	Ac7.1, Ac7.2, Ac7.3, Ac7.4, Ac7.5	5
8	Ac8.1, Ac8.2, Ac8.3, Ac8.4	4
9	Ac9.1, Ac9.2, Ac9.3, Ac9.4, Ac9.5, Ac9.6, Ac9.7, Ac9.8, Ac9.9, Ac9.10, Ac9.11, Ac9.12, Ac9.13, Ac9.14, Ac9.15, Ac9.16 Ac9.17	17
10	Ac10.1, Ac10.2, Ac10.3, Ac10.4, Ac10.5, Ac10.6, Ac10.7, Ac10.8	8
11	Ac11.1, Ac11.2, Ac11.3	3
12	Ac12.1	1
13	Ac13.1, Ac13.2, Ac13.3	3
14	Ac14.1, Ac14.2, Ac14.3, Ac14.4, Ac14.5, Ac14.6	6
15	Ac15.1, Ac15.2, Ac15.3, Ac15.4	4

4.3 การทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีด

นำแอกติโนมัยซีดที่แยกได้จากดินร่วนปนโคลนทั้งหมด 79 สายพันธุ์ มาทดสอบโดยวิธี agar cross streak กับจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมด 7 ชนิดดังนี้

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Bacillus subtilis ATCC 6633

Escherichia coli ATCC 25922

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Candida albicans ATCC 70014

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5169

Aspergillus niger ATCC 6275

พบว่าแอกติโนมัยซีดแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตาราง 4.3 ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีด

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีด	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>B. subtilis</i> 6633	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>C. albicans</i> 70014	<i>S. cerevisiae</i> 5169	<i>A. niger</i> 6275
Ac 1.1	-	-	-	-	-	-	-
Ac 2.1	-	+	-	+	-	-	++
Ac 2.2	-	++	-	++	++	++	+++
Ac 3.1	-	-	-	-	-	-	-
Ac 3.2	-	-	-	-	-	-	-
Ac 3.3	-	+	-	+	+++	+++	-
Ac 4.1	-	-	-	-	-	-	-
Ac 4.2	-	+	-	+	-	-	-
Ac 4.3	-	++	+	++	-	-	-
Ac 4.4	-	+	+	+	-	-	-
Ac 4.5	-	+	+	+	-	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอคติโนมัยซีต

สายพันธุ์ แอคติโนมัยซีต	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>B. subtilis</i> 6633	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>C. albicans</i> 70014	<i>S. cerevisiae</i> 5169	<i>A. niger</i> 6275
Ac 5.1	-	-	-	++	-	-	-
Ac 5.2	-	+++	-	++	+	+	++
Ac 5.3	-	+++	-	-	-	-	-
Ac 5.4	-	+	-	-	-	-	-
Ac 5.5	-	++	-	++	-	-	-
Ac 5.6	-	++++	-	++	-	-	-
Ac 5.7	-	++++	-	++	-	-	+
Ac 6.1	-	+	-	-	-	-	-
Ac 6.2	-	-	-	-	-	-	-
Ac 6.3	-	-	-	-	-	+	+++
Ac 6.4	-	+++	-	+++	++	++	++
Ac 6.5	-	-	-	-	-	-	-
Ac 6.6	-	-	-	-	-	-	-
Ac 6.7	-	-	-	-	-	-	-
Ac 6.8	-	-	-	-	-	-	-
Ac 6.9	-	+	-	+	-	-	-
Ac 6.10	-	-	-	-	-	-	-
Ac 7.1	-	+	-	-	-	-	-
Ac 7.2	-	+	-	+	+	+	++
Ac 7.3	+	+++	-	+++	-	-	-
Ac 7.4	-	+	-	-	-	-	++
Ac 7.5	-	+++	-	+++	-	-	++
Ac 8.1	-	++	+	++	-	-	-
Ac 8.2	-	+++	-	+++	-	-	+
Ac 8.3	-	-	-	-	-	-	-
Ac 8.4	-	++	+	+	-	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอคติโนมัยซีต

สายพันธุ์ แอคติโนมัยซีต	ระดับการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>B. subtilis</i> 6633	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>C. albicans</i> 70014	<i>S. cerevisiae</i> 5169	<i>A. niger</i> 6275
Ac 9.1	+	+++	+++	+++	++	++	+++
Ac 9.2	-	-	-	+++	-	-	-
Ac 9.3	-	-	-	+	-	-	-
Ac 9.4	-	-	-	-	+	+	++
Ac 9.5	-	++	-	-	+	+	++
Ac 9.6	-	++	+	++	++	++	+++
Ac 9.7	-	++	+	++	-	++	++
Ac 9.8	-	++	++	++	++	++	+++
Ac 9.9	-	+++	-	+++	-	-	-
Ac 9.10	-	+++	-	+++	-	-	-
Ac 9.11	-	+	+	+	-	-	-
Ac 9.12	-	+	-	-	-	-	-
Ac 9.13	-	++	-	+	-	-	-
Ac 9.14	-	++	-	++	-	++	+
Ac 9.15	-	++	-	++	++	+	++
Ac 9.16	-	-	-	-	-	-	-
Ac 9.17	-	-	-	-	++	+	++
Ac 10.1	-	++	-	+	+	+	++
Ac 10.2	-	-	-	++	-	-	-
Ac 10.3	-	-	-	-	-	-	-
Ac 10.4	-	-	-	++	-	-	-
Ac 10.5	-	+	-	-	-	-	-
Ac 10.6	-	++	++	++	+	-	++
Ac 10.7	+	-	-	++	-	-	-
Ac 10.8	-	+	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอคติโนมัยซีต

สายพันธุ์ แอคติโนมัยซีต	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>B. subtilis</i> 6633	<i>E. coli</i> 25922	<i>S. aureus</i> 25923	<i>C. albicans</i> 70014	<i>S. cerevisiae</i> 5169	<i>A. niger</i> 6275
Ac 11.1	-	+	-	-	+	+	-
Ac 11.2	-	-	-	-	-	-	-
Ac 11.3	-	-	-	-	-	-	-
Ac 12.1	-	+	-	+	-	-	-
Ac 13.1	-	+	-	+	-	+	++
Ac 13.2	-	+++	-	++	-	+	++
Ac 13.3	-	+++	-	+++	+	+	++
Ac 14.1	-	++	-	+	-	-	-
Ac 14.2	-	-	-	-	-	-	-
Ac 14.3	-	++	-	-	-	-	+
Ac 14.4	-	++	-	++	-	-	+
Ac 14.5	-	-	-	-	+	-	-
Ac 14.6	-	+	-	+	-	-	++
Ac 15.1	-	-	-	-	-	-	++
Ac 15.2	-	-	-	-	-	-	-
Ac 15.3	-	++	+	++	-	-	-
Ac 15.4	-	+	-	+	-	-	-

หมายเหตุ ++++ = ความกว้างของ Inhibition zone 30 มิลลิเมตรขึ้นไป

+++ = ความกว้างของ Inhibition zone 20-29 มิลลิเมตร

++ = ความกว้างของ Inhibition zone 10-19 มิลลิเมตร

+ = ความกว้างของ Inhibition zone 1-9 มิลลิเมตร

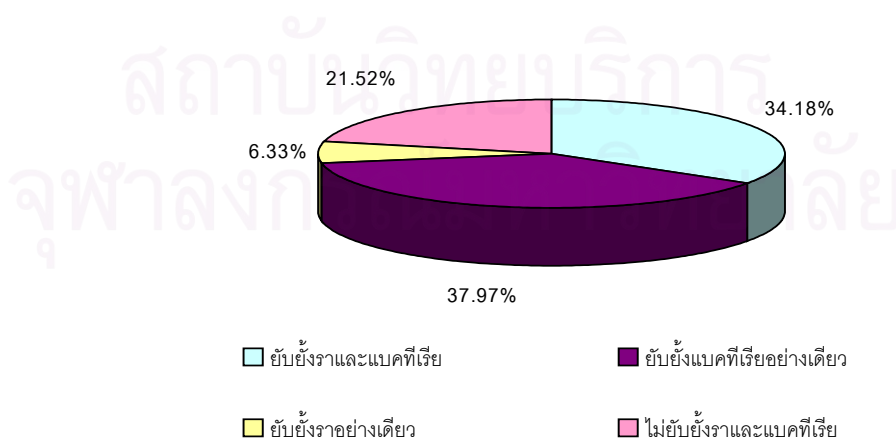
- = ไม่ยับยั้ง

4.4 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

จากการทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีดทั้งหมด 79 สายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ยับยั้งราอย่างเดียว กลุ่มที่ 2 ยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดียว กลุ่มที่ 3 ยับยั้งทั้งราและแบคทีเรีย กลุ่มที่ 4 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ตารางที่ 4.4 แสดงจำนวนสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แสดงดังแผนภูมิวงกลมในรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.4 จำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีดที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่ม

ขอบเขตการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีด	รวม	%
ยับยั้งราและแบคทีเรีย	Ac 2.1, Ac 2.2, Ac 3.3, Ac 5.2, Ac 5.7, Ac 6.4, Ac 7.2, Ac 7.3, Ac 7.4, Ac 7.5, Ac 8.2, Ac 9.1, Ac 9.5, Ac 9.6, Ac 9.7, Ac 9.8, Ac 9.14, Ac 9.15, Ac 10.1, Ac 10.6, Ac 11.1, Ac 13.1, Ac 13.2, Ac 13.3, Ac 14.3, Ac 14.4, Ac 14.6,	27	34.18
ยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดียว	Ac 4.2, Ac 4.3, Ac 4.4, Ac 4.5, Ac 5.1, Ac 5.3, Ac 5.4, Ac 5.5, Ac 5.6, Ac 6.1, Ac 6.9, Ac 7.1, Ac 8.1, Ac 8.4, Ac 9.2, Ac 9.3, Ac 9.9, Ac 9.10, Ac 9.11, Ac 9.12, Ac 9.13, Ac 10.2, Ac 10.4, Ac 10.5, Ac 10.7, Ac 10.8, Ac 12.1, Ac 14.1, Ac 15.3, Ac 15.4	30	37.97
ยับยั้งราอย่างเดียว	Ac 6.3, Ac 9.4, Ac 9.17, Ac 14.5, Ac 15.1,	5	6.33
ไม่ยับยั้งราและแบคทีเรีย	Ac 1.1, Ac 3.1, Ac 3.2, Ac 4.1, Ac 6.1, Ac 6.5, Ac 6.6, Ac 6.7, Ac 6.8, Ac 6.10, Ac 8.3, Ac 9.16, Ac 10.3, Ac 11.2, Ac 11.3, Ac 14.2, Ac 15.2,	17	21.52



รูปที่ 4.1 แผนภูมิวงกลมการจัดกลุ่มการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ของแอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบคือ 78.48% ส่วนเปอร์เซ็นต์ของแอกติโนมัยซีดที่ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบคือ 21.52% ซึ่งให้เห็นว่าดินร้งปลวกเป็นแหล่งของแอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ทั้งนี้เนื่องจากดินร้งปลวกมีการสะสมของไคตินซึ่งเกิดจากปีกและเปลือกผิวนอกของปลวกที่ตาย และแอกติโนมัยซีดส่วนมากโดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* สามารถย่อยสลายไคตินเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน (Kutzner, 1981) ดังนั้นแอกติโนมัยซีดจึงพบได้มากในแหล่งที่มีการสะสมของไคติน (Schrempf, 2001)

นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มของแอกติโนมัยซีดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดียวมียุ่จำนวนมากที่สุดคือ 37.97% และสามารถแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกอย่างเดียวกึ่งถึง 70% ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบเพปติโดไกลแคนไว้ เมมเบรนนี้มีไขมันมากถึง 11-12% ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นสารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541)

4.5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

จากการทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะโดยวิธี agar cross streak พบว่าแอกติโนมัยซีด สายพันธุ์ Ac 9.1 เป็นสายพันธุ์เดียว จากทั้งหมด 79 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งหมด 7 ชนิด ดังรูปที่ 4.2 แสดงถึงขอบเขตการยับยั้งแบบ broad spectrum คือสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย (*P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *S. aureus*) ยีสต์ (*C. albicans* และ *S. cerevisiae*) และรา (*A. niger*) จึงคัดเลือกแอกติโนมัยซีดสายพันธุ์ Ac 9.1 เพื่อนำไปศึกษาสารปฏิชีวนะที่ผลิตขึ้นต่อไป



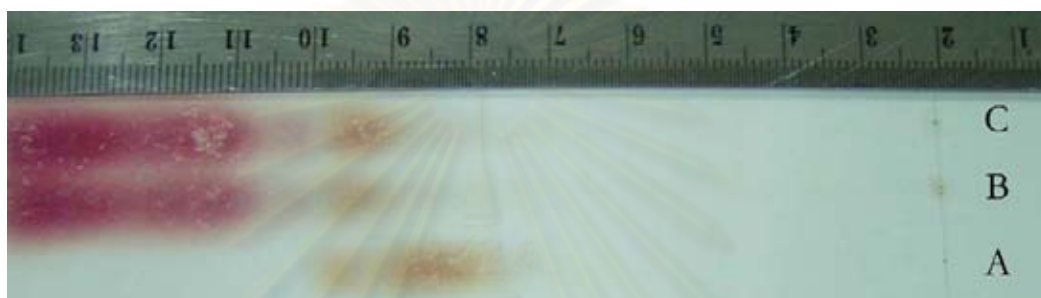
รูปที่ 4.2 การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* และ *A. niger* ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

4.6 การวิเคราะห์หา 2,6-diaminopimelic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 (Cross และ Goodfellow, 1973)

เมื่อนำสารสกัดที่เตรียมด้วยวิธีข้อ 3.7.2 มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟีตามวิธีทดลองข้อ 3.7.3 ใช้ไนนิไฮดรินเป็นตัวตรวจสอบ วัดค่า R_f เทียบกับสารมาตรฐาน 2,6-diaminopimelic acid พบว่าสารสกัดจากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีค่า R_f เท่ากับค่า R_f ของ *Streptomyces aminophilus* ATCC 14961 และไอโซเมอร์ชนิด L ของสารมาตรฐาน 2,6-diaminopimelic acid ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.3 จึงสามารถจัดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ให้อยู่ในกลุ่มแอกติโนมัยซีตที่มีผนังเซลล์แบบที่ I ตามการแบ่งของ Williams และคณะในปี 1989 ซึ่งผนังเซลล์แบบที่ I พบในแอกติโนมัยซีตในกลุ่มที่ 1 คือสกุล *Nocardioidea* และสกุล *Terrabacter* แอกติโนมัยซีตกลุ่มที่ 4 คือ Streptomyces และสกุลที่เกี่ยวข้อง และแอกติโนมัยซีตกลุ่มที่ 8 คือสกุล *Kitasatosporia* ตามการแบ่งของ Holt และคณะในปี 1994 จากข้อมูลที่ได้สามารถสันนิษฐานได้ว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 อาจอยู่ใน 3 กลุ่มที่กล่าวมาข้างต้น

ตารางที่ 4.5 ค่า R_f ของสารสกัด และสารมาตรฐาน 2,6-diaminopimelic acid

ตัวอย่าง	ค่า R_f
สารสกัดจากแอกติโนมัซซีตสายพันธุ์ Ac 9.1	0.45
สารสกัดจาก <i>Streptomyces aminophilus</i> ATCC 14961	0.45
สารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมิสิก (ไอโซเมอร์ชนิด meso)	0.41
สารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมิสิก(ไอโซเมอร์ชนิด L)	0.46



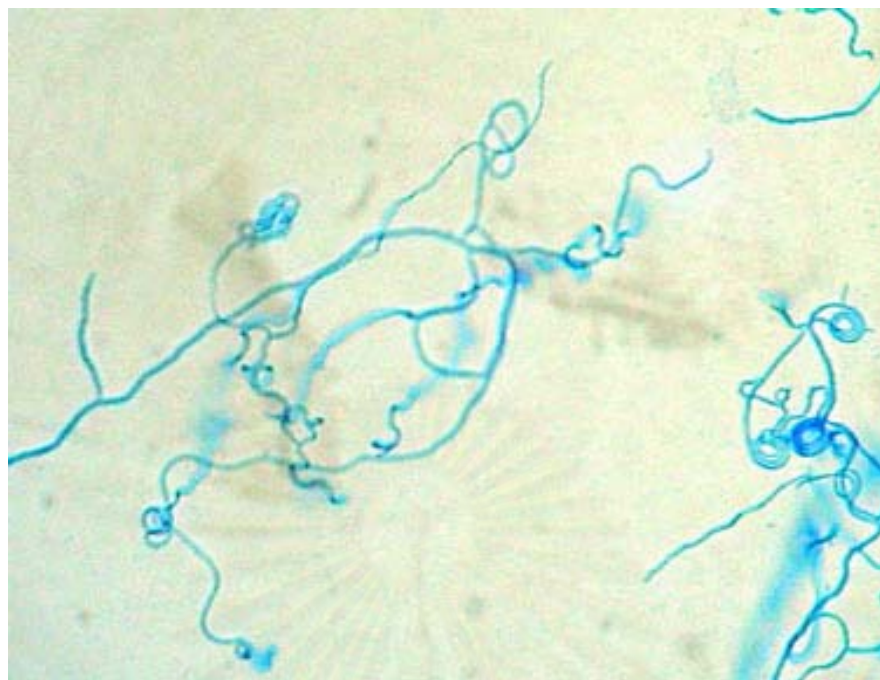
รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมแสดงแถบของสารสกัด DAP ด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี
A = สารมาตรฐาน B = Ac 9.1 C = *S. aminophilus*

4.7 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัซซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

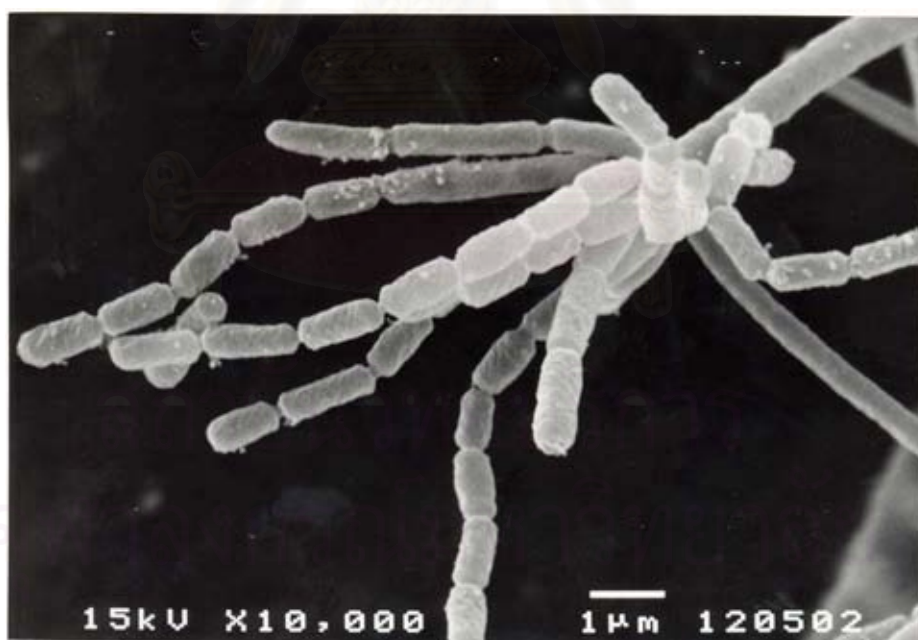
ศึกษาตามวิธีที่รายงานโดย Williams และคณะ Bergey's Manual of systematic Bacteriology Volume 4. (Williams et al., 1989)

4.7.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

จากการนำแอกติโนมัซซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาทำ slide culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 4 อินออร์แกนิก ซอสล์ สตาร์ช อการ์ พบว่ามีการสร้างสายใยอาหาร และสายใยอากาศที่มีลักษณะขดเป็นวงซ้อนกัน เส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง แสดงดังรูปที่ 4.4 มีการสร้างสปอร์ปลายเส้นใย สปอร์โตเต็มที่ในวันที่ 7 และจากการศึกษาลักษณะสปอร์และสายสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว สายสปอร์มีลักษณะค่อนข้างตรง เป็นแบบ rectus-flexibilis แตกจากปลายเส้นใยเป็นข้อ ดังรูปที่ 4.5 และ 4.6 และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า สปอร์มีความยาวประมาณ 1 ไมโครเมตร สปอร์มีรูปทรงกระบอก (cylindrical) ปลายมน มีผิวเรียบ แสดงดังรูป 4.7



รูป 4.4 ภาพของสายใยอากาศของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีลักษณะขดเป็นวงซ้อนกัน เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า



