การแยกและลักษณะสมบัติของแอกติโนมัยซีทีสที่สร้างสารปฏิชีวนะและสารต้านมะเร็งจากดินในจังหวัดน่าน

นายวรปรัชญ์ ศรีสุขคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC- AND ANTICANCER-PRODUCING ACTINOMYCETES FROM SOIL IN NAN PROVINCE

Mr. Worrapratt Srisukkham

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

501579

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกและลักษณะสมบัติของแอกติโนมัยซีทีสที่สร้างสารปฏิชีวนะและสารต้านมะเร็งจากดินในจังหวัดน่าน
โดย	นายวรปรัชญ์ ศรีสุขคำ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

วรปรัชญ์ ศรีสุขคำ : การแยกและลักษณะสมบัติของแอกติโนมัยซีทีสที่สร้างสารปฏิชีวนะและสารต้านมะเร็งจากดินในจังหวัดน่าน. (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC- AND ANTICANCER-PRODUCING ACTINOMYCETES FROM SOIL IN NAN PROVINCE) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว, 153 หน้า.

แยกแอกติโนมัยซีทีสได้ 61 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดินจำนวน 15 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บจากพื้นที่ใน 7 อำเภอที่จังหวัดน่าน การทดสอบเพื่อหาสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่มีขอบเขตการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบกว้างที่สุด พบว่าแอกติโนมัยซีทีสจำนวน 75.41 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยสายพันธุ์ Nan 6.2 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินจากโรงเรียนแม่จริมในอำเภอแม่จริม สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์การยับยั้งขอบเขตกว้างที่สุด โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Candida albicans* ATCC 10231 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 5169 และ *Aspergillus niger* ATCC 6275 โดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Soluble starch broth (SSB) เป็นเวลาอย่างน้อย 10 วัน และเมื่อนำมาสกัดด้วยเมททานอล สามารถให้ผลการยับยั้งสูงที่สุด จากการศึกษาเพิ่มเติมพบอีกว่า แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์นี้ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราโรคพืชอีก 6 ชนิด ได้แก่ *Alternaria porri* DOAC 1756 *Collectotrichum capsici* DOAC 1196 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DOAC 0874 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* DOAC 0893 *Pythium aphanidermatum* DOAC 1662 และ *Phytophthora parasitica* DOAC 0005 ซึ่งความสามารถในการสร้างสารยับยั้งทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในคนและจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชได้นี้ ทำให้สายพันธุ์ Nan 6.2 มีความน่าสนใจเพราะไม่เพียงมีประโยชน์ในทางการแพทย์เท่านั้นแต่ยังมีประโยชน์ในทางเกษตรกรรมอีกด้วย

จากการทดสอบเพื่อหาสายพันธุ์ที่สร้างสารต้านเซลล์มะเร็งพบว่า มีแอกติโนมัยซีทีสจำนวน 21.31 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในระดับสูง โดยสายพันธุ์ Nan 2.4 ซึ่งแยกได้จากดินในเขตป่าชุมชน อำเภอสันติสุข สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดและจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว Jurkat ATCCno.CRL-2063 โดยออกฤทธิ์ยับยั้งทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 12.77 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสได้ 72.29 เปอร์เซ็นต์

จากข้อมูลในการจัดจำแนกต่าง ๆ และการศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์พบว่า ลำดับเบสยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 คล้ายกับของ *Streptomyces olivogriseus* ที่ระดับความเหมือนเท่ากับ 99เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลำดับเบสยีน 16S rRNA คล้ายกับของ *Streptomyces platensis* มากที่สุดโดยมีระดับความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772450323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ACTINOMYCETES / ANTICANCER / ANTIMICROBIAL

WORRAPRATT SRISUKKHAM: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC- AND ANTICANCER-PRODUCING ACTINOMYCETES FROM SOIL IN NAN PROVINCE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SRIHANON, Ph.D., THESIS COADVISER: ASST. PROF. JITTRA PIAPUKIEW, 153 pp.

Sixty one isolates of actinomycetes were isolated from 15 soil samples from NAN province and tested for their antimicrobial activities. The results showed that 75.41% of the actinomycetes isolates exhibited antimicrobial activities. The Nan 6.2 strain, isolated from soil in Maecharim district, showed inhibitory activity against all the tested microorganisms, *i.e. Bacillus cereus* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 5169 and *Aspergillus niger* ATCC 6275. The methanol extracts of soluble starch culture broth of Nan 6.2 strain incubated for 10 days showed the highest antimicrobial activities. Moreover, this strain also inhibited 6 plant pathogenic fungi, *i.e. Alternaria porri* DOAC 1756, *Collectotrichum capsici* DOAC 1196, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* DOAC 0874, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* DOAC 0893, *Pythium aphanidermatum* DOAC 1662 and *Phytophthora parasitica* DOAC 0005. This promising strain not only has potential use for medical purposes but also has a potential in agricultural application.