รูป 4.5 ภาพของสายสปอร์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีลักษณะค่อนข้างตรงสปอร์ท่อกันเป็นสายยาว เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 10,000 เท่า



รูป 4.6 แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีการสร้างสายสปอร์ที่ปลายเส้นใย สายสปอร์แตกออกเป็นข้อจากปลายเส้นใย เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 5,000 เท่า



รูปที่ 4.7 แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีผิวของสปอร์เรียบ รูปทรงกระบอก เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500 เท่า

จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ให้อยู่ในกลุ่มที่ 4 คือ Streptomyces และสกุลที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากแอกติโนมัยซีตในกลุ่มที่ 1 คือสกุล *Nocardioidea* เป็นสกุลที่มีการแตกหักของเส้นสายใยอากาศและสายใยอาหาร ซึ่งไม่พบในแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ส่วนสกุล *Terrabacter* มีการสร้างเฉพาะสายใยอาหารเท่านั้น และแอกติโนมัยซีตกลุ่มที่ 8 คือสกุล *Kitasatospora* มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาว แต่ไม่พบการสร้างการสร้างสายสปอร์ต่อกันเป็นซ่อ (Holt et al, 1994)

ในกลุ่มที่ 4 คือ Streptomyces และสกุลที่เกี่ยวข้อง ประกอบไปด้วยสกุล *Streptomyces*, สกุล *Streptoverticillium*, สกุล *Intrasporangium*, สกุล *Kineospora* และสกุล *Sporichthya* จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ไม่พบการสร้างสปอร์ในอับสปอร์เช่นเดียวกับสกุล *Intrasporangium* และ สกุล *Kineospora* และสปอร์ไม่เคลื่อนที่ซึ่งแตกต่างจากสกุล *Sporichthya* แต่มีลักษณะสายสปอร์ที่แตกออกเป็นซ่อ สปอร์ต่อกันเป็นสายยาว ซึ่งเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบในสกุล *Streptomyces* หรือ สกุล *Streptoverticillium* ซึ่งเป็นสกุลที่ใกล้เคียงกัน การศึกษาสรีระวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA จะทำให้ทราบถึงสกุลและสปีชีส์ที่แน่นอนของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

4.7.2 ศึกษาการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project (ISP) media

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 6 ชนิด คือ

ISP 1 - TYEA Tryptone - yeast extract agar

ISP 2 - YMEA Yeast - malt extract agar

ISP 3 - OA Oat meal agar

ISP 4 - ISSA Inorganic salts starch agar

ISP 5 - GAA Glycerol asparagine agar

ISP 6 - PYEA Peptone-yeast extract agar

ศึกษาการเจริญ และเมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ บันทึกลักษณะของสายใยอากาศ สายใยอาหาร รังควัตถุที่ละลายน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ลักษณะของโคโลนี สีของสายใยอากาศ และสีของสายใยอาหารบนอาหาร ISP 2 Yeast - malt extract agar และอาหาร ISP 4 Inorganic salts starch agar แสดงดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 การเจริญของแบคทีเรียในยีสต์สายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP

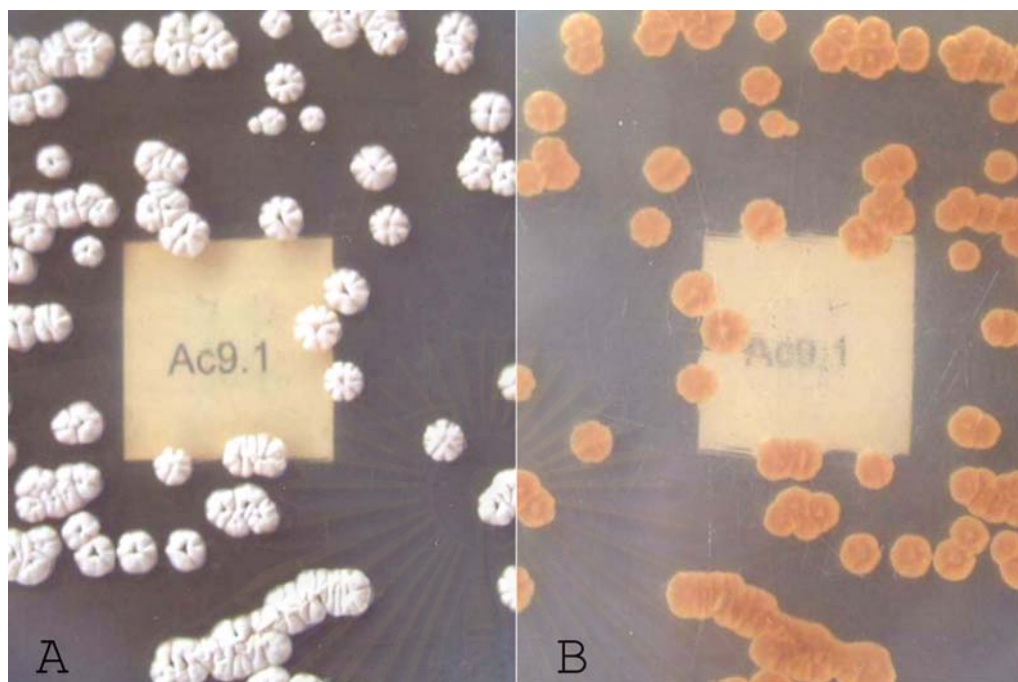
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะการเจริญ	
ISP 1 - TYA Trypton-yeast extract agar	G	ดีมาก
	AM	ขาวเทา
	SM	น้ำตาล
	SP	น้ำตาลอ่อน
ISP 2 - YMEA Yeast - malt extract agar	G	ปานกลาง
	AM	ขาวน้ำตาล
	SM	น้ำตาลเหลือง
	SP	ไม่มี
ISP 3 - OA Oat meal agar	G	ดี
	AM	ขาวส้ม
	SM	ส้ม
	SP	น้ำตาล
ISP 4 - ISSA Inorganic salts starch agar	G	ดี
	AM	ขาวเหลือง
	SM	ขาวเหลืองน้ำตาล
	SP	สีน้ำตาลอ่อน
ISP 5 - GAA Glycerol asparagine agar	G	ปานกลาง
	AM	ขาวน้ำตาล
	SM	ขาวน้ำตาล
	SP	ไม่มี
ISP 6 - PYEA Peptone-yeast extract agar	G	ดีมาก
	AM	น้อยสีน้ำตาลอ่อนออกขาว
	SM	สีน้ำตาลอ่อน
	SP	ไม่มี

หมายเหตุ G การเจริญ (Growth)

SM สายใยอาหาร

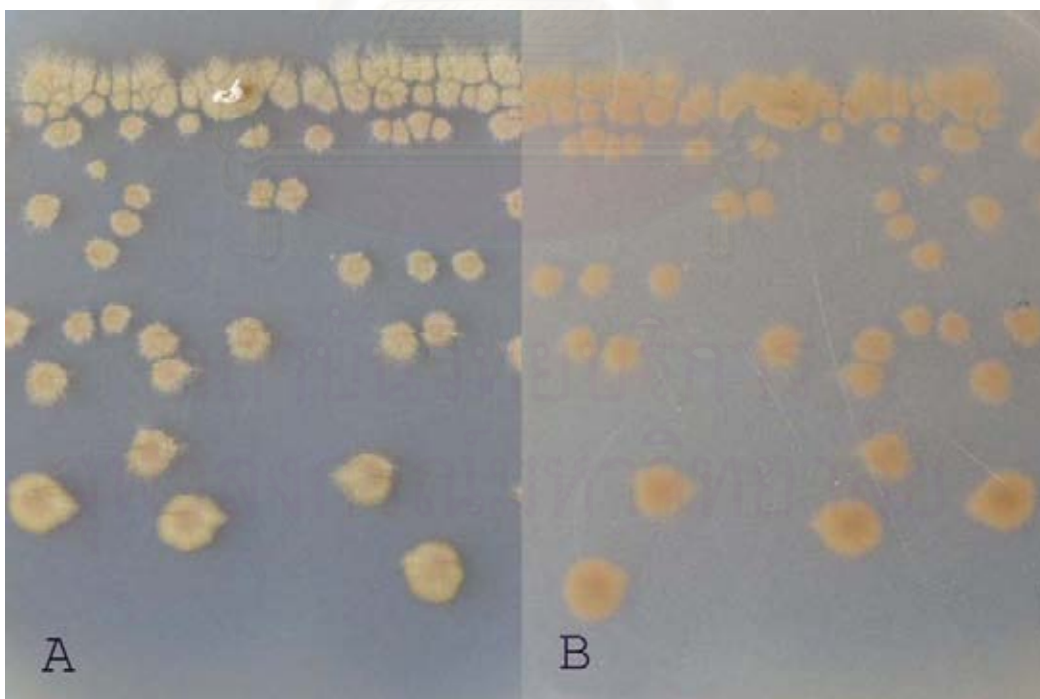
AM สายใยอากาศ

SP รงควัตถุที่ละลายน้ำ



รูปที่ 4.8 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหาร ISP 2

A คือสีของสายใยอากาศ B คือสีของสายใยอาหาร



รูปที่ 4.9 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 บนอาหาร ISP 4

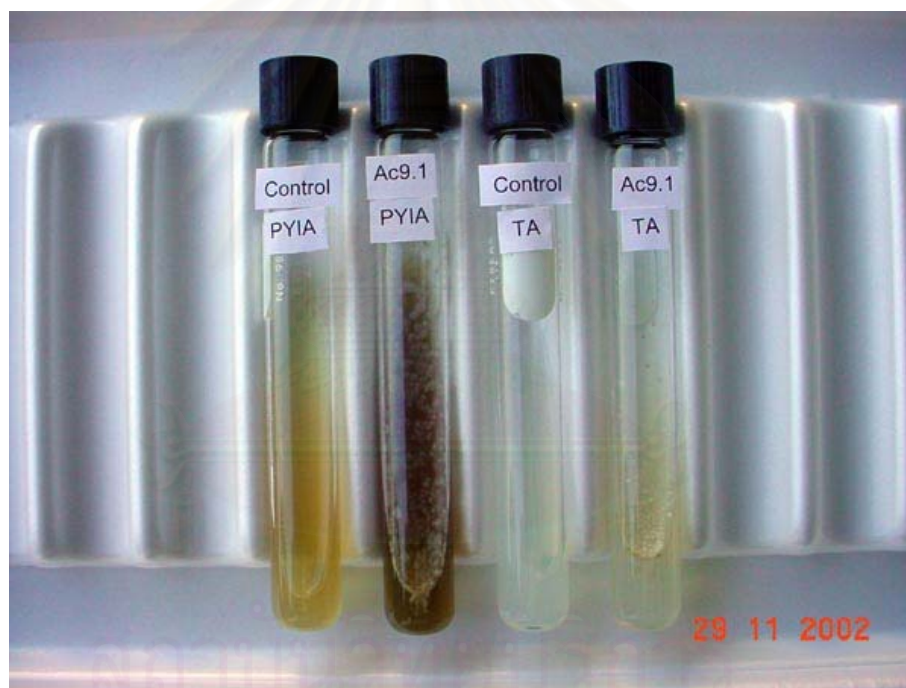
A คือสีของสายใยอากาศ B คือสีของสายใยอาหาร

4.7.3 การศึกษาการสร้างรงควัตถุเมลานิน

จากการนำแอกติโนมัยซีต Ac 9.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียงเปปโตเนเยสต์เอกซ์แทรก โอโรน อการ์ และอาหารวุ้นเอียงไทโรซีน อการ์ สามารถตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมลานินจากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.10 เมื่อเจริญบนอาหารเปปโตเนเยสต์เอกซ์แทรก โอโรน อการ์ สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเจริญบนอาหารไทโรซีนอการ์

4.7.4 การรีดิวส์ในเตรทและการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาตรวจสอบการรีดิวส์ในเตรทและการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ พบว่า Ac 9.1 สามารถรีดิวส์ในเตรทได้ แต่ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์



รูปที่ 4.10 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปปโตเนเยสต์เอกซ์แทรก โอโรน อการ์ (PYIA) และอาหารเลี้ยงเชื้อไทโรซีน อการ์ (TA) เมื่อเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีต Ac 9.1 เป็นเวลา 7 วัน

4.7.5 การศึกษาสมบัติการย่อยสลายสาร

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ ที่เติมสารที่ต้องการตรวจสอบการย่อยสลายสารแต่ละชนิดลงไป ผลแสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบ

สารทดสอบ	ผลการย่อยสลายสาร
อะดีนีน(adenine)	-
ไทโรซีน(tyrosine)	+
ไซแลน(xylan)	+
แซนทีน(xanthine)	+
เคซีน(casein)	+
เจลาติน(gelatin)	+
แป้ง(starch)	+

+ : ย่อย - : ไม่ย่อย

4.7.6 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ และตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆคือ 4 10 37 และ 45 °C ผลการเจริญแสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ความสามารถเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

การเจริญที่ อุณหภูมิต่างๆ ของ Ac9.1	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	4	10	37	45
	-	-	+	+

+ : เจริญ - : ไม่เจริญ

4.7.7 การตรวจสอบการเจริญที่พีเอชเท่ากับ 4.3

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ ที่ปรับพีเอช เท่ากับ 4.3 ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีต พบว่า Ac 9.1 สามารถเจริญที่ภาวะพีเอชเท่ากับ 4.3 ได้

4.7.8 การตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน

จากการนำแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบซอลมีเดียม ที่เติมสารประกอบไนโตรเจนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนโดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม ที่ไม่ได้เติมสาร และชุดควบคุมบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม ที่เติมแอสปารากีน หรือโปรลีน ผลแสดงดัง ตาราง 4.9

ตารางที่ 4.9 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารประกอบไนโตรเจน	การเจริญของAc9.1
L- อาจีนีน	-
L- ฮีสทีดีน	+
L- เมทไทโอนีน	+
โพแทสเซียมไนเตรท	+
L- ฟีนิลอะลานีน	-
L- ซีรีน	-
L- ธีโอนีน	+
L- วาลีน	+

+ : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ

4.7.9 การตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน

จากการนำแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิลิเซชัน อการ์ ที่เติมสารประกอบคาร์บอนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิลิเซชัน อการ์ ที่ไม่ได้เติมสาร และชุดควบคุมบวกคือ อาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิลิเซชัน อการ์ที่ประกอบด้วย กลูโคส ผลแสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารประกอบคาร์บอน	การเจริญของAc9.1
L- อะราบิโนส	+
เดกแทรนซ์	+
D- ฟรุกโตส	+
D- กาแลคโตส	+
มีไซ-อินโนซิทอล	-
D- แลคโตส	-
D- แมนนิทอล	-
D- แมนโนส	+
L- แรมโนส	+
ซาลิซิน	-
ซูโครส	+
ไซโลส	+
ไซเดียมอะซิเตท	-
ไซเดียมซิเตรท	+
ไซเดียมมาโลเนท	-

+ : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ

4.8 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

จากการจำแนกสกุลของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ตามหลักการจำแนกอ้างอิงตาม Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4. (Williams et al., 1989) พบว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* หรือ สกุล *Streptovorticillium* และผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกสกุลและสปีชีส์ที่แน่ชัดได้ เพื่อจำแนกสกุลและสปีชีส์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 อย่างชัดเจนจึงได้ทำการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของ แต่เนื่องจากในกลุ่ม Streptomyces ชนิดต่างๆ มีส่วนลำดับเบสอนุรักษ์อยู่มาก (conserved sequence) ดังนั้นจึงต้องออกแบบไพรเมอร์ โดยครอบคลุมช่วงที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด (hypervariable region) ของลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ดังนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์อ้างอิงข้อมูลตาม Kataoka และคณะ (1997) จากนั้นจึงส่งตัวอย่างแอกติโนมัยซีต

สายพันธุ์ Ac 9.1 ไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่ Asian Natural Environmental Science Center, the University of Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 แสดงดังรูปที่ 4.11

5'	10	20	30	40	50	60
	GCGGCTGCTG	GCACGTAGTT	AGCCGGCGCT	TCTTCTGCAG	GTACCGTCAC	TTTCGCTTCT
	70	80	90	100	110	120
	TCCCTGCTGA	AAGAGGTTTA	CAACCCGAAG	CCGTCATCCC	TCACGCGGCG	TCGCTGCATC
	130	140	150	160	170	180
	AGGCTTTTCGC	CCATTGTGCA	ATATTCCCCA	CTGCTGCCCTC	CCGTAGAGTC	TGGGCCGTGT
	190	200	210	220	230	240
	CTCAGTCCCA	GTGTGGCCGG	TCGCCCTCTC	AGGCCGGCTA	CCCGTCGTCG	CCTTGGTAGG
	250	260	270	280	290	300
	CCATCACCCC	ACCAACAAGC	TGATAGGCCG	CGGGCTCATC	CTTGACCCGC	CGGAGCTTTC
	310	320	330	340	350	360
	CACCACCAAC	CATGCGGTCA	GCGGTCGTAT	CCGGTATTAG	ACCCCGTTTC	CAGGGCTTGT
	370	380	390	400	410	420
	CCCAGAGTGC	AGGGCAGATT	GCCCACGTGT	TACTCACCCG	TTCGCCACTA	ATCCACCCCG
	430	440	450	460	470	480
	AAGGGCTTCA	TCGTTCGACT	TGCATGTGTT	AAGCACGCCG	CCAGCGTTCG	TCCTGAGCCA
	490					
	GGATCAAAC	CTCCGTGA	3'			

รูปที่ 4.11 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

จากนั้นนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ที่บันทึกและรวบรวมไว้ใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ddbj.nig.ac.jp> พบว่า ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces griseocarneus* โดยมีความเหมือน (% identity) เท่ากับ 98% ในตารางที่ 4.11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาเปรียบเทียบกับ *Streptomyces griseocarneus* NCIMB 40447

ตารางที่ 4.11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac9.1 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces griseocarneus* NCIMB 40447

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา	สายพันธุ์แอคติโนมัยซีต	
	Ac 9.1	<i>Streptomyces griseocarneus</i> NCIMB 40447*
สีของสายใยอาหาร	เหลือง-น้ำตาล	น้ำตาล
สีของสายใยอากาศ	เหลือง-น้ำตาล	น้ำตาลอ่อน หรือ ชมพู
สปอร์	ขาว	ขาว
รูปร่างสปอร์	ทรงกระบอก(cylindrical)	ทรงกระบอก(cylindrical)
ลักษณะผิวสปอร์	เรียบ	เรียบ
ลักษณะสายสปอร์	สายตรง	สายตรง
การสร้างรงควัตถุ เมลานิน	+	-
การสร้างรงควัตถุ	+	-
การรีดิวซ์ไนเตรท	+	-
การสร้างก๊าซ H ₂ S	-	-
การย่อยสลาย เจลาติน	+	+
แป้ง	+	+
การใช้แหล่งคาร์บอน ไซโลส	+	+
L- อะราบิโนส	+	-
L-แรมโนส	+	-
D-ฟรุกโตส	+	+
D-กาแลคโตส	+	+
ซูโครส	+	+
D-แมนนิทอล	-	-

หมายเหตุ + : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

ที่มา : Soliveri, J. และคณะ (1987)

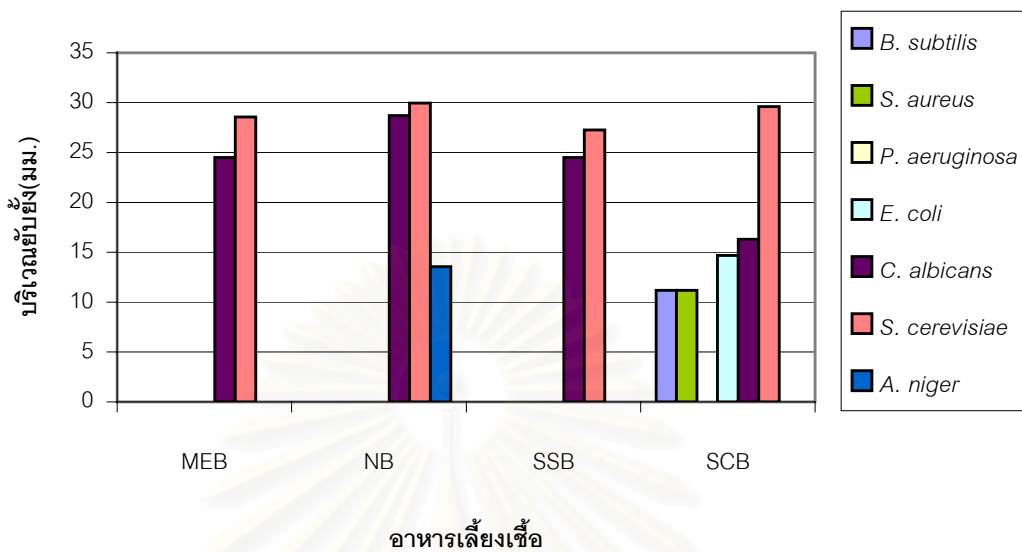
4.9 การสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว

4.9.1 ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว 4 ชนิดคือ nutrient broth (NB), malt extract broth (MEB), sodium caseinate broth (SCB) และ soluble starch broth (SSB)

เมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลวทั้ง 4 ชนิด ตามวิธีในข้อ 3.10.3 ผลการทดลองในวันที่ 3, 5 และ 7 แสดงดังแผนภูมิรูปที่ 4.12, 4.13 และ 4.14 ตามลำดับ จากแผนภูมิในวันที่ 3, 5 และ 7 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว SCB ในวันที่ 3, 5 และ 7 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *E.coli* และ *S. aureus* ได้ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหาร MEB NB และ SSB ไม่สามารถยับยั้งได้ และในวันที่ 3 เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB เป็นอาหารเพียงชนิดเดียวที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *A. niger* ได้ และการเลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 4 ชนิด ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบที่มีความไวน้อยที่สุด ซึ่งให้เห็นว่าประสิทธิภาพการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 นั้นลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารแข็งซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งหมด ทั้งนี้อาจเกิดจากสาเหตุหลายประการคือ การเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้เกิดการแตกหักของเส้นใย (fragmentation) ของเส้นใยเป็นผลให้เชื้อไม่เข้าสู่ระยะ stationary phase จึงไม่มีการสร้างสารปฏิชีวนะ (Shomura, et al., 1979 ; Pickup et al., 1993) หรืออาจมีการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวได้ดีเช่นเดียวกับในอาหารแข็ง แต่การทำลายสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าบนอาหารแข็ง เช่นการทำลายสารโดย decomposing enzyme ซึ่งในอาหารเหลวโอกาสที่สารจะสัมผัสเอนไซม์เป็นไปได้มากกว่า (Maruyama et al., 1975; Suhara et al., 1975)

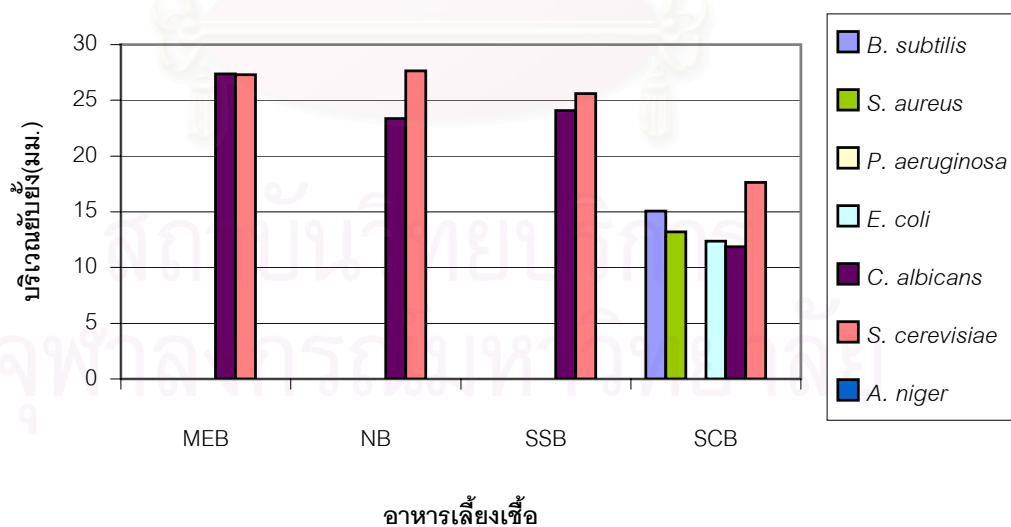
จากผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว SCB สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ถึง 5 ชนิด แต่บริเวณยับยั้งยีสต์และราอ่อนกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว MEB NB และ SSB จึงมีการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB โดยการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และชอยโทนเปปโทน ความเข้มข้น 1% โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มปริมาณสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

บริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 3 วัน



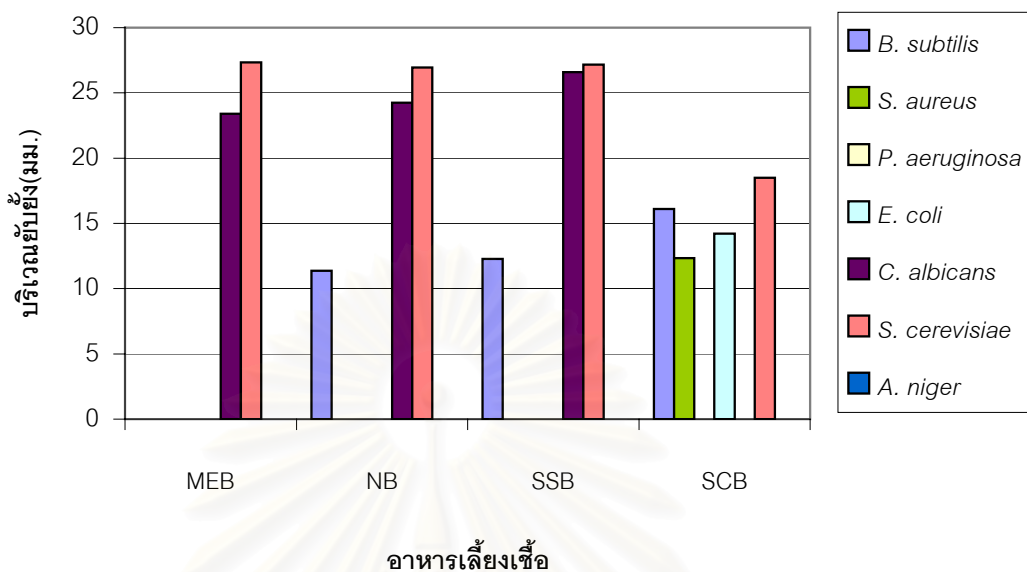
รูปที่ 4.12 แผนภูมิแสดงบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเมื่อเลี้ยงแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว MEB NB และ SSB ในวันที่ 3

บริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 5 วัน



รูปที่ 4.13 แผนภูมิแสดงบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเมื่อเลี้ยงแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว MEB NB และ SSB ในวันที่ 5

บริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 7 วัน



รูปที่ 4.14 แผนภูมิแสดงบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว MEB NB และ SSB ในวันที่ 7

4.9.2 ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะและน้ำหนักรเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว SCB ที่มีการเติม สารสกัดจากยีสต์ เปปไทน์ และซอโยไทน์เปปไทน์ ความเข้มข้น 1% โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว SCB ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ เปปไทน์ และซอโยไทน์เปปไทน์ ความเข้มข้น 1% โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของบริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบ ในวันที่ 3 5 และ 7 แสดงดังตารางที่ 4.12 4.13 และ 4.14 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์ 1% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ในวันที่ 7 เกิดบริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกรเติมเปปไทน์ และซอโยไทน์เปปไทน์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* และ *A. niger* ได้ และจากการศึกษาน้ำหนักรเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร SCB ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ทำให้มีน้ำหนักรเซลล์แห้งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรเติม เปปไทน์ ซอโยไทน์เปปไทน์ และอาหาร SCB ที่ไม่มีการเติมสารอาหาร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.15

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบในวันที่ 3 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวโซเดียมเคซิเนต(SCB) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และชอยโทนเปปโทน 1 % โดยปริมาตร

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้งในวันที่ 3 (มม.)			
	control*	สารสกัดจากยีสต์	เปปโทน	ชอยโทนเปปโทน
<i>B. subtilis</i>	11.20 c	13.30 a	11.20 c	12.33 b
<i>S. aureus</i>	11.43 b	13.10 a	0 c	0 c
<i>E. coli</i>	14.66 b	16.13 a	0 c	0 c
<i>C. albicans</i>	16.53 d	19.96 c	24.56 a	20.46 b
<i>S. cerevisiae</i>	25.60 a	25.53 a	25.63 a	25.60 a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลขในแนวนอน เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

a = ค่าเฉลี่ยที่มากที่สุด รองลงมาคือ b, c และ d ตามลำดับ

* control อาหารเหลวโซเดียมเคซิเนต (SCB)

ตารางที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบในวันที่ 5 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวโซเดียมเคซิเนต(SCB) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และชอยโทนเปปโทน 1 % โดยปริมาตร

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้งในวันที่ 5 (มม.)			
	control*	สารสกัดจากยีสต์	เปปโทน	ชอยโทนเปปโทน
<i>B. subtilis</i>	15.06 b	18.90 a	11.33 d	13.53 c
<i>S. aureus</i>	12.36 b	14.70 a	0 c	0 c
<i>E. coli</i>	13.50 b	14.33 a	0 c	0 c
<i>C. albicans</i>	11.86 d	18.33 c	21.63 a	19.43 b
<i>S. cerevisiae</i>	17.63 d	23.43 a	22.53 b	22.40 c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลขในแนวนอน เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

a = ค่าเฉลี่ยที่มากที่สุด รองลงมาคือ b, c และ d ตามลำดับ

* control อาหารเหลวโซเดียมเคซิเนต (SCB)

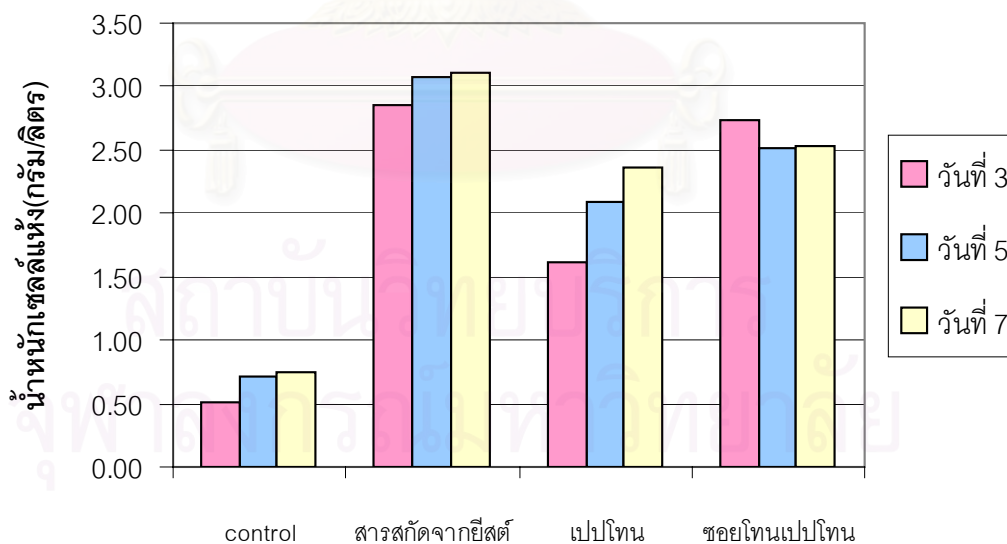
ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวโซเดียมเคซิเนต(SCB) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และชอยโทนเปปโทน 1 % โดยปริมาตร

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้งในวันที่ 7 (มม.)			
	control*	สารสกัดจากยีสต์	เปปโทน	ชอยโทนเปปโทน
<i>B. subtilis</i>	16.10 b	19.36 a	13.46 c	19.50 a
<i>S. aureus</i>	13.73 b	15.66 a	0 c	0 c
<i>E. coli</i>	14.66 b	15.46 a	0 c	0 c
<i>C. albicans</i>	18.60 d	24.90 a	22.60 b	22.06 b
<i>S. cerevisiae</i>	0 d	24.23 a	20.26 b	19.50 c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลขในแนวนอน เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

a = ค่าเฉลี่ยที่มากที่สุด รองลงมาคือ b, c และ d ตามลำดับ

* control อาหารเหลวโซเดียมเคซิเนต (SCB)



รูปที่ 4.15 แผนภูมิแสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม สารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และชอยโทนเปปโทน control คืออาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่ไม่เติมสารอาหาร

จากผลการทดลองพบว่า การเติมสารสกัดจากยีสต์ 1% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB เป็นผลให้การผลิตสารปฏิชีวนะและการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การเติมเปปไทด์ และซอโยโทนเปปไทด์ รวมถึงตัวควบคุมที่ไม่มีการเติมสารอาหาร ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร SCB ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ 1% ได้ดีที่สุด เนื่องจากเจริญได้มากที่สุดนั่นเอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yang และคณะ (1996) มีรายงานว่าถ้าปริมาณเซลล์ในระยะการเจริญสูง เชื้อจะสร้างสารปฏิชีวนะมากขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากยีสต์ประกอบด้วยกรดอะมิโนเป็นส่วนมากคือ ประมาณร้อยละ 50 โดยมวล (Collee et al., 1989) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารปฏิชีวนะได้ Streptomycetes แต่ละชนิดมีความต้องการไนโตรเจนเพื่อใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกันไป เช่นในการผลิต สารปฏิชีวนะ armentomycin โดย *Streptomyces armentosus* พบว่าไลซีนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด (He et al., 1995) ส่วน *S. pristinaespiralis* ใช้กลูตาเมตและอลานีนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต pristinamycin (Voelker และ Altaba, 2001) ดังนั้นเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหาร SCB ที่เติมเปปไทด์ และซอโยโทนเปปไทด์ ไม่เกิดบริเวณยับยั้งของ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ในวันที่ 3 5 และ 7 อาจมีสาเหตุมาจากเปปไทด์ และซอโยโทนเปปไทด์เป็นสารอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 จึงเลือกอาหารเหลว SCB ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ 1 % ในการผลิตสารปฏิชีวนะให้มีปริมาณมากเพียงพอในการวิเคราะห์โครงสร้างของสารปฏิชีวนะต่อไป

4.10 การผลิตสารปฏิชีวนะ

จากการเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหาร SCB ที่มีการเติม 1 % สารสกัดจากยีสต์ เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วย rotary shaker 200 rpm ปริมาตร 30 ลิตร จากนั้นนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใย มาสกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ ตามวิธีข้อ 3.12 น้ำหนักของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการระเหยน้ำออกด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 °C จะมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดคือ 255.73 กรัม และน้ำหนักของเส้นใยเปียกคือ 612.61 กรัม น้ำหนักของสารสกัด และเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสารสกัดต่อน้ำหนักอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยเปียกแสดงดังตาราง ที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 น้ำหนักของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใย

อาหารเลี้ยงเชื้อ 30 ลิตร (255.73)	น้ำหนักของสารสกัดด้วยตัวทำละลาย (กรัม)			
	อาหารเลี้ยงเชื้อ		เส้นใย	
	MeOH	EtOAc	MeOH	EtOAc
	64.98	5.46	12.14	1.28
เปอร์เซ็นต์(w/w)	*25.41	*2.14	#1.98	#0.21

หมายเหตุ * เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสารสกัดจากส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อต่อน้ำหนักของเหลวแห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ (255.73 ก.)

เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสารสกัดจากส่วนของเส้นใยต่อน้ำหนักของเส้นใยเปียก (612.61 ก.)

4.10.1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัด

เมื่อนำสารสกัดทั้ง 4 ชนิดคือ สารสกัดเมทานอลจากอาหารเลี้ยงเชื้อ สารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย และสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากเส้นใย มาทดสอบโดยวิธี disk diffusion กับจุลินทรีย์ทดสอบคือ *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* และ *A. niger* ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.16 จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งหมดที่ความเข้มข้น 10 มก./ ดิสก์ 8 มม และเกิดบริเวณยับยั้ง *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 1 มก./ ดิสก์ 8 มม ส่วนสารสกัดจากเส้นใยด้วยเมทานอลเกิดบริเวณยับยั้งยีสต์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มก./ ดิสก์ 8 มม และเกิดบริเวณยับยั้งกับแบคทีเรียแกรมบวกที่ความเข้มข้น 10 มก./ ดิสก์ 8 มม และสารสกัดจากส่วนของเส้นใยด้วยเอทิลแอลกอฮอล์เกิดบริเวณยับยั้งกับแบคทีเรียแกรมบวกที่ความเข้มข้น 10 มก/ ดิสก์ 8 มม จึงเลือกสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการแยกสารปฏิชีวนะเนื่องจากสามารถเกิดบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด

ผลจากการนำสกัดสารปฏิชีวนะจากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใยด้วย เมทานอลและเอทิลแอลกอฮอล์มาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 แบ่งได้ 2 ส่วนคือ สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งพบมากในส่วนสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งรา พบมากในส่วนสารสกัดเมทานอลจากส่วนของเส้นใย เนื่องจากสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนเดียวที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และสารสกัดเมทานอลจากส่วนของเส้นใยสามารถยับยั้ง *S. cerevisiae* และ *C. albicans* ได้ที่ความเข้มข้น 1 มก./ดิสก์

8 มม. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Soliveri และคณะ (1987) พบว่า *Streptoverticillium* sp 43/16 จากดินในสเปน ผลิตสารปฏิชีวนะ pentaene และ heptaene macrolide คือ PA-5 และ PA-7 ตามลำดับ ซึ่งพบในส่วนของเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้ง *C. albicans*, *S. cerevisiae* และ *Cladosporium cucumerinum* เป็นต้น

ตารางที่ 4.16 บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบ ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม และ 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์ 8 มิลลิเมตร

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มม.) ของจุลินทรีย์ทดสอบ							
	สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ				สารสกัดจากเส้นใย			
	MeOH		EtOAc		MeOH		EtOAc	
	1 มก	10 มก.	1 มก	10 มก.	1 มก	10 มก.	1 มก	10 มก.
<i>B. subtilis</i>	-	-	9.8	25.3	-	9.8	-	18.1
<i>S. aureus</i>	-	-	-	23.7	-	10.1	-	17.0
<i>E. coli</i>	-	-	-	20.4	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	13.4	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	10.4	13.6	16.8	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	22.7	21.1	26.0	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	*	-	*	-	-

หมายเหตุ * เกิดบริเวณยับยั้งไม่ชัดเจน - ไม่ยับยั้ง

4.11 การแยกและทำให้สารปฏิชีวนะบริสุทธิ์

4.11.1 วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.4635 กรัม มาแยกสารปฏิชีวนะ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตามวิธีข้อ 3.13.2 ผลจากวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี สามารถรวมสารได้ทั้งหมด 23 ส่วน แสดงดังตารางที่ 4.17 หลังจากนั้นนำแต่ละส่วนที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ด้วยวิธี disk diffusion ที่ความเข้มข้น 1 มก./ดิสก์ 8 มม. ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.17 การแยกสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)
F1	CHCl ₃ : MeOH 100 : 0	1 - 11	68.8
F2	100 : 0 , 98 : 2	12 - 21	515.0
F3	98 : 2	22 - 24	121.2
F4	98 : 2	25 - 29	130.5
F5	98 : 2	30 - 34	454.1
F6	98 : 2 , 95 : 5	35 - 38	341.0
F7	95 : 5	39 - 49	447.5
F8	95 : 5	50 - 61	353.2
F9	95 : 5	62 - 73	514.8
F10	93 : 7	74 - 86	291.6
F11	93 : 7	87 - 89	40.5
F12	93 : 7	90 - 103	126.5
F13	91 : 9	104 - 112	24.9
F14	91 : 9 , 90 : 10	113 - 117	56.5
F15	90 : 10	118 - 124	291.4
F16	88 : 12	125 - 128	151.7
F17	85 : 15	129	14.7
F18	85 : 15 , 75 : 25	130 - 174	152.6
F19	75 : 25 , 70 : 30	175 - 190	64.4
F20	70 : 30	191 - 199	67.0
F21	68 : 32	200 - 210	85.6
F22	50 : 50	211 - 221	65.5
F23	0 : 100	222 - 228	22.0

ตารางที่ 4.18 บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบของสารประกอบแต่ละส่วน

รหัส	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มม.) ของจุลินทรีย์ทดสอบ			
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
F1	-	21.0	-	-
F2	14.2	21.0	-	-
F3	11.7	15.9	-	-
F4	10.6	14.1	18.2	9.0
F5	9.1	14.0	-	-
F8	14.5	22.3	ND	ND
F10	9.8	13.1	-	-
F11	11.4	12.7	-	-
F12	16.0	17.1	-	-
F13	13.4	16.3	-	-