Twenty one percent of actinomycetes isolates showed high levels of anticancer activities. The strain with highest activity was Nan 2.4, from forest soil in Santisuk District, which showed specific inhibitory activity against Jurkat-human acute T cell leukemia cell line. Upon treatment, cell viability of 12.77% with apoptotic nuclei of 72.29% were detected.

Analysis of the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene of the Nan 2.4 and Nan 6.2 strains showed high similarity (99%) with *Streptomyces olivogriseus* and *Streptomyces platensis*, respectively.

Department :.....Microbiology.....Student's signature :Worrapratt Srisukkham

Field of study :.....Industrial Microbiology....Advisor's signature :Prakitsin Srihanon

Academic year :....2007.....Co-advisor's signature :Jittra Piapukiew

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยในทุกๆ ขั้นตอน จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงได้ให้กำลังใจ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน และขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และให้คำปรึกษาในการเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ และการทดสอบสารต้านเซลล์มะเร็ง ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทำการทดลอง รวมทั้งยังกรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้"ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย"จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณนางสาวธีรวัฒนา ภาระมาตย์ นางสาวสุนัดดา โยมญาติ นางสาวสุกัญญานี แซ่เประเสริฐ นางสาวทิศนา นิธิสกุลกาญจน์ นางสาวปาริฉัตร ราวีศรี นายณัฐชัย เก่งพิภัทร นายสมเจตน์ เอกมหาสวัสดิ์ นางสาวฐิตรัตน์ เลิศเชาวยุทธ และ น้องๆ สมาชิกห้อง 401 ทุกคน ที่ให้การช่วยเหลือ และให้คำปรึกษา ตลอดจนให้คำแนะนำ จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จออกมาได้ด้วยดี และขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ สมาชิกห้อง 403 ทุกคน ที่เอื้อเฟื้อในทุกๆ เรื่อง และช่วยเหลือในขั้นตอนการทดสอบสารต้านเซลล์มะเร็ง

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตา คุณยาย คุณน้า คุณอา ทุกคน ตลอดจนพี่น้อง และญาติทุกคนที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการเรียนและการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ญ

สารบัญภาพ.....ฏ

บทที่

1. บทนำ.....1

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ประวัติการค้นพบ.....4

2.2 ลักษณะทั่วไปและแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัยซีทีส.....5

2.3 วงชีวิตของแอกติโนมัยซีทีส.....6

2.4 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทีส.....7

2.5 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีส.....17

2.6 ความต้องการสารอาหารของแอกติโนมัยซีทีส.....20

2.7 การสร้างกลิ่นและการสร้างรงควัตถุของแอกติโนมัยซีทีส.....22

2.8 การแยกและการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีส.....23

2.9 ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีทีส.....26

2.10 สารปฏิชีวนะ.....27

3. วิธีดำเนินงานวิจัย.....41

3.1 อุปกรณ์.....41

3.2 สารเคมี.....43

3.3 การเก็บตัวอย่างดิน.....46

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน.....46

3.5 การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากดินตัวอย่าง.....46

3.6 การเก็บรักษาแอกติโนมัยซีทีส.....46

3.7.การทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่มีความสามารถ
ในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....47

บทที่ หน้า

3.8.การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด ในการเลี้ยงและสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2.....52
3.9 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....53
3.10 การแยกสารสกัดเบื้องต้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....54
3.11 การศึกษาตำแหน่งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ทดสอบบนแผ่น TLC โดยวิธีไบโออโตกราฟี.....54
3.12 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์ มะเร็งมนุษย์.....55
3.13 การศึกษาผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสต่อการตายแบบอะพอพโทซิส ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์โดยวิธีย้อยด้วย DNA dry Hoechst 33342.....58
3.14 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....59
3.15 การจัดจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยวิเคราะห์ ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA.....62
4. ผลการทดลอง.....65
4.1 ลักษณะของตัวอย่างดิน.....65
.4.2 การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากดินตัวอย่าง.....66
4.3 การทดสอบความสามารถของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่แยกได้ ในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....67
4.4 จัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....70
4.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราทดสอบ โดยวิธี Dual Culture.....72
4.6 การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด ในการเลี้ยงและสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2.....85
4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....89
4.8 การแยกสารปฏิชีวนะเบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....90

บทที่ หน้า

4.9 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่
สร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....93
4.10 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....100
4.11 การศึกษาผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4
ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....102
4.12 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2....105
4.13 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2
โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA.....120
5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง.....125
รายการอ้างอิง.....129
ภาคผนวก.....136
ภาคผนวก ก.....137
ภาคผนวก ข.....148
ภาคผนวก ค.....151
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....153

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีทีส.....29

2.2 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีทีสที่พบได้ยาก.....31

3.1 แสดงส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่าง ๆ ในสารละลาย PCR 10 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ.....63

4.1 แสดงแหล่งที่เก็บ ลักษณะและพีเอช ของตัวอย่างดิน.....65

4.2 แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง.....66

4.3 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ของแอกติโนมัยซีทีส.....68

4.4 จำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม.....71

4.5 แสดงระยะทางที่เส้นใยของราทดสอบถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2.....73