หมายเหตุ ส่วนที่ไม่เกิดการยับยั้งกับเชื้อทดสอบทุกชนิดไม่ได้แสดงผลในตาราง
ความเข้มข้น 1 มก./ ดิสก์ 8 มม. ND = ไม่ได้ทำการทดสอบ

จากการแยกสารปฏิชีวนะจากสารสกัดเอทิลเอซีเตต โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าส่วนที่ 35-38(F6) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล อัตราส่วน 98:2 และ 95:5 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวในน้ำมันสีเหลือง จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกอีกครั้งเพื่อแยกส่วนของน้ำมันออก โดยละลายในสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก กรองแยกส่วนที่เป็นผลึกออกจากน้ำมัน ได้สารบริสุทธิ์คือสาร 1 จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีต่อไป

4.11.2 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 1

สาร 1 ได้จากการตกผลึกจากส่วนที่ 35-38(F6) ดังตารางที่ 4.17 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหนัก 69 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 133–135 °C ละลายได้ดีในเมทานอล อะซีโตน ละลายได้น้อยในคลอโรฟอร์ม

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (ν_{\max}) : 3334, 2933, 1633, 1594, 1454, 808 cm^{-1} (ภาคผนวก ฉ รูปที่ 1) แสดงดังตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1

แถบการดูดกลืนแสง(ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3334	สูง	OH สันแบบยืดของหมู่ไฮดรอกซิล
2933	ต่ำ	C-H สันแบบงออย่างสมมาตรของหมู่ CH ₂
1633	สูง	C=O สันแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล
1594	ปานกลาง	N-H สันแบบงออย่างสมมาตร
1454	ปานกลาง	C=C สันแบบยืดของหมู่อะโรมาติก
808	ปานกลาง	C-H สันแบบงออย่างออกนอกระนาบของหมู่อะโรมาติก

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 (CD₃OD) (ภาคผนวก ข รูปที่ 2) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ) : 7.05 (d, J = 8 Hz, 1H, H-2', H-6'), 6.74 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-3', H-5'), 3.35 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-1), 2.71 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-2), 1.93 (s, 3H, -COCH₃) แสดงดังตารางที่ 4.20

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CD₃OD) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ค่า chemical shift (δ) : 171.83 (s, -COCH₃), 155.54 (s, C-4'), 129.83 (s, C-1'), 129.31 (s, C-2', C-6'), 114.83 (s, C-3', C-5'), 41.03 (t, C-1), 34.26 (t, C-2), 21.12 (q, -COCH₃) (ภาคผนวก ข รูปที่ 3) และจาก DEPT ¹³C NMR (CD₃OD) (ภาคผนวก ข รูปที่ 4) ทำให้ทราบว่า มีหมู่ CH₃ 1 หมู่ คือค่าที่ chemical shift (δ) 21.12 ppm มีหมู่ CH₂ 2 หมู่ คือที่ 34.26 และ 41.03 ppm มีหมู่ CH 2 หมู่ คือที่ 114.83 และ 129.39 ppm มีควอเตอร์นารีคาร์บอน 3 อะตอม คือที่ 129.83, 155.54 และ 171.83 ppm แสดงดังตารางที่ 4.20

นำสาร 1 มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อดูไอออนเชิงโมเลกุลและการแตกตัวของสารประกอบ ได้แมสสเปกตรัมดังรูป (ภาคผนวก ข รูปที่ 5) ซึ่งจะเห็นว่าพบไอออนเชิงโมเลกุลที่ m/z เท่ากับ 180[M+H]⁺(55), 121(20), 120[M - NH₂COCH₃]⁺(100), 108(10), 107[M - CH₂]⁺(37), 91(9), 78(8) และ 77[C₆H₅]⁺(22) ดังนั้นสูตรโมเลกุลคือ C₁₀H₁₃NO₂ (จากการคำนวณได้ C 67.04%, H 7.26% , N 7.82%) นำมาหาจำนวนวงและพันธะคู่ (DBE) ได้เท่ากับ 5

ข้อมูลจาก 2D-NMR (ตารางที่ 4.20) ; HMBC correlation (ภาคผนวก ข รูปที่ 6) HSQC correlation (ภาคผนวก ข รูปที่ 7) และ COSY correlation (ภาคผนวก ข รูปที่ 8) นำมาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างสาร 1

ตารางที่ 4.20 HMQC, HMBC และ COSY สเปกตรัมของสาร 1

ตำแหน่ง	$\delta^{\circ}\text{C}$	$\delta^{\circ}\text{H}$	HMBC	COSY
1'	129.83(s)	-	-	-
2'	129.31(d)	7.05 (d, $J=8$)	C-4', C-2	H-3'
3'	114.83(d)	6.74 (d, $J=8.4$)	C-4', C-1'	H-2'
4'	155.54(s)	-	-	-
5'	114.83(d)	6.74 (d, $J=8.4$)	C-4', C-1'	H-6'
6'	129.31(d)	7.05 (d, $J=8$)	C-4', C-2	H-5'
2	34.26(t)	2.71 (t, $J=7.6$)	C-1, C-6', C-2'	H-1
1	41.03(t)	3.35 (t, $J=7.6$)	-COCH ₃ , C-1', C-2	H-2
-COCH ₃	171.83(s)	-	-	-
-COCH ₃	21.12(q)	1.93 (s)	-COCH ₃ , -COCH ₃	-

จากการสืบค้นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดที่กล่าวมาพบว่า แสดงข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม เหมือนกับสาร *N*-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl-acetamide] หรือ *N*-acetyltyramine (Garcez et al., 2000) แสดงดังตารางที่ 4.21 และ 4.22 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.21 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 เปรียบเทียบกับสาร *N*-acetyltyramine

ตำแหน่งโปรตอน	ค่า chemical shift (ppm) coupling constant (Hz)	
	สาร 1	<i>N</i> -acetyltyramine
H-2', H-6'	7.05 (d, $J=8$)	7.04 (d, $J=8.4$)
H-3', H-5'	6.74 (d, $J=8.4$)	6.75 (d, $J=8.4$)
H-2	2.71(t, $J=7.6$)	2.67 (t, $J=8$)
H-2'	3.35 (t, $J=7.6$)	3.34 (t, $J=8$)
-COCH ₃	1.93 (s)	1.89 (s)

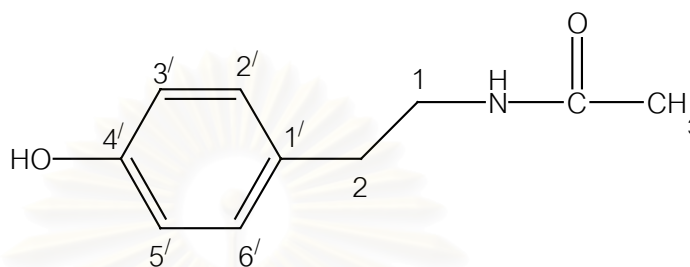
หมายเหตุ สาร 1 ใช้ตัวทำละลายคือ CD₃OD และ *N*-acetyltyramine ใช้ตัวทำละลาย acetone-d₆

ตารางที่ 4.22 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 เปรียบเทียบกับสาร *N*-acetyltyramine

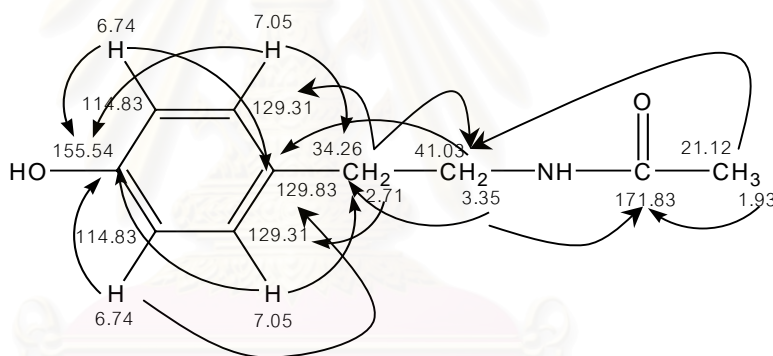
ตำแหน่งคาร์บอน	ค่า chemical shift(ppm)	
	สาร 1	<i>N</i> -acetyltyramine
1'	129.31	130.9
2'	129.83	130.2
3'	114.83	115.6
4'	155.54	154.8
5'	114.83	115.6
6'	129.83	130.2
2	34.26	34.2
1	41.03	41.2
-COCH ₃	171.83	173.3
-COCH ₃	21.12	22.2

หมายเหตุ สาร 1 ใช้ตัวทำละลายคือ CD₃OD และ *N*-acetyltyramine ใช้ตัวทำละลาย acetone-d₆

ข้อมูลจากตารางที่ 4.21 และ 4.22 ชี้ให้เห็นว่าสาร 1 คือ *N*-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl-acetamide] หรือ *N*-acetyltyramine และจากรายงานของ Marchand และคณะ (1969) พบว่า *N*-acetyltyramine มีจุดหลอมเหลว 134-135 °C ซึ่งสอดคล้องกับจุดหลอมเหลวของสาร 1 คือ 133-135 °C โครงสร้างของสาร 1 แสดงดังรูปที่ 4.16 และรูปที่ 4.17 แสดงความสัมพันธ์ของ H กับ C จากข้อมูล HMBC



รูปที่ 4.16 โครงสร้างสาร 1 หรือสาร *N*-acetyltyramine



รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ของ H กับ C จากข้อมูล HMBC ของสาร 1

นอกจากนี้ Garcez และคณะ (2000) มีรายงานว่า *N*-acetyltyramine เป็น phytoalexin ที่สะสมอยู่ในเมล็ดถั่วเหลือง (*Glycine max*, L.) ที่ต้านทานต่อโรค frog-eye leaf spot และโรค stem canker และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อรา (fungitoxic) โดยวิธี bioautography กับ *Cladosporium sphaeroperum* พบว่า *N*-Acetyltyramine มี fungitoxic activity ดังนั้นจึงนำ *N*-Acetyltyramine ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาทดสอบกับรากล่อโรคพืช 3 ชนิด คือ *Fusarium proliferatum*, *Phytophthora parasitica* และ *Pythium aphanidermatum* ด้วยวิธี agar well method (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ที่ความเข้มข้น 500, 200, 100, 50 และ 10 µg/ml โดยใช้ cycloheximide เป็นตัวควบคุมบวก และตัวควบคุมลบคือน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ซึ่งใช้เป็นตัวทำลายของ *N*-Acetyltyramine และ cycloheximide ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.23 บริเวณยับยั้งของราก่อโรคพืช 3 ชนิด

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone)(มม.) ของราก่อโรคพืช					
	N-Acetyltyamine			cycloheximide		
	F	Phy	Py	F	Phy	Py
500	-	-	12.6	20.2	>30	>30
200	-	-	-	18.6	>30	>30
100	-	-	-	15.3	>30	29.3
50	-	-	-	-	>30	26.8
10	-	-	-	-	24.2	22.7

หมายเหตุ - ไม่ยับยั้ง F = *Fusarium proliferatum*
Phy = *Phytophthora perasitica* Py = *Pythium aphanidermatum*

จากตารางที่ 4.23 พบว่า N-Acetyltyamine เกิดบริเวณยับยั้ง *P. aphanidermatum* ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/ml}$ แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชทั้ง 3 ชนิดได้น้อยกว่า cycloheximide

4.11.3 การแยกสารปฏิชีวนะจากส่วน F8

ส่วน F8 ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดเอทิลเอซีเตต (ตารางที่ 4.17) มีน้ำหนัก 353 มิลลิกรัม จากตารางที่ 4.18 เมื่อนำส่วน F8 มาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 4 ชนิด พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus* เกิดบริเวณยับยั้งกว้างกว่าทุกส่วน จึงนำส่วนนี้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตามวิธีข้อ 3.13.3 ตรวจสอบแต่ละส่วนแยกด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี สามารถรวมสารได้ทั้งหมด 15 ส่วน จากนั้นนำแต่ละส่วนมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *B. subtilis* และ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 1 มก/ดิสก์ 8 มม. ผลการทดลองดังตาราง ที่ 4.24

จากตารางที่ 4.24 ส่วน F8/8 มีน้ำหนัก 42.2 มิลลิกรัม เกิดบริเวณยับยั้งของ *B. subtilis* และ *S. aureus* เท่ากับ 20.4 มม. และ 25.7 มม. ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าทุกส่วน จึงนำส่วน F8/8 มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC (PTLC) โดยใช้แผ่น TLC silica gel 60 F₂₅₄ ชะด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 15:85 สามารถแยกสารที่มีค่า R_f ต่างกันทั้งหมด 7 ส่วน แสดงผลดัง ตารางที่ 4.25 และเมื่อนำส่วน F8/8-3 F8/8-4 และ

F8/8-5 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี PTLC พบว่าไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ ซึ่งอาจเกิดจากความไม่เสถียรของสารปฏิชีวนะ ทำให้เกิดการสลายตัวในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 4.24 การแยกสารปฏิชีวนะจากส่วน F8 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและบริเวณยับยั้งของ *B. subtilis* และ *S. aureus*

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)	บริเวณยับยั้ง <i>B.subtilis</i> (มม)	บริเวณยับยั้ง <i>S.aureus</i> (มม)
F8/1	Hexane : CHCl ₃ 50 : 50	1 - 27	8.5	-	-
F8/2	50 : 50	28 - 34	4.3	-	-
F8/3	45 : 55	35 - 38	2.5	-	-
F8/4	45 : 55	39 - 59	20.2	-	-
F8/5	40 : 60	60 - 63	5.9	-	-
F8/6	40 : 60	64 - 68	8.6	-	-
F8/8	35 : 65	77 - 87	42.2	20.4	25.7
F8/9	35 : 65, 30 : 70	88 - 103	42.0	13.2	14.8
F8/10	30 : 70	104 - 117	46.0	-	-
F8/11	25 : 75, 20 : 80	118 - 153	31.7	12.2	13.5
F8/12	20 : 80, 15 : 85	154 - 169	5.3	13.3	15.1
F8/13	15 : 85, 10 : 90	170 - 217	18.1	12.5	14.2
F8/14	0 : 100	218 - 245	29.9	11.4	13.1
F8/15	CHCl ₃ : MeOH 50 : 50	246 - 279	38.2	-	-

ตารางที่ 4.25 การแยกสารประกอบส่วน F8/8 ให้บริสุทธิ์โดย เทคนิค Preparative TLC

รหัส	R _f	น้ำหนัก(มก)
F8/8-1	0.44	2.1
F8/8-2	0.49	3.3
F8/8-3	0.51	9.9
F8/8-4	0.54	12.3
F8/8-5	0.67	3.6
F8/8-6	0.75	8.4

4.11.4 การแยกสารปฏิชีวนะจากส่วน F4

จากตารางที่ 4.18 พบว่าส่วน F4 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทุกชนิด สารประกอบในส่วนนี้มีลักษณะเป็นผลึกบาง สีขาวใส รูปเข็ม ปนอยู่กับสารคล้ายน้ำมันสีเหลือง จึงทำการตกผลึกในขั้นต้นเพื่อแยกส่วนที่เป็นน้ำมันออกไป แต่ยังไม่ได้ผลึกบริสุทธิ์มีน้ำหนัก 31.1 มิลลิกรัม จึงทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค Preparative TLC ตามวิธีข้อ 3.13.5 โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เฮกเซนและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 15 : 85 สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 9 ส่วน แสดงผลดังตารางที่ 4.26

ตารางที่ 4.26 การแยกสารประกอบส่วน F4 ให้บริสุทธิ์โดย เทคนิค Preparative TLC

รหัส	R _f	น้ำหนัก (มก)
F4/1	0	2.9
F4/2	0.07	4.6
F4/3	0.16	1.5
F4/4	0.35	6.9
F4/5	0.52	9.1
F4/6	0.53	3.1
F4/7	0.56	1.7

จากตารางที่ 4.26 จึงนำสารแต่ละส่วนมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบคือ *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ด้วยวิธี bioautography method (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) พบว่าส่วน F4/5 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด จึงนำส่วน F4/5 มาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเดิมคือ เฮกเซนและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 15 : 85 สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 3 ส่วน แสดงดังตารางที่ 4.27

ตารางที่ 4.27 การแยกสารประกอบส่วน F4/5 ให้บริสุทธิ์โดย เทคนิค Preparative TLC

รหัส	R_f	น้ำหนัก (มก)
F4/5-1	0.086	2.6
F4/5-2	0.48	2.7
F4/8-3	0.51	3.4

จากตารางที่ 4.27 ซึ่งให้เห็นว่าสารประกอบในส่วน F4/5 มีการสลายตัว เนื่องจากพบส่วน F4/5-1 ที่ค่า $R_f = 0.086$ ดังนั้นการที่ไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์จากส่วน F4/5 ได้ อาจเกิดจากความไม่เสถียรของสารปฏิชีวนะ ทำให้เกิดการสลายตัวในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

อนึ่งงานวิจัยนี้นับเป็นรายงานการศึกษาครั้งแรกของ *Streptomyces griseocarneus* ในการสร้างสาร *N* - acetyltyramine และนำสารบริสุทธิ์มาทดสอบกับราก่อโรคพืช ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการศึกษาของ *Streptomyces griseocarneus* เพื่อใช้ในการควบคุมราโรคพืชต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกแอกติโนมัยซีต ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ จัดจำแนกกลุ่มและชนิดของแอกติโนมัยซีต โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตที่คัดเลือก ผลิตและสกัดแยกสารปฏิชีวนะ และวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้น

จากการแยกแอกติโนมัยซีตจากตัวอย่างดินร้งปลวกจำนวน 15 ตัวอย่างจาก 6 จังหวัด คือ สระแก้ว ชัยนาท ตาก จันทบุรี ปัตตานี และแม่ฮ่องสอน สามารถแยกแอกติโนมัยซีตได้ 79 สายพันธุ์ เมื่อนำแอกติโนมัยซีตที่แยกได้มาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar cross streak สามารถจัดกลุ่มการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีตได้เป็น 4 กลุ่มคือ ยับยั้งราและแบคทีเรีย 34.18% ยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดียว 37.97% ยับยั้งราอย่างเดียว 6.33% และไม่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 21.52% นอกจากนี้ยังพบว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 เป็นสายพันธุ์เดียวที่สร้างสารปฏิชีวนะแบบ broad spectrum คือสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราได้ จึงนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาผลิตสารปฏิชีวนะต่อไป

ในการจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 โดยศึกษาจากส่วนประกอบของผนังเซลล์โดยวิธีโครมาโทกราฟี พบว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มีผนังเซลล์แบบที่ I คือประกอบด้วย diaminopimelic acid (DAP) ไอโซเมอร์ชนิด L นอกจากนี้ในการจัดจำแนกได้ใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ และพีเอชต่างๆ สรุปดังตารางที่ 5. 1

แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยายังไม่สามารถจำแนกถึงสปีชีส์ได้ ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดยงานวิจัยนี้ออกแบบไพรเมอร์โดยอ้างอิงข้อมูลจาก Kataoka และคณะ (1997) จากนั้นจึงส่งตัวอย่างและไพรเมอร์ไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่ Asian Natural Environmental Science Center, the University of Tokyo ประเทศญี่ปุ่น และเมื่อนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ที่บันทึกและรวบรวมไว้ใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ddbj.nig.ac.jp> พบว่า ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces griseocarneus* โดยมีความเหมือน (% identity) เท่ากับ 98% เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยากับ

Streptomyces griseocarneus NCIMB 40447 (Soliveri et al, 1987) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิและพีเอช ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา	แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1
สีของสายใยอาหาร	เหลือง-น้ำตาล
สีสปอร์	ขาว
รูปร่างสปอร์	ทรงกระบอก
ลักษณะผิวสปอร์	เรียบ
ลักษณะสายสปอร์	เส้นตรง แตกออกเป็นข้อ
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	สร้าง
การสร้างรงควัตถุ	สร้าง(สีน้ำตาล)
การรีดิวซ์ไนเตรท	+
การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	-
<u>การย่อยสลาย</u>	
อะดีนีน	-
ไทโรซีน	+
ไซแลน	+
แซนทีน	+
เคซีน	+
เจลาติน	+
แป้ง	+
<u>การเจริญที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)</u>	
4	-
10	-
37	+
45	+
การเจริญที่พีเอชเท่ากับ 4.3	+

+ : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

การผลิตสารปฏิชีวนะโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลวทั้ง 4 ชนิดคือ Nutrient broth (NB), Malt extract broth (MEB), Soluble starch broth (SSB) และ Sodium casinate broth (SCB) ในวันที่ 3 5 และ 7 แสดงดังรูปที่ 4.12, 4.13 และ 4.14 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารแข็ง

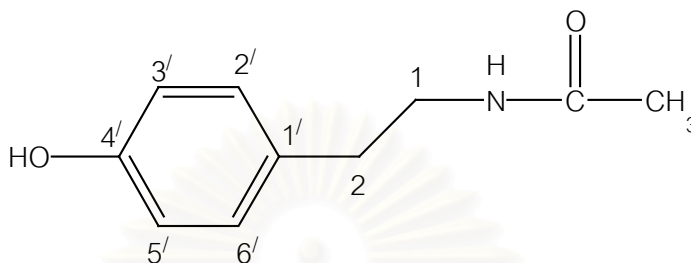
การผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ NB MEB และ SSB แต่เมื่อเลี้ยงในอาหาร SCB การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Candida albicans* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในทางการแพทย์ นั้นน้อยกว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว NB MEB และ SSB ดังนั้นเพื่อเพิ่มการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB จึงการเติมสารอาหารบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ สารสกัดจากยีสต์ เปปไทด์ และซอโยโทเนเปปโทน 1% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์ 1% ในวันที่ 7 สามารถเพิ่มการผลิตสารปฏิชีวนะมากกว่าการเติมเปปไทด์ และซอโยโทเนเปปโทนอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อศึกษาการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร SCB ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ ซอโยโทเนเปปโทน และเปปไทด์ 1% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยศึกษาจากน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหาร SCB ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 1% มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหาร SCB ที่เติมซอโยโทเนเปปโทน และเปปไทด์ รวมถึงตัวควบคุมที่ไม่มีการเติมสารอาหาร

จากการสกัดสารปฏิชีวนะจากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนของเส้นใยด้วยเมทานอล และเอทิลแอลกอฮอล์จากนั้นนำสารสกัดมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 แบ่งได้ 2 ส่วนคือสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial) ซึ่งพบมากในส่วนสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งรา (antifungal) พบมากในส่วนสารสกัดเมทานอลจากส่วนของเส้นใย เนื่องจากสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนเดียวที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งแกรมบวกและแกรมลบ และสารสกัดเมทานอลจากส่วนของเส้นใยสามารถยับยั้ง *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans* ได้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ 8 มิลลิเมตร

เนื่องจากสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิดที่ 10 มก/ดิสก์ 8 มิลลิเมตร จึงนำสารสกัดส่วนนี้มาแยกและทำให้สารปฏิชีวนะบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 ชนิดคือ สาร 1 จากนั้นนำสาร 1 ที่บริสุทธิ์มาวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

จากการสืบค้นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี แสดงข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม เหมือนกับสาร *N*-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl-acetamide] หรือ *N*-acetyltyramine (Garcez et al., 2000) โครงสร้างของสาร 1 แสดงดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 โครงสร้างสาร 1 หรือสาร *N*-acetyltyramine

เมื่อนำสาร 1 ไปทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสาร 1 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ และจากรายงานของ Garcez และคณะ(2000) พบว่า *N* - Acetyltyramine เป็น phytoalexin ที่สร้างขึ้นโดยต้นถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อโรค Frog-eye leaf spot และ Stem canker และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อรา (fungitoxic) โดยวิธี bioautography กับ *Cladosporium sphaeroperium* พบว่า *N* - Acetyltyramine มี fungitoxic activity ดังนั้นจึงนำ *N* - Acetyltyramine ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 มาทดสอบกับราก่อโรคพืช 3 ชนิดคือ *Fusarium proliferatum*, *Phytophthora parasitica* และ *Pythium aphanidermatum* พบว่าสามารถยับยั้ง *P. aphanidermatum* ได้ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชทั้ง 3 ชนิดน้อยกว่า cycloheximide

ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์โครงสร้างของสารปฏิชีวนะจะไม่สามารถทำได้ เนื่องจากความไม่เสถียรของสารปฏิชีวนะ แต่จากการทำสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและวิธีทีนเดเยอร์โครมาโทกราฟี สามารถบอกถึงส่วนที่คาดว่าจะมีสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรียได้คือส่วนที่ F4 และ F8 งานวิจัยนี้ได้บรรลุจุดประสงค์คือสามารถแยกแอกติโนมัยซีตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ จำแนกแอกติโนมัยซีตที่สร้างสารปฏิชีวนะ ผลิตและสกัดสารปฏิชีวนะ และวิเคราะห์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. แอคติโนมัยซีตที่แยกได้จากดินร้งปลวก เป็นที่น่าสนใจในการศึกษาการสร้างเอนไซม์ไคติเนส เนื่องจากจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไคติเนสได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมศัตรูหรือจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีไคติเนสเป็นองค์ประกอบในเซลล์ เช่น รากอโรคพืช ไล่เดือนฝอยซึ่งเปลือกไข่ประกอบด้วยไคติเนส
2. จุลินทรีย์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะนั้นเป็นปัญหาในด้านการแพทย์เป็นอย่างมาก จึงน่าสนใจที่นำจุลินทรีย์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะมาใช้เป็นจุลินทรีย์ทดสอบด้วยเช่น *Staphylococcus* ที่ต้านทานต่อยา methicillin รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น *Escherichia coli* 0157:H7
3. ในการผลิตสารปฏิชีวนะยังมีปัจจัยอีกหลายประการเพื่อเพิ่มปริมาณของสารปฏิชีวนะ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ การให้อากาศ ค่าความเป็นกรดต่าง เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อให้มีปริมาณมากพอในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างอีกด้วย
4. ควรทดสอบความคงตัวของสารปฏิชีวนะก่อนการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากเป็นการป้องกันการสลายตัวของสารปฏิชีวนะในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์
5. เทคนิคการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ อาจมีการใช้วิธีอื่นๆเช่น HPLC เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดและปริมาณสารปฏิชีวนะ
6. ในส่วนสารสกัดเมทานอลจากส่วนของเส้นใย จากผลการทดลองพบว่ามีสารปฏิชีวนะที่ยังปรากฏ ดังนั้นจึงควรนำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ดวงพร คันทโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. โอ.เอส. พรีนติ้งเฮ้า
กรุงเทพฯ หน้า 104-139
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ 2541 จุลชีววิทยาทั่วไป สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลง
กรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ หน้า 55-58

ภาษาอังกฤษ

- Asano, K. And Kawamoto, I. (1986) *Catellasporea*, a new genus of the Actinomycetales.
Int. J. Syst. Bacteriol 36: 512-517
- Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (1974) Bergey's Manual of Determinative
Bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Collee, J. E., Duguid, J. P., Fraser, A. G. and Marmion, B. P. (1989) Practical Medical
Microbiology. (pp 100-120) Mackie and MaCartney, UK.
- Commins, C. S. (1958) Studies on the cell wall composition and taxonomy of
Actinomycetales and related groups J. Gen. Microbiol. 18: 173-189
- Couch, J. N. (1963) Some new genera and species of the *Actinoplanaceae*. J. Elisha
Mitchell Sci. Soc. 79: 53-70
- Cross, T. (1989) Growth and examination of actinomycetes some guidelines, In: Williams,
S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds) Bergey's Manual of Systematic
Bacteriology, Vol 4 (pp. 2340-2343) The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Cross, T and Alderson, G. (1988) What weight morphology in current actinomycetes
taxonomy? In: Okami, Y., Beppu, O. T. and Ogawara, H(eds.), Biology in
Actinomycetes '88, (pp. 216-220), Japan Scientific Soc. Press, Tokyo.
- Cross, T., and Goodfellow, M. 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical
Importance. London: Academic Press.

- Cruz, R., Arias, M. S., Arias, M. E. and Soriveri, J.(1996) APHE-3 and APHE-4, two new pyrazoloisoquinolinone antibiotics produced by *Streptoverticillium griseocarneum* NCIMB 40447 J antibiot 49: 700-702
- Cruz, R., Arias, M. E. and Soriveri, J.(2000) APHE-3, a spore-associated antibiotic of *Streptomyces griseocarneus* NCIMB 40447 App Microbiol Biotechnol 53: 480-483
- David,G. H. G. (1959) The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition J Gen Microbiol 21: 612-621
- Demain, A. J. (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms Appl Microbiol Biotechnol 52: 455-463
- Edwards, D.I. (1980) Antimicrobial drug action (pp 8-18) The Macmillan Press LTD, Hong Kong.
- Embley, T. M. (1992) The family *Pseudonocardiaceae*, In: Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M. Harder, M. and Schleifer, K. H.(eds.) The Prokaryotes, (pp. 996-1027) Springer-Verlag, New York.
- Espinel-Ingroff, A., White, T., and Pfaller, M. A. (1999) Antifungal agents and susceptibility tests In: Murray, P.K., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Fredc, T. and Tenover, R.H.(Eds) Manual of Clinical Microbiology. 7 th edition (pp 1640-1652) ASM press,Washington, D.C.
- Ettliger, L., Corbaz, R. and Hutter, R. (1958) Zur Systematik der Actinomyceten.4. Eine Arteinteilung der Gattung *Streptomyces* Wakeman et Henrici. Arch Mikrobiol 31: 326-358
- Fidalgo, M., Alonso, J. L., Soliveri, J. and Arias, M. E. (1992) APHE-1 and APHE-2, two new antimicrobial and cytotoxic antibiotics J Antibiot 45: 1753-1768
- Fidalgo, M., Arias, M. S., Soliveri, J. and Arias, M. E. (1992) APHE-1 and APHE-2, two new antimicrobial and cytotoxic antibiotics J Antibiot 45: 1759-1762
- Frandsberg, E. and Schnurer, J. (1998) Antifungal activity of chitinolytic bacteria isolated from airtight stored cereal grain Can J Microbiol 44: 121-127

- Garcez, W., Martins, D., Garcez, F.R., Marques, M.R., Pereira, A.A., Oliverira, L.A., Rondon, J.N. and Peruca, A.D. (2000) Effect of spores of saprophytic fungi on phytoalexin accumulation in seeds of frog-eye leaf spot and stem canker-resistant and susceptible soybean (*Glycine max* L.) cultivars J Agric Food Chem 48:3662-3665
- Goldman, DA, Weinstein, RA., Wenzel, RP., Tablan, OC., Duma RJ., Gaynes, RP., Schlosser, J. and Martone, WJ. (1996) Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial resistant microorganisms in hospitals: a challenge to hospital leadership. JAMA 275: 234-240
- 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
- Gupt,M., Kulkarni, P. and Ganguli, B. N. (2002) Antifungal antibiotics Appl Microbiol Biotechnol 58: 46-57
- 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
- Hayakawa, M., Momose, Y., Kajiura, T., Yamazaki,T., Tamura, T., Hatani, K. and Nonomura,H (1995) A selective isolation method for *Actinomadura viridis* in soil J Ferment Bioeng 79: 287-289
- Hayakawa, M., Sadakata, T., Kajiura, T. and Nonomura, H. (1991) New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil J Ferment Bioeng 72: 320-326
- Hayakawa, M. Sadakata, T., Kajiura, T. and Nonomura, H.(1991) New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangium* and *Dactylosporangium* from soil J Fermentation Bioeng 72: 327-333
- He, J. Y., Vining, L. C., White, R. L., Horton, K. L. and Doull, J. L. (1995) Nutrient effects on growth and armentomycin production in cultures of *Streptomyces armentosus* Can J Microbiol 41: 186-193
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sheath, P. H. A., Staley, J. T., and William, S. T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. The Williams and Wilkins, U.S.A.

- Hopmann, C., Kurz, M., Bronstrup, M., Wink, J and LeBeller, D. (2002) Isolation and structure elucidation of vancoresmycin-a new antibiotic from *Amylatopsis* sp. ST 101170. Tetrahedron Lett 43:435-438
- Hynes, SH., Kjarsgaard, DM., Thomas, KC. And Ingledew, WM. (1997) Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. J Indus Micro Biotech. 18: 284-291
- Jiang, C., Xu, Y., Yung, Y. R., Guo, G. Y., Ma, J. and Liu, Y> (1991) *Actinobispora*, a new genus of the order *Actinomycetales*. Int J Syst Bacteriol 41: 526-528
- Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D. and Washington, J.A. (1999) Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods In: Murray, P.K., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, T. and Tenover, R.H.(Eds) Manual of clinical microbiology. 7 th edition (pp 1640-1652) ASM press, Washington, D.C.
- Kalakoutskii, L. V. and Agre, N. S. (1976) Comparative aspects of development and differentiation on actinomycetes. Bacteriol. Rev. 40: 469-524
- Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T., and Yoshida, T. 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. FEMS Microbiol Lett 151: 249-255.
- Kawamoto, I (1989) Genus *Micromonospora*, In: Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds) Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Vol 4 (pp. 2442-2450)The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A. (2000) Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, Norwich.
- Kong, F., Liu, D.Q., Nietsche, J., Tischler, M. and Carter, G.T. (1999) Colubricidin, a novel macrolide antibiotic from a *Streptomyces* sp. Tetrahedron Lett 40: 9219-9223
- Krasil'nikov, N. V. (1981) Ray fungi, Higher Forms, Vol 1 : Biology and Classification, Amerind, New Delhi.
- Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (1990) Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. Syst Appl Microbiol. 13: 148-160

- Kron-Wendisch, F., Kempf, A., Grund, E., Kroppenstedt, R.M. and Kutzner, H. J. (1989) Transfer of *Faenia rectevirgula* Kurup and Agre 1983 to the genus *Sacharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, elevation of *Sacharopolyspora hirsuta* supsp. *tebri* Labeda 1987 to species level, and emended description of the genus *Sacharopolyspora* Int J Syst Bacteriol. 45:67-77
- Kurtboke, D. I., Chen, C. F. and Williams, S. T. (1992) Use of polyvalent phage for reduction of streptomycetes on soil dilution plates J Appl Bact 72: 103-111
- Kutzner H. J. (1981) The family Streptomycetaceae. In: Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A and Schlegel H (Eds) The Prokaryotes: a Hand book on habitats, Isolation and identification of Bacteria (pp 2028-2090) Springer-Verlag, Berlin.
- Kron-Wendisch, F. and Kutzner, H. J. (1992) The Family *Streptomycetaceae*, In: Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M. Harder, M. and Schleifer, K. H.(eds.) The Prokaryotes, (pp. 921-995) Springer-Verlag, New York.
- 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
- Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A. (1989) Genus *Sporichthya*, In: Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.) Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Vol 4 (pp. 2507-2508) The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Lee, J. Y. and Hwang, B. K. (2002) Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea Can J Microbiol 48: 407-417
- Locci, R. and Balden, B.P. (1971) On the spore formation process in actinomycetes. I Morphology and development of *Streptoverticillium* species as examined by scanning electron microscopy. Riv Pat Veg Ser IV Suppl 7: 3-19
- Locci, R. and Schofield, G.M. (1989) Genus *Streptoverticillum* In: Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.) Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Vol 4 (pp. 2492-2504) The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Marchand, J., Pais, M., Monseur, X. and Jarreau, X. (1969) Alcaloides peptidiques-VII Les Lasiodines A ET B, Alcaloides du Lasiodiscus Marmoratus C. M. Wright (Rhamnacees) Tetrahedron. 25: 937-954

- Maruyama, H. B., Suhara, Y., Watanabe, J., Maeshima, Y., Shimizu, M., Fujimoto, H. and Takano, T. (1975) A new antibiotic, fumaramidmycin. I. Production, biological properties and characterization of producer strain. J. antibiot 28: 637-647
- McCarthy, A. J. (1989) Genus *Thermomonospora* In: Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds) Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Vol 4 (pp. 2253-2559) The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Mellouli, L., Ameer-Mehdi, R.B. Sioud, S., Shlem, M. and Bejar, S (2003) Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. Research in microbiology. 154: 345-352
- Meyer, J. (1989) Genus *Nocardiosis*, In: Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.) Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Vol 4 (pp. 2562- 2568) The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A. and Fenical, W. (2002) Widespread and persistent population of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediment Appl Environ Microbiol 68: 5005-5011
- Mingeot-leclercq, M. P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P. M. (1999) Aminoglycosides: activity and resistance Antimicrob Agents Chemother 43: 727-737
- Miyadoh, S., Amano, S., Tohyama, H. and Shomura, T. (1990) A taxonomic review of the genus *Microbispora* and a proposal to transfer two species to the genus *Actinomadura* and to combine ten species into *Microbispora rosea* J Gen Microbiol 136:1950-1913
- Mukhopadhyay, T., Franco, C.M.M., Bhat, R.G., Sawant, S.N., Ganguli, B.N. and Rupp, R.H. (1998) Grividomycins I, II, and III, new antibiotics of the streptogramin class from *Streptomyces* sp. HIL Y-8240155 Tetrahedron Lett 54: 7626-7632
- Mukhopadhyay, T., Nadkarni, S.R., Bhat, R.G., Gupte, S.V., Ganguli, B.N. petry, S. and Kogler, H. (1999) Mathemycin B, a new antifungal macrolactone from actinomycete species HIL Y- 8620959. J Nat Prod 62:889-890
- Murray, P. R. and Baron, M. A. (1999) Manual of Clinical Microbiology ASM Press, Washington, D.C.

- Nakajima, Y. (1999) Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics J Infect Chemother 5:61-74
- Ohta, E., Ohta, S., Kubota, N. K., Suzuki, M., Ogawa, T., Yamasaki, A. and Ikegami, S. (2001) Micromonosporide A, a new macrolide from *Micromonospora* sp. Tetrahedron Lett. 42: 4179-4181
- Park, D.J., Lee, S.H., Kim, C.J, and Uramoto, M. Isolation of rare actinomycetes from soil samples in specific micro-environments-natural lime cave and plant rhizosphere soil. International conference on Asian network on microbial research. Nov 29-Dec 1, 1999 Ching Mai, Thailand.
- Petrolini, B. S., Quaroni, S., Saracchi, M. and Sardi, P. (1993) A new genus of the madromycetes : *Planopolyspora* gen. Nov. Actinomycetes 4: 8-18
- Petrolini, B. S., Quaroni, S., Sardi, P., Saracchi, M. and Andriollo.(1992) A sporangiate actinomycete with unusual morphological features: *Streptosporangium claviforme* sp. nov. Actinomycetes 3: 45-50
- Pickup. K. M., Nolan, R. D. and Bushell, M. E. (1993) A method for increasing the success rate of duplication antibiotic activity in agar and liquid culture of *Streptomyces* isolates in new antibiotic screens. J. Ferment. Bioeng. 76: 89-93
- Pridham, T. G., Hesseltine, C. W. and Benedict, R.G. (1958) A guide for the classification of Streptomyces according to selected groups. Placement of strain in morphological sections. Appl. Microbiol. 6 : 51-79
- Ranmao, H., Guizhen,W. and Junying, I. (1993) A new genus of the actinomycetes, *Planotetraspora* gen. Nov. Int J Syst Bacteriol 43: 468-470
- Scholar, E. M. and Pratt, W. B. (2000) The Antimicrobial Drugs 2nd, ed. Oxford University Press, New York, N. Y.
- Schrempf, H. (2001) Recognition and degradation of chitin by Streptomyces Antonie van Leeuwenhoek 79: 285-289
- Schumacher, R. W., Harrigan, B. L. and Davidson, B. S. (2001) Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete Tetrahedron Lett 42: 5133-5135

- Shih, H.D., Liu, Y.C., Hsu, F.L., Mulabagal, V., Dodda, R. and Hauang, J.W. (2003)
Fungichomin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on
Rhizoctonia 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.
- Shomura, T., Yoshida, J., Amano, S., Kojima, M., Inouye, S. and Niida, T. (1979) Studies
on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture 1. Screening
taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces Halstedii*,
strain SF-1993 J. antibiot 32: 427-435
- Singh, M.P., Petersen, P.J., Weiss, W.J., Janso, J.E., Luckman, S.W., Lenoy, E.B.,
Bradford, P.A., Testa, R.T. and Greenstein, M. (2003) Mannopectimycins, new
cyclic glycopeptide antibiotics produced by *Streptomyces hygrosopicus* LL-
AC98;: antibacterial and mechanistic activities. Antimicrob Agent Chemother :vol
47 No 1 : 62-69
- Singh, M.P., Petersen, P.J., Weiss, W.J., Kong, F., and Greenstein, M. (2000)
Saccherosporins, Noval heptadecaglycoside antibiotics produced by
Saccharotrix: antibacterial and mechanistic activities. Antimicrob Agent Chemother .
vol 44 No 8 :2154-2159
- Soliveri, J., Arias, M. E. and Laborda, F. (1987) PA-5 and PA-7, pentaene and heptaene
macrolide antibiotics produced by a new isolate of *Streptoverticillium* from
Spanish soil Appl Microbiol Biotechnol 25:366-371
- Soliveri, J., Mendosa, A. and Arias, M. E. (1988) Effect of different nutrients on the
production of polyene antibiotics PA-5 and PA-7 by *Streptoverticillium* sp 43/16
in chemically defined media Appl Microbiol Biotechnol28: 254-257
- Strohl, WR. (1997) Industrial antibiotics : today and the future, In: Strohl WR (ed)
Biotechnology of antibiotics, 2 nd edn. pp 1-47, Marcel Dekker, New York,
- Suhara, Y., Maruyama, B. H., Kotoh, Y., Miyasaka, Y., Yokose, K., Shirai, H., Takano, K.,
Quitt, P. and Lanz, P. (1975) A new antibiotic fumaramidcin II Isolation, structure
and synthesis. J antibiot 28: 648-655
- Suzuki, S., Okuda, T. and Komatsubara, S. (2001) Selective isolation and distribution of
the genus *Planomonospora* in soil Can J Microbiol 47:253-263