4.6 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ของอาหารเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ชนิดต่าง ๆ มาสกัดด้วยเอททิลแอซิเตต.....86

4.7 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ของอาหารเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ชนิดต่าง ๆ มาสกัดด้วยเมทานอล.....87

4.8 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจาก เอททิลแอซิเตตและสารสกัดจากเมทานอลเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหาร SSB (Soluble starch broth).....88

4.9 แสดงการจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสที่นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้ง เซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....100

4.10 สรุปจำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มที่สร้างสารที่มีผลต่อการยับยั้ง เซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ โดยทำให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ แยกตามชนิดของเซลล์มะเร็ง.....101

4.11 แสดงการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ.....110

ตารางที่ หน้า

4.12 แสดงความสามารถในการสร้างรงควัตถุเมลานิน, การรีดิวซ์ไนเตรท
และการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของแอกติโนมัยซีทีส
สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....115
4.13 แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบของแอกติโนมัยซีทีส
สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....116
4.14 ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส
สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ที่อุณภูมิต่าง ๆ.....117
4.15 แสดงความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส
สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ที่พีเอชต่าง ๆ.....117
4.16 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของแอกติโนมัยซีทีส
สายพันธุ์ Nan 2.4และ Nan 6.2.....118
4.17 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของแอกติโนมัยซีทีส
สายพันธุ์ Nan 2.4และ Nan 6.2.....119
4.18 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีส
สายพันธุ์ Nan 6.2 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces platensis* 123

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงตัวอย่างวงชีวิต (life cycle) ของแอกติโนมัยซีทีส *Streptomyces coelicolor*.....6
2.2 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีส.....7
2.3 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส.....8
2.4 แสดงส่วนประกอบภายในเส้นใยอาหารของแอกติโนมัยซีทีส.....10
2.5 แสดงการสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีทีส.....11
2.6 แสดงแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายคู่และสายสั้น.....13
2.7 แสดงการสร้างสปอร์แบบสายยาวของแอกติโนมัยซีทีสใน สกุล *Streptomyces*.....14
2.8 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนสายใยอาหาร.....15
2.9 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนสายใยอากาศ.....16
2.10 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง.....37
4.1 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* โดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2.....74
4.2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Alternaria porri* โดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2.....74
4.3 แสดงผลการยับยั้งการเจริยของ *Collectotrichum capsici* โดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2.....75
4.4 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* โดย แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....75
4.5 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* โดย แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....76
4.6 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Pythium aphanidermatum* โดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2.....76
4.7 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora parasitica* โดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2.....77
4.8 ลักษณะเส้นใยของ *Aspergillus niger* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด.....78
4.9 ลักษณะเส้นใยของ *Alternaria porri* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด.....79

รูปที่ หน้า

4.10 ลักษณะเส้นใยของ *Collectotrichum capsici* เมื่อศึกษา
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....80
4.11 ลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เมื่อศึกษา
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....81
4.12 ลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* เมื่อศึกษา
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....82
4.13 ลักษณะเส้นใยของ *Pythium aphanidermatum* เมื่อศึกษาภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....83
4.14 ลักษณะเส้นใยของ *Phytophthora parasitica* เมื่อศึกษาภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....84
4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะ
ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....90
4.16 แสดงการแยกสารสกัดจากสายพันธุ์ Nan 6.2 โดยใช้แผ่น TLC
ตรวจสอบภายใต้รังสี ยู วี ที่ความยาว คลื่น 365 นาโนเมตร.....91
4.17 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Nan 6.2
ที่แยกได้ขั้นต้นด้วยแผ่น TLC.....92
4.18 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยสารสกัด
จากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ต่าง ๆ.....94
4.19 ผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิส
ของเซลล์ Jurkat ATCCno.CRL-2063 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์.....103
4.20 กราฟแสดงผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ต่อการตาย
แบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง Jurkat เปรียบเทียบกับ สาร Etoposide
และสารละลาย 25%DMSO.....104
4.21 ภาพเส้นใยและสายสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2
จากกล้องจุลทรรศน์.....105
4.22 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใย
ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 4 วัน.....106
4.23 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใย
ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน.....106

รูปที่ หน้า

4.24 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใย
ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน.....107
4.25 ภาพถ่ายกำลังสูงจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดง
สายสปอร์ขดเป็นเกลียวของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2
ที่เจริญเต็มที่ อายุ 6 วัน.....108
4.26 ภาพถ่ายกำลังสูงจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
แสดงลักษณะพื้นผิวสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....108
4.27 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4
เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ.....111
4.28 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2
เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ.....113
4.29 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีส
สายพันธุ์ Nan 2.4 จำนวน 1,083 เบส.....120
4.30 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีส
สายพันธุ์ Nan 6.2 จำนวน 1,097 เบส.....121
4.31 Phylogenetic tree แสดงการจัดความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีส
ที่ได้จาก GenBank กับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....122