- Suzuki, S., Okuda, T. and Komatsubara, S. (2000) Selective isolation and distribution of *Actinobispora* strains in soil Can J Microbiol 46: 708-715
- Suzuki, S., Okuda, T. and Komatsubara, S. (1999) Selective isolation and distribution of *Sporichthya* strains in soil Appl Environ Microb 65: 1930-1935
- Sykes, G., and Skinner, F. A. 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. Academic Press, New York.
- The Society for Actinomycetes Japan (1997) Atlas of actinomycetes, Asakura Publishing Co., Ltd. Japan.
- Vobis, G. (1984) Sporogenesis in the *Pilimelia* species, In: Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L.F. and Yakoleff, V.(eds.) Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes,(pp. 423-439) Academic Press, Orlando.
- Vobis, G. (1986) Spore development in sporangia-forming actinomycetes, In: Szabo, G., Biro, S., and Goodfellow, M. (eds.) Biological, Biochemical, and Biomedical Aspects of Actinomycetes,(pp. 443-452) Akademiai Kiado, Budapest.
- Vobis, G. (1987) Sporangiate Actinoplaneten *Actinomycetales* mit aro aquatischen Lebenszyklus. Forum Mikrobiol. 11: 416-424
- Vobis, G. and Kothe, H. W. (1985) Sporogenesis in sporangiate actinomycetes, In: Mukerji, K.G., Pathak, N. C. and Singh, V. P. (eds.) Frontiers in Applied Microbiology , Vol 1,(pp. 25-470 Print House(India), Lucknow.
- Voelker, F. and Altaba, S. (2001) Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis* Microbiology 147: 2447-2459
- Thiemann, J. E., Pagani, H. and Beretta, G.(1968) A new genus of the *Actinomycetales* : *Microtetraspora* gen nov. J Gen Microbiol 50: 295-303
- Waksman, S.A. and Henrici. *Streptomycetaceae* . In: Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Waksman, S. A. and Woodruff, H. B., 1940, Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomycetes . J Bacteriol 40: 609

- Wang, Y., Zhang,ZS., Ruan, JS., Wang, YM. And Ali, SM.(1999) Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore J Indust Microbiol Biotechnol 23 : 178-187
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., and Sackin, M. J. (1983) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. J Gen Microbiol 129: 1743-1813
- Williams, S. T., Goodfellow, M., and Alderson, G. (1989) Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 4. The Williams and Wilkins. U.S.A.
- Williams, S. T. and Sharples, G. P. (1976) *Streptosporangium corrugatum* sp. nov., an actinomycete with some unusual morphological features. Int J Syst Bacteriol 26: 45-52
- Witt, D. and Stackebrandt (1990) Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces Waksman* and *Henrici* 1943, 399^{AL} System Appl Microbiol 13:361-371
- Yang, Y. K., Morikawa, M., Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K., Nihhira, T. and Yamada, Y. (1996) Maximum virginiamycin production by optimization of cultivation conditions in batch culture with autoregulator addition Biotechnol Bioeng 49: 437-444
- Xu, L. H., Li, Q. R. and Hang, C. L.(1996) Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China Appl Environ Microbiol Vol 62 No. 1 : 244-248
- Yang, S. S., Fan, H. Y., Yang, C. K. And Lin, I. C. (2003) Microbial population of spruce soil in Tatachia mountain of Taiwan Chemosphere 52 : 1489-1498
- Zhou, Z., Miwa, M. and Hogetsu, T. (1999) Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New Phytol 144: 55-63



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. โซเดียม เคซีเนต อการ์ (Sodium caseinate agar)

โซเดียม เคซีเนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
เฟอร์ริคลอไรด์ ($FeCl_3$)	0.01	กรัม
วุ้นผง	18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.0		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

เติม cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm และเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 50 °C

2. โซเดียม เคซีเนต บรอก (Sodium caseinate broth)

โซเดียม เคซีเนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
เฟอร์ริคลอไรด์ ($FeCl_3$)	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.0		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

3. นิวเทรียนท์ อการ์ (Nutrient agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5	กรัม
วุ้นผง	18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

4. นิวเทรียนท์ บรอก (Nutrient broth)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น 1000.0 มิลลิลิตร		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

5. มอลต์ เอกซ์แทรก อการ์ (Malt extract agar)

สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	2.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	1.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	20.0	กรัม
วุ้นผง	18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

6. มอลต์ เอกซ์แทรก บรอก (Malt extract broth)

สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	2.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	1.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

7. ยีสต์ เอกซ์แทรก เดกซ์โตรส (Yeast extract dextrose medium)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

8. ISP1 ทริปโตน ยีสต์ เอกซ์แทรก อการ์ (Trypton yeast extract agar)

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

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

9. ISP 2 ยีสต์ มอลต์ เอกซ์แทรก อการ์ (Yeast malt extract agar)

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

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

10. ISP 3 โฮ้ต มีล อการ์ (Oat meal agar)

ข้าวโฮ้ต (Oat meal)	20.0	กรัม
*สารละลายเทรซ ซอลล์ (Trace salts solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มข้าวโฮ้ตในน้ำกลั่น ประมาณ 20 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงไปในการอาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เติม Trace salts solution ปรับพีเอช เท่ากับ 7.0 นั่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

* ภาคผนวก ก. หมายเลข 14

11. ISP 4 อินออร์แกนิก ซอลล์ สตาร์ช (Inorganic salts starch agar)

แป้ง (Soluble starch)	10	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	2.0	กรัม
* สารละลาย เทรซ ซอลล์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.2		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		
* ภาคผนวก ก. หมายเลข 14		

12. ISP 5 กลีเซอรอล แอสปาราจีน อการ์ (Glycerol asparagine agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แอสปาราจีน (<i>L</i> - asparagine)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
* สารละลาย เทรซ ซอลล์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว		
* ภาคผนวก ก. หมายเลข 14		

13. ISP6 เปปโตเน ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ ไอร์ออน อการ์ (Peptone yeast extract iron agar)

แบคโต เปปโตเน (Bacto peptone)	15.0	กรัม
โปรตีโอส เปปโตเน (Proteose peptone)	5.0	กรัม
เฟอริก แอมโมเนียม ซิเตรต (Ferric ammonium citrate)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
โซเดียมไฮโอซายานेट (Na_2SO_4)	0.08	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม

วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

14. สารละลายเทรซ ซอลล์ (Trace salts solution)

เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)	0.1	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด $0.45 \mu\text{m}$ และเติมลงในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

15. ไทโรซีน อการ์ (Tyrosine agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	15	กรัม
แอล-ไทโรซีน (L- tyrosine)	0.5	กรัม
แอล-แอสปาราจีน (L- asparagine)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.0	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
*สารละลาย เทรซ ซอลล์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2 – 7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

* ภาคผนวก ก. หมายเลข 14

16. ไนเตรท อการ์ (Nitrate agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
โปแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)	2.0	กรัม
วุ้นผง	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

17. โมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ (Modified Bennett's agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1.0	กรัม
กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แบคโต เคซีน (Bacto peptone)	2.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

18. เบซอล มีเดียม (Basal medium agar)

กลูโคส	10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
วุ้นผง	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

19. คาร์บอน ยูทิลไลเซชัน อการ์ (Carbon utilization agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$	2.64	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.38	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.5	กรัม
* สารละลายเทรซ ซอลต์ของ Pridham และ Gottlieb	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

* ภาควิชา ก. หมายเลข 20

20. สารละลายเทรซ ซอลต์ของ Pridham และ Gottlieb

(Pridham and Gottlieb trace salt solution)

คอปเปอร์ซัลเฟต $(\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.64	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.11	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)	0.79	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต $(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด $0.45 \mu\text{m}$ และเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ $45-50^\circ \text{C}$

21. โซลูเบิล สตาร์ช บรอท (Soluble starch broth)

แป้ง (Soluble starch)	10.0	กรัม
กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$	3.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

22. โปเตโต เดกซ์โตรส อการ์ (Potato dextrose agar)

มันฝรั่ง	200.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือด กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

23. แซบบรอกท อการ์ (Sabouraud agar)

แบคโตเปปโทน (Bactopeptone)	10	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	40.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6 ± 0.2
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

24. วอเตอร์ อการ์ (Water agar)

วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

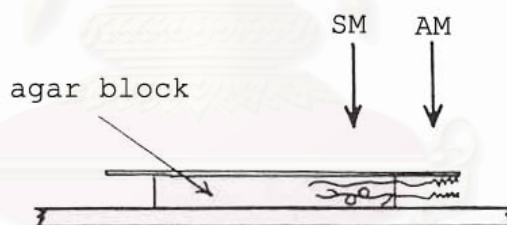
ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง

1. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดิน

ชั่งดินตัวอย่าง 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (1:1) นำไปเขย่าด้วย rotary shaker 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นนำไปวัด pH ด้วย pH meter

2. เทคนิค slide culture

ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยม (agar block) วางบนแผ่นสไลด์ฆ่าเชื้อ จากนั้นลงเชื้อบนแผ่นวุ้น วางแผ่นปิดสไลด์ฆ่าเชื้อทับด้านบน นำไปบ่มใน moist chamber สังเกตการสร้างสายใยอาหาร (SM) และสายใยอากาศ (AM) โดยการนำสไลด์ไปวางบนแท่นของกล้องจุลทรรศน์ส่องดูโดยตรง หรือ นำแผ่นปิดสไลด์มาวางบนแผ่นสไลด์ที่มีการหยดสี lacto phenol cotton blue นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์



ที่มา Holt, J. G., Krieg, N. R., Sheath, P. H. A., Staley, J. T., and William, S. T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9thed., U.S.A.: Williams &Wilkins.

3. การหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย (dry cell weight)

3.1 นำกระดาษกรอง Whatman No.1 อบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง(desicator) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

3.2 นำตัวอย่างของเส้นใยที่ได้จากการปั่นแยก มาล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วใส่กระดาษกรองที่อบไว้

3.3 นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3.4 นำออกมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

3.5 นำค่าน้ำหนักของกระดาษกรองมาหักออกผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร

4. การทดสอบโดยวิธีไบโอบีโอโตกราฟี

นำสารที่ต้องการทดสอบจุด (spot) แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 2x5 ซม. ฝังให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด นำแผ่น TLC วางบนอาหาร water agar (ภาคผนวก ก. หมายเลข 24) ในจานอาหารเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. นำอาหาร NA ที่มีจุลินทรีย์ทดสอบที่มีจำนวน 10⁸ เซลล์/ มล. เททับบนแผ่น TLC บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง ตรวจดูตำแหน่งที่มีบริเวณยับยั้งการเจริญ โดยย้อมด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue สังเกตบริเวณรอบจุดสารถ้าเกิดบริเวณยับยั้งจะไม่ติดสีย้อม หรือมีสีย้อมจางกว่าบริเวณอื่น

5. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(Scanning electron microscope , SEM)

5.1 นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาตัดเป็นชิ้นให้ได้ขนาดที่เหมาะสม นำไปแช่ในน้ำยาดองขั้นที่ 1 (primary fixation) ซึ่งประกอบด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ ของ พาราฟอร์มอลดีไฮด์ (p-formaldehyde) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่ยาดองขั้นที่ 2 (secondary fixation) ซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ของ ออสเมียมเตตระออกไซด์ (osmium tetroxide, OsO₄) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายในตู้ควัน

5.2 การขจัดน้ำออก (dehydration) โคนเทน้ำยาดองขั้นที่ 2 ออก แล้วจุ่มตัวอย่างในเอทานอล ความเข้มข้น 25 50 70 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นต่อนละ 10-20 นาทีตามลำดับ

5.3 การทำตัวอย่างให้แห้ง โดยการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โคนการใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical dryer model SAMDRI-780)

5.4 นำตัวอย่างไปติดยังแท่นทองเหลืองด้วยการติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (electroconductive adhesive)

5.5 นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Ion sputter coater , model JSC – 110

5.6 นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, รุ่น JSM – T220A)

ที่มา : ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)

6.1 นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาตัดเป็นชิ้นให้ได้ขนาดที่เหมาะสม

6.2 นำกริด (grid) ที่เคลือบด้วยฟอรัมวาร์ (formvar) หรือ คอลโลอิดียม (collodion) มาคว่ำลงไปตัวอย่าง

6.3 กดให้กริดแนบกับตัวอย่าง ขั้นตอนนี้ต้องกระทำอย่างระมัดระวัง เนื่องจากกริดบอบบาง ถ้ากดแรงเกินไปจะทำให้กริดเสียรูปทรงได้

6.4 นำกริดขึ้นมา เขย่าเล็กน้อยเพื่อให้เศษของตัวอย่างที่ไม่ต้องการหลุดออกไป

6.5 นำกริดไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, รุ่น JEM-200CX)

ที่มา : Shirling, E.B., and Gottlieb, D. 1996. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J.Syst . Bacteriol. 16:313-340



ภาคผนวก ค
ตารางผลการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 บริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว malt extract broth (MEB), Nutrient broth (NB), soluble starch broth (SSB) และ sodium caseinate broth (SCB) ในวันที่ 3 5 และ 7

เชื้อทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มม.)											
	MEB			NB			SSB			SCB		
	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	11.5	0	0	12.2	11.3	15	16.2
	0	0	0	0	0	11.3	0	0	12.4	11.4	15	16
	0	0	0	0	0	11.3	0	0	12.2	11.2	15.2	16.1
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11.2	13.1	12.5
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11.2	13.4	12.3
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11.2	13.1	12.5
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14.8	12.3	14
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14.6	12.3	14.3
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14.6	12.5	14.3
<i>C. albicans</i>	25.5	27.2	23.3	28.4	23.4	24.1	24.4	24	26.7	16.3	11.8	0
	25.4	27.6	23.3	28.9	23.4	24.3	24.6	24	26.4	16.3	12	0
	25.3	27.3	23.6	28.8	23.3	24.3	24.5	24.2	26.7	16.3	11.8	0

ตารางที่ 1 (ต่อ) บริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว malt extract broth (MEB), Nutrient broth (NB), soluble starch broth (SSB) และ sodium caseinate broth (SCB) ในวันที่ 3 5 และ 7

เชื้อทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มม.)											
	MEB			NB			SSB			SCB		
	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
<i>S. cerevisiae</i>	28.3	27.4	27.4	30.1	27.7	27.1	27.5	25.6	27.1	29.4	17.6	18.2
	28.7	27.2	27.1	29.9	27.8	26.8	27.2	25.7	27	29.6	17.6	18.7
	28.7	27.3	27.5	29.9	27.4	26.9	27.1	25.5	27.4	29.8	17.7	18.6
<i>A. niger</i>	0	0	0	13.7	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	13.6	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	13.4	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 2 บริเวณยับยั้งเชื้อเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว malt extract broth (MEB), Nutrient broth (NB), soluble starch broth (SSB) และ sodium caseinate broth (SCB) ในวันที่ 3 5 และ 7

เชื้อทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มม.)											
	MEB			NB			SSB			SCB		
	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	11.3667	0	0	12.2667	11.2	15.0667	16.1
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11.2	13.2	12.4333
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14.6667	12.3667	14.2
<i>C. albicans</i>	25.4	27.3667	23.4	28.7	23.3667	24.2333	24.5	24.0667	26.6	16.3	11.8667	0
<i>S. cerevisiae</i>	28.5667	27.3	27.3333	29.9667	27.6333	26.9333	27.2667	25.6	27.1667	29.6	17.6333	18.5
<i>A. niger</i>	0	0	0	13.5667	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 3 บริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในนมชืดสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว SCB ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และชอยโทนเปปโทน

เชื้อทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มม.)											
	control			สารสกัดจากยีสต์			เปปโทน			ชอยโทนเปปโทน		
	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
<i>B. subtilis</i>	11.3	15	16.2	13.4	18.9	19.4	11.2	11.6	13.5	12.2	13.4	19.6
	11.1	15	16	13.2	19	19.2	11.2	11.2	13.4	12.3	13.7	19.5
	11.2	15.2	16.1	13.3	18.8	19.5	11.2	11.2	13.5	12.5	13.5	19.4
<i>S. aureus</i>	11.4	13.5	14.8	13.1	14.6	15.4	0	0	0	0	0	0
	11.5	13.4	14.7	13.1	14.2	15.6	0	0	0	0	0	0
	11.4	13.6	14.5	13.1	14.2	15.4	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	14.8	12.3	13.8	16.2	14.7	15.7	0	0	0	0	0	0
	14.6	12.3	13.7	16.1	14.7	15.6	0	0	0	0	0	0
	14.6	12.5	13.7	16.1	14.7	15.7	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	16.3	11.8	0	19.8	18.3	24.1	24.6	21.6	20.5	20.2	19.5	19.4
	16.6	12	0	20	18.2	24.3	24.3	21.7	20.2	20.5	19.6	19.6
	16.7	11.8	0	20.1	18.5	24.3	24.8	21.6	20.1	20.7	19.2	19.5

ตารางที่ 3 (ต่อ)บริเวณยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว SCB ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และชอยโทนเปปโทน

เชื้อทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มม.)											
	control			สารสกัดจากยีสต์			เปปโทน			ชอยโทนเปปโทน		
	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
<i>S. cerevisiae</i>	25.4	17.6	18.5	25.4	23.4	25.1	25.5	22.6	22.7	25.5	22.4	22.1
	25.6	17.6	18.7	25.6	23.4	24.8	25.7	22.5	22.7	25.6	22.4	22.1
	25.8	17.7	18.6	25.6	23.5	24.8	25.7	22.5	22.4	25.7	22.4	22
<i>A. niger</i>	0	0	0	13.7	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	13.6	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	13.4	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 4 บริเวณยับยั้งเฉลี่ยเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในอาหารเหลว SCB ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และชอยโทนเปปโทน

เชื้อทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มม.)											
	control			สารสกัดจากยีสต์			เปปโทน			ชอยโทนเปปโทน		
	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
<i>B. subtilis</i>	11.2	15.0667	16.1	13.3	18.9	19.3667	11.2	11.3333	13.4667	12.3333	13.5333	19.5
<i>S. aureus</i>	11.4333	13.5	14.6667	13.1	14.3333	15.46667	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	14.6667	12.3667	13.7333	16.1333	14.7	15.6667	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	16.5333	11.8667	0	19.9667	18.3333	24.5667	24.5667	21.6333	20.2667	20.4667	19.4333	19.5
<i>S. cerevisiae</i>	25.6	17.6333	18.6	25.5333	23.4333	24.9	25.6333	22.5333	22.6	25.6	22.4	22.0667
<i>A. niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 5 น้ำหนักเซลล์แห้งของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในวันที่ 3, 5 และ 7 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว SCB ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน และซอโยโทนเปปโทน และ control คือไม่มีการเติมสารอาหาร

	น้ำหนักเส้นใยแห้ง(กรัม/ ลิตร)			
	control	สารสกัดจากยีสต์	เปปโทน	ซอโยโทนเปปโทน
วันที่ 3	0.53	2.88	1.67	2.77
	0.50	2.82	1.58	2.70
	0.48	2.86	1.61	2.73
เฉลี่ย	0.50	2.85	1.62	2.73
วันที่ 5	0.78	3.04	2.18	2.48
	0.66	3.12	2.06	2.52
	0.71	3.05	2.04	2.52
เฉลี่ย	0.72	3.07	2.09	2.51
วันที่ 7	0.71	3.12	2.31	2.57
	0.79	3.12	2.37	2.51
	0.74	3.11	2.38	2.52
เฉลี่ย	0.74	3.11	2.36	2.53

ภาคผนวก ง
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของบริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในวันที่ 3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อโซเดียมเคซิเนต (SCB) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน ซอยโทนเปปโทน 1% โดยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และในอาหาร SCB ที่ไม่เติมสารอาหาร

ANOVA

จุลินทรีย์ทดสอบ		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>B. subtilis</i>	Between Groups	9.243	3	3.081	284.385	.000
	Within Groups	8.667E-02	8	1.083E-02		
	Total	9.329	11			
<i>S. aureus</i>	Between Groups	455.580	3	151.860	182232.000	.000
	Within Groups	6.667E-03	8	8.333E-04		
	Total	455.587	11			
<i>E. coli</i>	Between Groups	714.707	3	238.236	57176.533	.000
	Within Groups	3.333E-02	8	4.167E-03		
	Total	714.740	11			
<i>C. albican</i>	Between Groups	97.510	3	32.503	672.483	.000
	Within Groups	.387	8	4.833E-02		
	Total	97.897	11			
<i>S. cerevisiae</i>	Between Groups	1.583E-02	3	5.278E-03	.275	.842
	Within Groups	.153	8	1.917E-02		
	Total	.169	11			

B. subtilis

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Control	3	11.2000		
Peptone	3	11.2000		
Soy	3		12.3333	
Yeast	3			13.3000
Sig.		1.0000	1.0000	1.0000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

S. aureus

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Soy	3	.0000		
Peptone	3	.0000		
Control	3		11.4333	
Yeast	3			13.1000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

E. coli

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Peptone	3	.0000		
Soy	3	.0000		
Control	3		14.6667	
Yeast	3			16.1333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C. albicans

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Control	3	16.5333			
Yeast	3		19.9667		
Soy	3			20.4667	
Peptone	3				24.5667
Sig.		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

S. cerevisiae

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05
		1
Yeast	3	25.5333
Control	3	25.6000
Soy	3	25.6000
peptone	3	25.6333
Sig.		.428

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หมายเหตุ	control	= อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่ไม่เติมสารอาหาร
	yeast	= อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่เติมสารสกัดจากยีสต์
	peptone	= อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่เติมเปปไทน์
	soy	= อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่เติมซอโยโทนเปปไทน์

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของบริเวณยับยั้งของ จุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในวันที่ 5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซีเดียมเคซีเนต(SCB) ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปไทน์ ซอโยโทนเปปไทน์ 1% โดยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และในอาหาร SCB ที่ไม่เติมสารอาหาร

ANOVA

จุลินทรีย์ทดสอบ		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>B. subtilis</i>	Between Groups	91.409	3	30.470	1218.789	0.000
	Within Groups	0.200	8	2.50E-02		
	Total	91.609	11			
<i>S. aureus</i>	Between Groups	582.063	3	194.021	12253.947	0.000
	Within Groups	0.127	8	1.58E-02		
	Total	582.189	11			
<i>E. coli</i>	Between Groups	557.620	3	185.873	55762.000	0.000
	Within Groups	0.027	8	3.33E-03		
	Total	557.647	11			
<i>C. albicans</i>	Between Groups	158.550	3	52.85	2536.800	0.000
	Within Groups	0.167	8	2.08E-02		
	Total	158.717	11			
<i>S. cerevisiae</i>	Between Groups	61.700	3	20.567	8226.667	0.000
	Within Groups	0.020	8	2.50E-03		
	Total	61.720	11			

B. subtilis

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Peptone	3	11.3333			
Soy	3		13.5333		
Control	3			15.0667	
Yeast	3				18.9000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

S. aureus

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Peptone	3	.0000		
Soy	3	.0000		
Control	3		13.5000	
yeast	3			14.3333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

E. coli

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
peptone	3	0		
soy	3	0		
control	3		12.3667	
yeast	3			14.7000
Sig.		1.0000	1.0000	1.0000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C. albicans

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Control	3	11.8667			
Yeast	3		18.3333		
Soy	3			19.4333	
peptone	3				21.6333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

S. aureus

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Control	3	17.6333			
Soy	3		22.4000		
Peptone	3			22.5333	
yeast	3				23.4333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หมายเหตุ

control = อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่ไม่เติมสารอาหาร

yeast = อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่เติมสารสกัดจากยีสต์

peptone = อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่เติมเปปโตน

soy = อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่เติมซอโยโทนเปปโตน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของบริเวณยับยั้งของ จุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 ในวันที่ 7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อโซเดียมเคซิเนต(SCB) ที่ มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เปปโทน ซอยโทนเปปโทน 1% โดยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และในอาหาร SCB ที่ไม่ เติมสารอาหาร

ANOVA

จุลินทรีย์ทดสอบ		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>B. subtilis</i>	Between Groups	75.296	3	25.099	2151.310	.000
	Within Groups	9.333E-02	8	1.167E-02		
	Total	75.389	11			
<i>S. aureus</i>	Between Groups	681.973	3	227.324	24799.030	.000
	Within Groups	7.333E-02	8	9.167E-03		
	Total	682.047	11			
<i>E. coli</i>	Between Groups	653.877	3	217.959	130775.333	.000
	Within Groups	1.333E-02	8	1.667E-03		
	Total	653.890	11			
<i>C. albican</i>	Between Groups	1062.727	3	354.242	21254.533	.000
	Within Groups	.133	8	1.667E-02		
	Total	1062.860	11			
<i>S. cerevisiae</i>	Between Groups	60.983	3	20.328	1108.773	.000
	Within Groups	.147	8	1.833E-02		
	Total	61.129	11			

B. subtilis

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Peptone	3	13.4667		
Control	3		16.1000	
Yeast	3			19.3667
Soy	3			19.5000
Sig.		1.0000	1.0000	0.1690

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

S. aureus

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Peptone	3	.0000		
Soy	3	.0000		
Control	3		14.6667	
yeast	3			15.4667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

E. coli

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Peptone	3	.0000		
Soy	3	.0000		
Control	3		13.7333	
yeast	3			15.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

C. albicans

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Control	3	0			
Soy	3		19.5000		
Peptone	3			20.2667	
yeast	3				24.2333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

S. cerevisiae

Duncan

อาหารเลี้ยงเชื้อ	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Control	3	18.6			
Soy	3		22.0667		
Peptone	3			22.6	
Yeast	3				24.9
Sig.		1	1	1	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หมายเหตุ

control = อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่ไม่เติมสารอาหาร

yeast = อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่เติมสารสกัดจากยีสต์

peptone = อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่เติมเปปโตน

soy = อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ที่เติมซอโยโตนเปปโตน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ
ลำดับเบส 16S rRNA

ลำดับเบส 16 S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 9.1 เทียบกับลำดับเบส 16 S rRNA ของ *Streptomyces griseocarneus* โดยมีความเหมือน(% identity) เท่ากับ 98%

[X99943](#) | X99943.1 *S.griseocarneum* 16S rRNA gene.
Length = 1515

Score = 916 bits (462), Expect = 0.0
Identities = 489/494 (98%), Gaps = 3/494 (0%)
Strand = Plus / Minus

```

Query:1   gcggtgctggcacgtagttagccggcgcttcttctgcaggtaccgtcactttcgcttct 60
          |||
Sbjct:493 gcggtgctggcacgtagttagccggcgcttcttctgcaggtaccgtcacttctcgcttct 434

Query:61   tccctgctgaaagaggtttacaacccgaag-ccgatcatccctcacgcgcgctcgctgcat 119
          |||
Sbjct:433 tccctgctgaaagaggtttacaacccgaagccgatcatccctcatgcgcgctcgctgcat 374

Query:120  caggctttcgccattgtgcaatattccccactgctgcctcccgtag-agtctgggcccgt 178
          |||
Sbjct:373 caggctttcgccattgtgcaatattccccactgctgcctcccgtaggagtctgggcccgt 314

Query:179  gtctcagtcaccagtggtggccggctcgccctctcaggccggctaccgctcgtcgccctggta 238
          |||
Sbjct:313 gtctcagtcaccagtggtggccggctcgccctctcaggccggctaccgctcgtcgccctggta 254

Query:239  ggccatcacccaccaacaagctgatagggcggggctcatccttgcaccgccggagctt 298
          |||
Sbjct:253 ggccatcacccaccaacaagctgatagggcggggctcatcct-gcaccgccggagctt 195

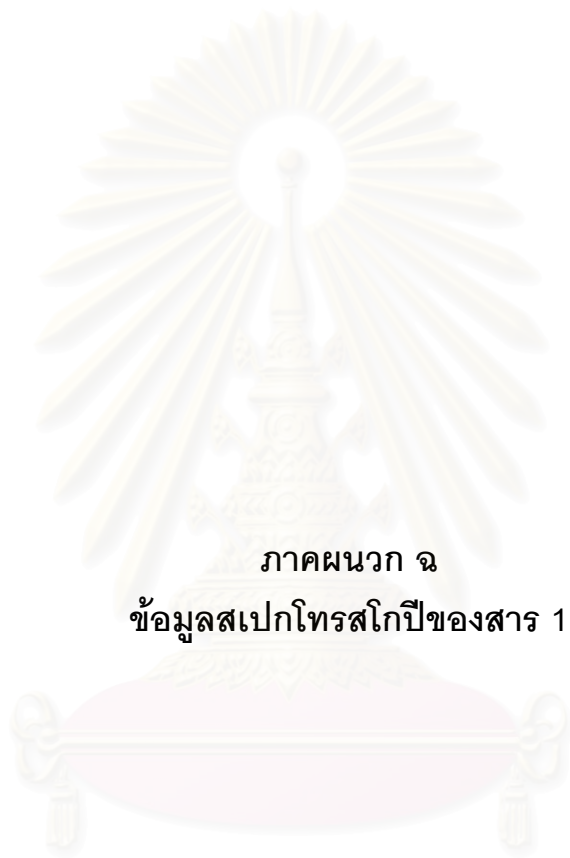
Query:299  tccaccaccaacatgcggtcagcggtcgtatccggtattagaccccgtttccagggtt 358
          |||
Sbjct:194 tccaccaccaacatgcggtcagcggtcgtatccggtattagaccccgtttccagggtt 135

Query:359  gtcccagagtgcagggcagattgccacgtgttactcaccggttcgccactaatccacc 418
          |||
Sbjct:134 gtcccagagtgcagggcagattgccacgtgttactcaccggttcgccactaatccacc 75

Query:419  cgaagggttcatcgttcgacttgcattgttaagcacgcccgccagcgttcgtcctgagc 478
          |||
Sbjct:74   cgaagggttcatcgttcgacttgcattgttaagcacgcccgccagcgttcgtcctgagc 15

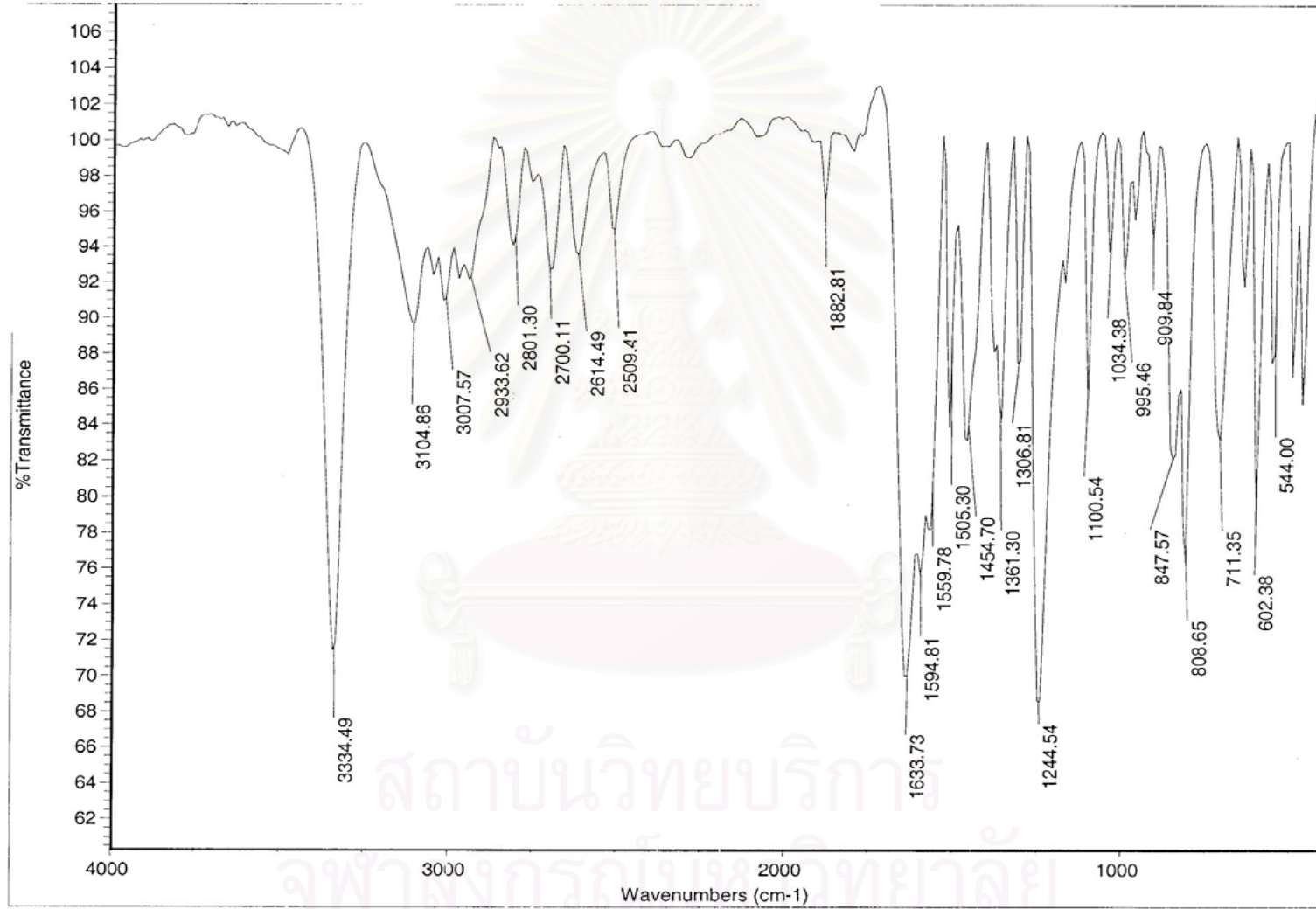
Query:479  caggatcaaactct 492
          |||
Sbjct:14   caggatcaaactct 1

```

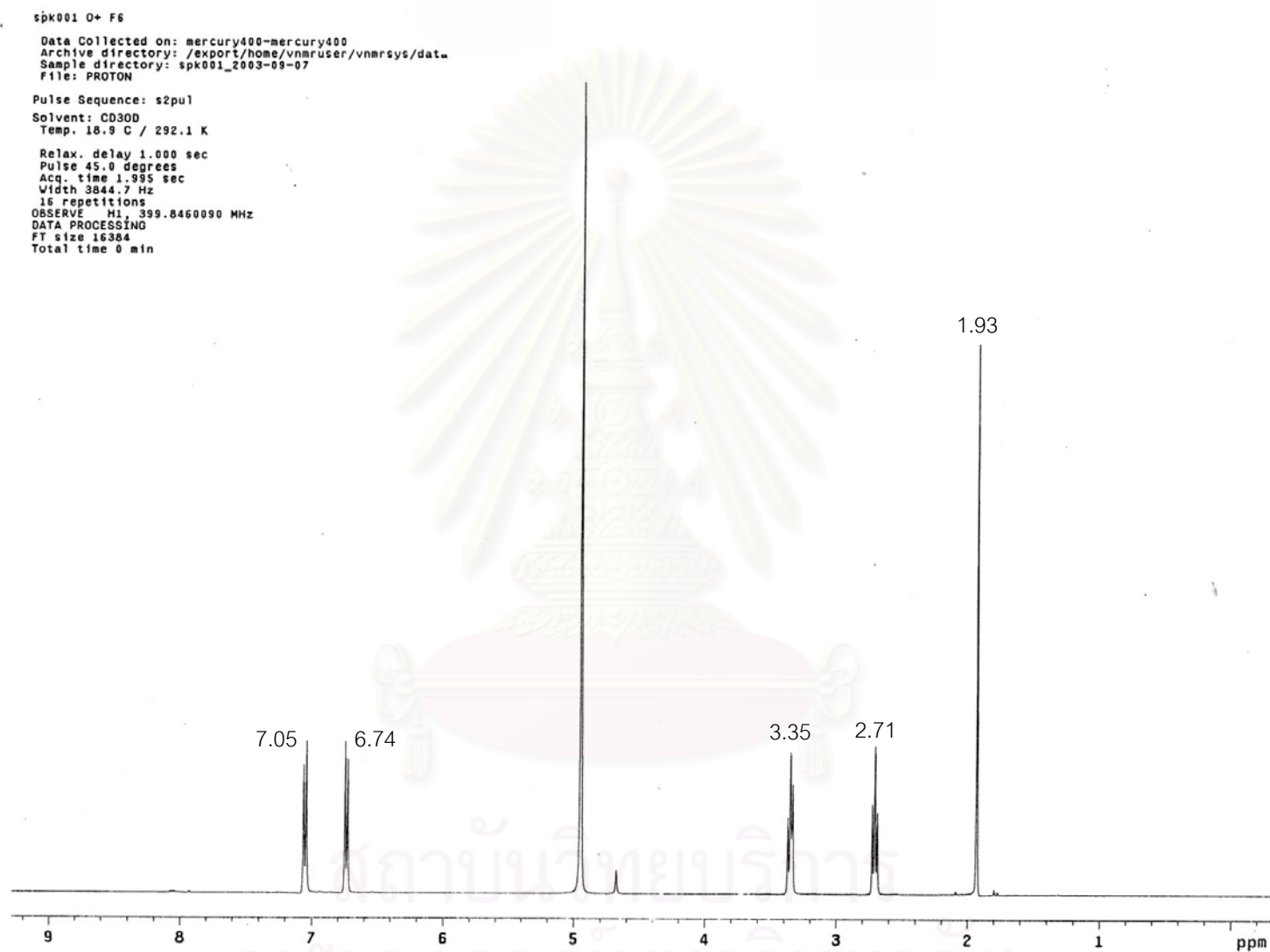



ภาคผนวก ฉ
ข้อมูลสเปกโทรสโกปีของสาร 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1

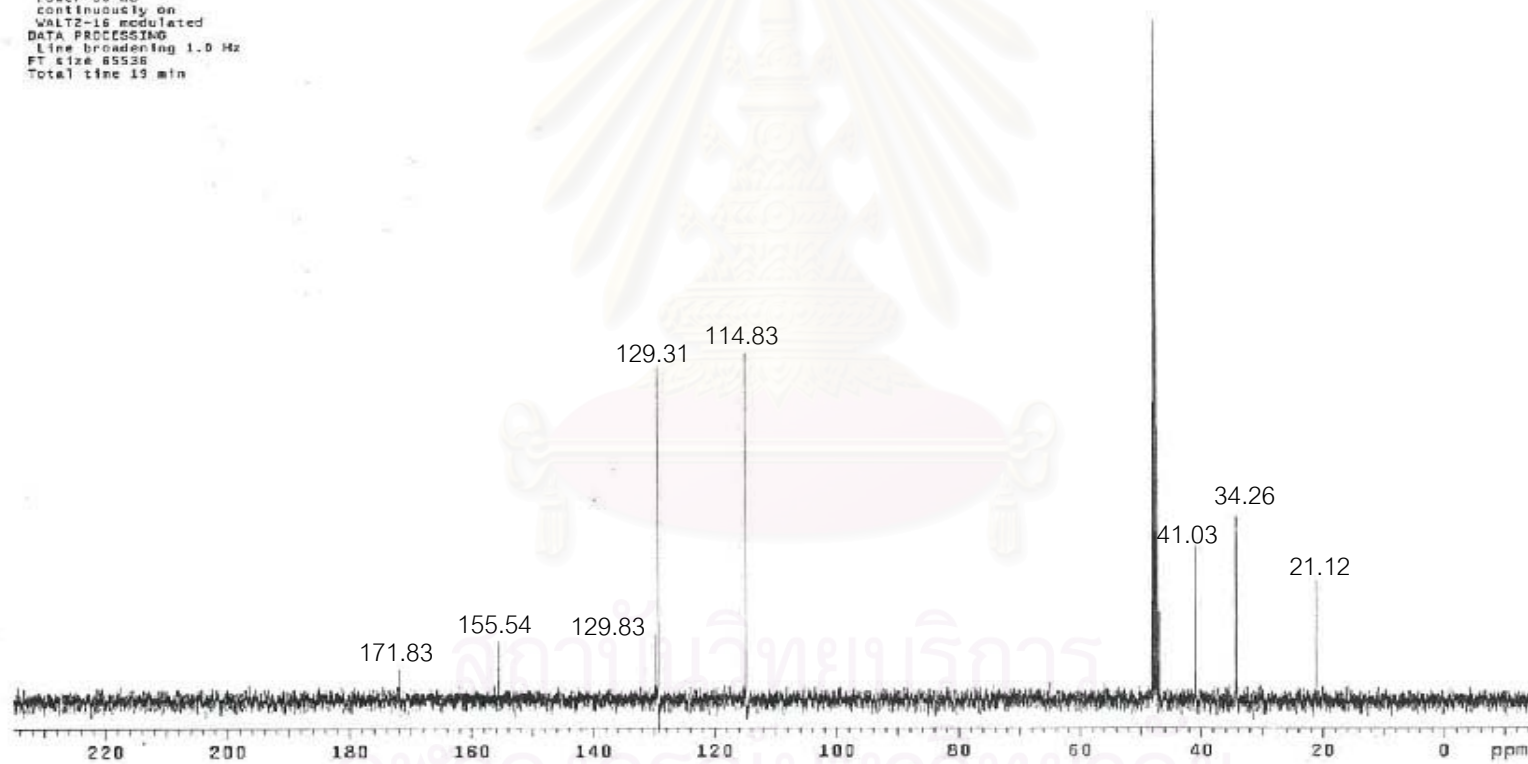


รูปที่ 2 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1

Data Collected on: mercury400-mercury400
Archive directory: /export/home/vmarucar/vnmrsys/data
Sample directory: spk002_2003-07-26
File: CARBON

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CD3OD
Temp: 21.4 C / 294.6 K

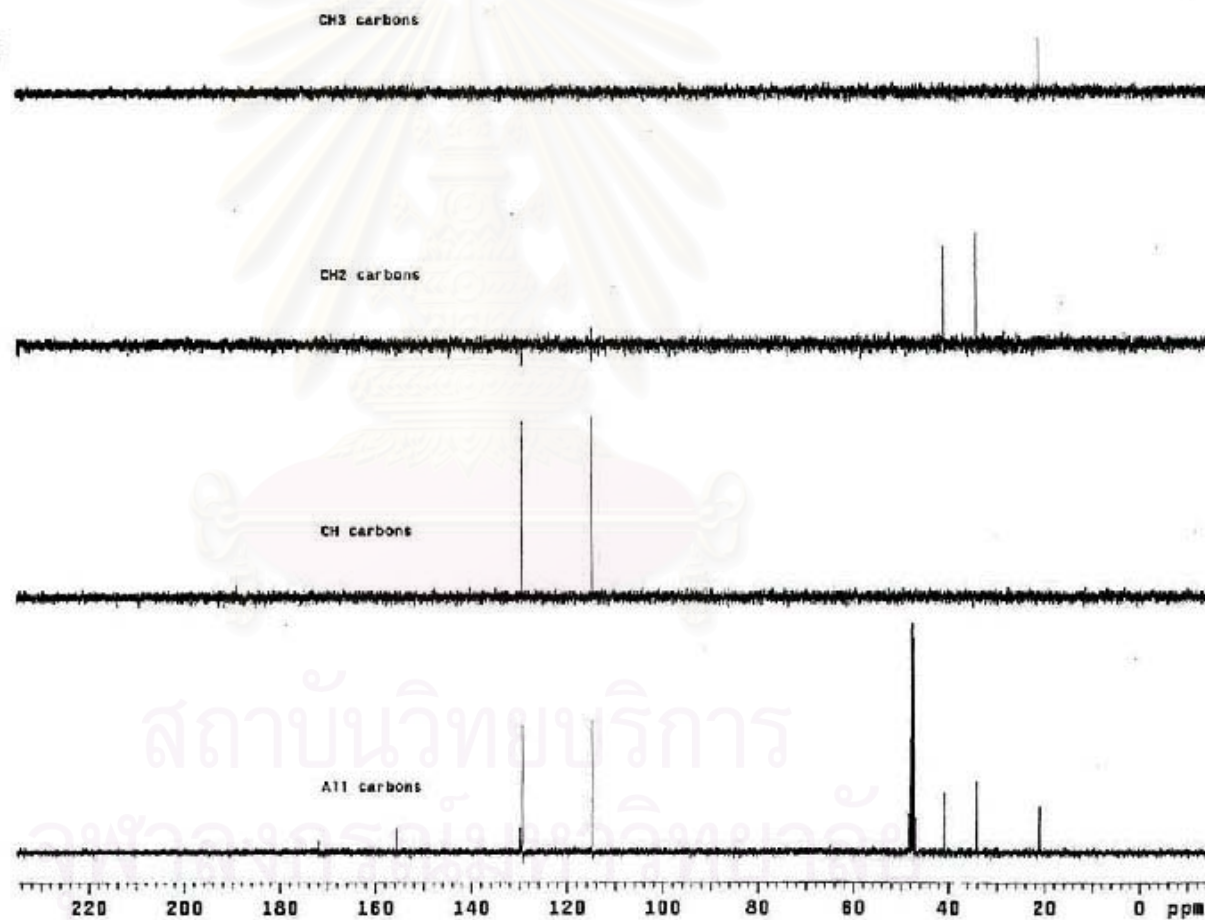
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.155 sec
Width 25125.6 Hz
256 repetitions
OBSERVE C13, 100.6213589 MHz
DECOUPLE H1, 355.0475090 MHz
Power 30 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 19 min



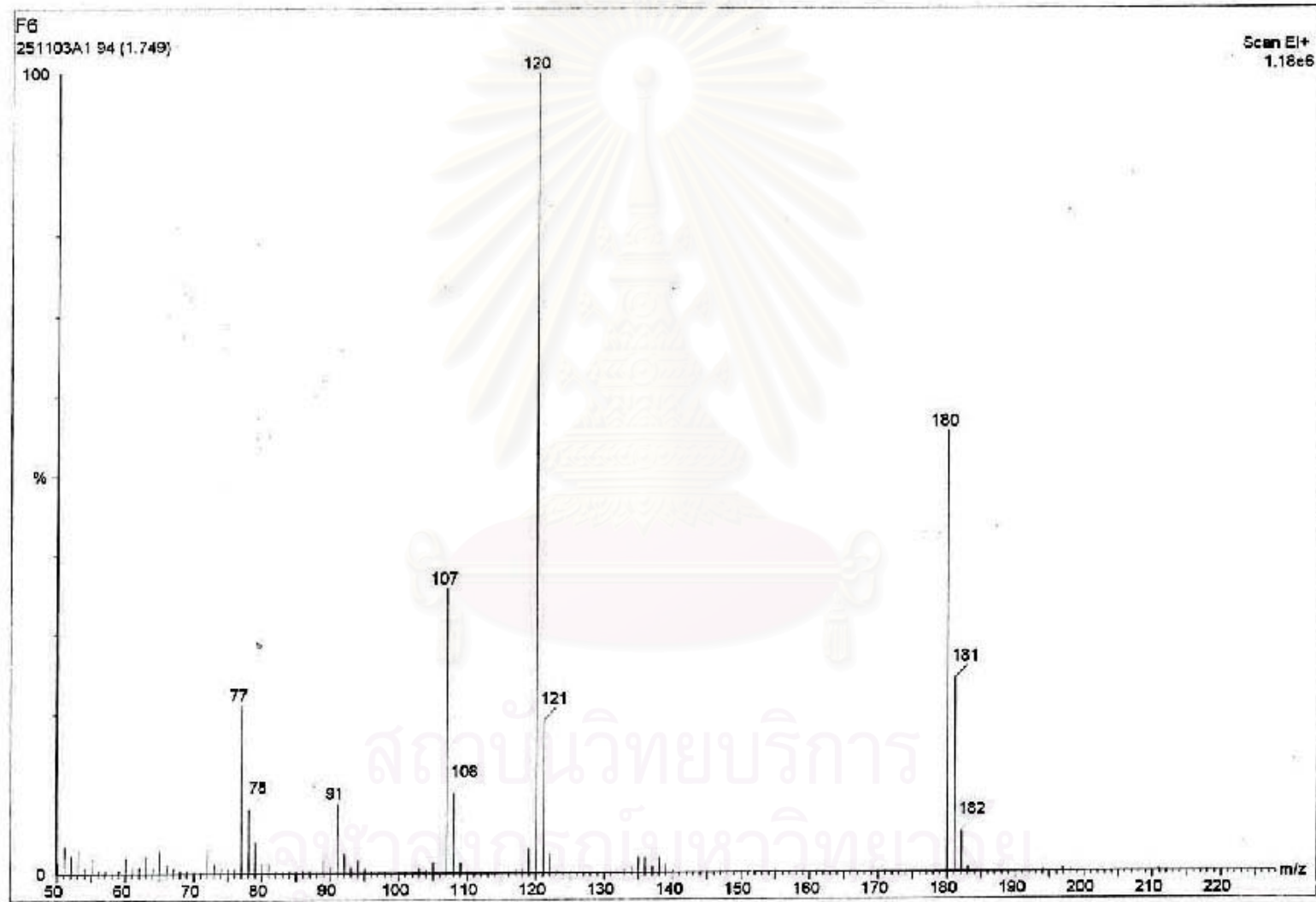
Data Collected on: mercury400-mercury400
 Archive directory: /export/home/vnmruser/vnmrsys/data
 Sample directory: spx002_2003-07-26
 File: DEPT

Pulse Sequence: DEPT
 Solvent: CD300
 Temp. 18.8 C / 293.1 K

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.199 sec
 Width 25125.0 Hz
 64 repetitions
 OBSERVE C13, 100.6413589 MHz
 DECOUPLE H1, 399.8479890 MHz
 POWER 30 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 11 min

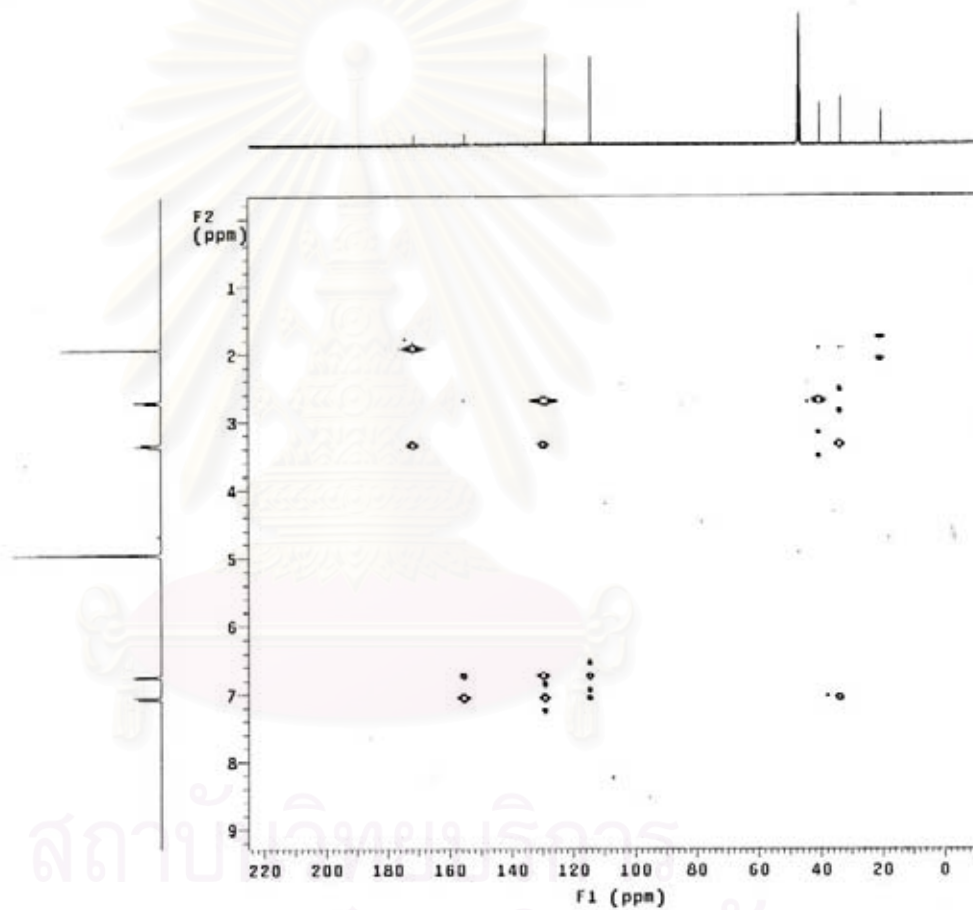


รูปที่ 4 DEPT ¹³C เติ้นเอ็มอาร์สเปกตร้าของสาร 1



รูปที่ 5 แมสสเปกตรัมของสาร 1

spk001 0* F6
Data Collected on: mercury400-mercury400
Archive directory: /export/home/vnmruser/vnmrsys/data
Sample directory: spk001_2003-05-07
File: gHMBC
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: CD3OD
Temp. 19.1 C / 292.2 K
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 2.152 sec
Width 3844.7 Hz
2D Width 24154.6 Hz
8 repetitions
600 increments
OBSERVE H1 399.846000 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.067 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
F1 size 1024 x 2048
Total time 1 hr, 10 min



รูปที่ 6 gHMBC สเปกตรัมของสาร 1

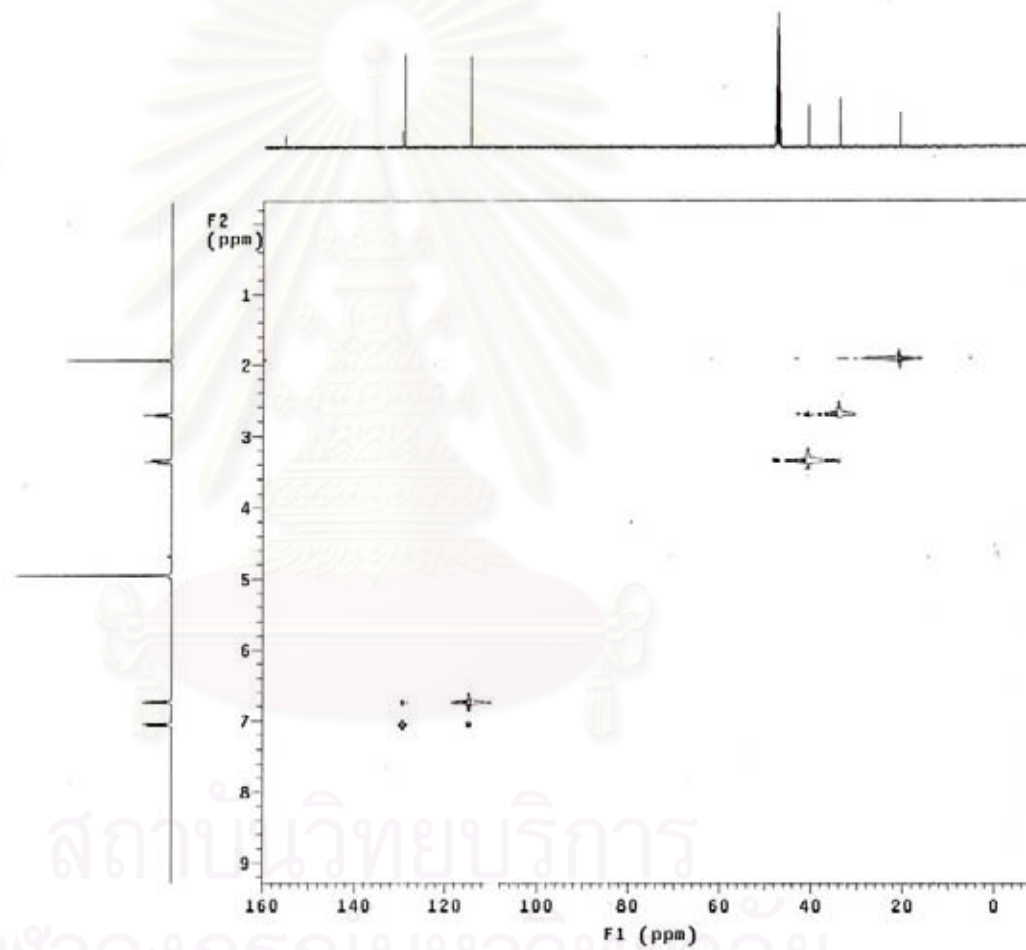
```

spk001 D+ F6
Data Collected on: mercury400-mercury400
Archive directory: /export/home/vnmruser/vnmrsys/data
Sample directory: spk001_2003-09-07
File: gHSQC

Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: CD3OD
Temp: 20.0 C / 293.1 K

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 3044.7 Hz
2D Width 17284.0 Hz
4 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 399.8460090 MHz
DECOUPLE C13, 100.5488995 MHz
Power 53 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.062 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.014 sec
F1 size 1024 x 2048
Total time 23 min

```



รูปที่ 7 gHSQC สเปกตรัมของสาร 1

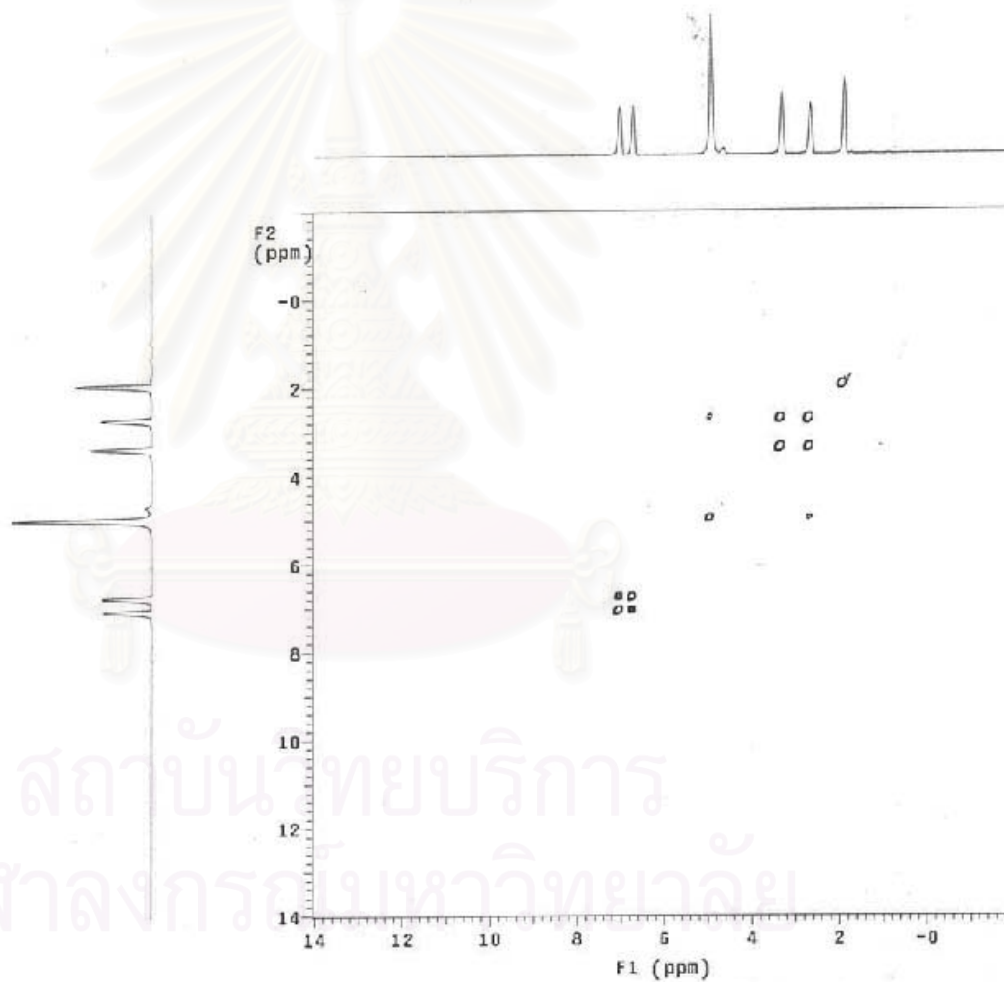
D+ F6

Data Collected on: mercury400-mercury400
 Archive directory: /export/home/vnmruser/vnmrsys/data
 Sample directory: ta036_2003-11-20
 File: gCOSY

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: CD3OD
 Temp: 19.5 C / 292.6 K

Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.150 sec
 Width 6410.3 Hz
 2D Width 6410.3 Hz
 Single scan
 128 increments
 OBSERVE F1: 399.8160000 MHz
 DATA PROCESSING
 Sg. sine bell 0.075 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sg. sine bell 0.020 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 3 min



รูปที่ 8 gCOSY สเปกตรัมของสาร 1

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวยุวดี มหาศักดิ์ศิริ เกิดวันที่ 21 กรกฎาคม 2519 ที่จังหวัดสระแก้ว สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย