การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยเชื้อ MICROMONOSPORA และเชื้อสกุลอื่นที่เกี่ยวข้อง

Comparative Studies on Antibiotics Production by Micromonospora and Related Genera

โดย

สมบูรณ์ ธนาสุกวัฒน์ และคณะ

๗๖

2532

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่	
๑. บทนำ	๑
๒. การพัฒนาการหมักสารปฏิชีวนะ	๘
๓. แนวเหตุผล วัตถุประสงค์ และขอบเขตของการวิจัย	๑๔
๔. วัสดุและวิธีการ	๑๕
๕. ผลการทดลอง	๒๑
๖. วิจารณ์ สรุป และข้อเสนอแนะ	๕๕
เอกสารอ้างอิง	๕๗
ภาคผนวก	๕๙

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตสารปฏิชีวนะโดยเชื้อ *Micromonospora* และเชื้อสกุลอื่นที่เกี่ยวข้อง

ผู้วิจัยหลัก สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

ผู้วิจัยร่วม กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ

นิจศิริ เรืองรังษี

เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ ธันวาคม พ.ศ.๒๕๓๒

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาคัดเลือกและตรวจสอบเอกลักษณ์เชื้อ actinomycetes ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่สามารถผลิตสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, และมีบางไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 และ *Candida albicans* IFO 0583. เชื้อทุกไอโซเลตไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490, *Aeromonas hydrophila* JCM 2359, *Aeromonas sobria* JCM 2365, *Serratia marcescens* IAM 73060 และ *Escherichia coli* NIHJ JC-2 พบว่าเชื้อทั้งหมด ๔๗ ไอโซเลตเป็น *Micromonospora* sp.๒๐ ไอโซเลต, *Streptomyces* sp. ๑๕ ไอโซเลต, *Streptoverticillium* sp. ๑ ไอโซเลต *Actinoplanes* sp ๓ไอโซเลต *Nocardia* sp.๓ ไอโซเลต และ unidentified group ๕ ไอโซเลต

การตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อที่คัดเลือกมา คือ *Micromonospora* sp. A6-2 และ A25 รวมทั้ง *Streptomyces* sp. SP5-1 ทำโดยใช้ electron microscope scanning ยกเว้นเชื้อ *Streptoverticillium* sp.A5-1 ศึกษาเปรียบเทียบสภาวะเหมาะสมของการเจริญในอาหารแตกต่างกัน (PY,SS,FS,SG),pH๖-๘, บ่มไว้ที่ ๒๘°- ๓๕°ซ นาน ๓-๗ วัน ตรวจสอบกลุ่มสารปฏิชีวนะที่เชื้อผลิตขึ้นด้วย thin-layer chromatography โดยใช้ silica gel G/$CHCl_3$: EtOH, 6:4 ผลสามารถตรวจพบสารปฏิชีวนะได้อย่างชัดเจนใน fermentation broth ของเชื้อ A25 และ SP5-1

Project Title : Comparative Studies on Antibiotics Production by *Micromonospora* and Related Genera

Name of Investigators : Somboon Tanasupawat
Kittisak Likhitwitayawuid
Nijsiri Ruangrungsi

Year : December, 1989

ABSTRACT

The screening and identification of antibiotic producing actinomycetes were carried out. Most of the isolates could inhibit *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and the few isolates could inhibit *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 and *Candida albicans* IFO 0583. All of the isolates showed no antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490, *Aeromonas hydrophila* JCM 2359, *Aeromonas sobria* JCM 2365, *Serratia marcescens* IAM 73060 and *Escherichia coli* NIHJ JC-2. Out of 47 isolates identified, 20 were *Micromonospora* sp., 15 were *Streptomyces* sp., 1 was *Streptoverticillium* sp., 3 were *Actinoplanes* sp., 3 were *Nocardia* sp., and 5 were unidentified group.

The potent selected isolates of *Micromonospora* sp. A6-2 and A25 including *Streptomyces* sp. SP5-1 were examined for spore characteristics by electron microscope scanning, except *Streptoverticillium* sp. A5-1. Their optimization of growth in different media (PY, SS, FS, SG), pH 6-8, incubated at 28 °-35 °C for 3-7 days were studied comparatively. The antibacterial components of the tested isolates

were examined by thin-layer chromatography using silica gel G/$CHCl_3$: EtOH, 6:4. Results revealed the presence of distinct spots containing in the fermentation broth of A25 and SP5-1.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณนักวิจัยเกี่ยวกับเชื้อ actinomycetes หลายท่านที่แนะนำและให้คำปรึกษาตลอดมา (ไม่ขอกล่าวนามในที่นี้) และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงานวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้จัดสรรทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๓๐ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	Species of *Micromonospora*, aerobic species	3
2.	ธาตุองค์ประกอบของแบคทีเรีย	11
3.	ธาตุองค์ประกอบของ Corn Steep Liquor	11
4.	จุลินทรีย์ทดสอบ	17
5.	การสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่น	22
6.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่นบนอาหารวุ้น YM (๑๔ วัน)	27
7.	ลักษณะทางการเจริญของเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่น	29
8.	ลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่น	37
9.	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่น	39
10.	การเจริญของเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว PY และ SS เมื่อใช้ seed culture ๑% ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว GMP	46
11.	การเจริญของเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว PY และ SS เมื่อใช้ seed culture ๑% ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว GSC	47
12.	ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *B.subtilis* ของสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PY และ SS ระดับ pH ต่างกัน ที่ ๒๘ °ซ.	48
13.	ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *B.subtilis* ของสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว FS และ SG ระดับ pH ต่างกันที่ ๒๘ °ซ.	49
14.	ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *S.aureus* และ *B.subtilis* ของสารปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PY(pH ๗.๔) ที่ ๓๐ °ซ.	50
15.	ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *S.aureus* และ *B.subtilis* ของสารปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว FS(pH ๗.๒๗) ที่ ๓๕ °ซ.	51
16.	ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *S.aureus* และ *B.subtilis* ของสารปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว SG-1(pH ๗.๒) บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ.	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ลักษณะรูปร่างสปอร์ของเชื้อ *Micromonospora* species	2
2.	Schematic diagrams which repsesent the aerial mycelium and substrate mycelium of some actinomycete genera	7
3.	ความสัมพันธ์ระหว่าง low molecular-weight intermediate ซึ่งจุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นกับผลผลิตที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์และ secondary metabolite	8
4.	ลักษณะโคโลนีของเชื้อตัวแทนที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งเลี้ยงบนอาหารวุ้น YM(ISP-2) ที่ ๓๐ °ซ.	41
5.	Scanning electron micrograph ของเชื้อ *Micromonospora* sp. A6-2 เลี้ยงบนอาหาร YM(ISP-2) ที่ ๓๐ °ซ. อายุ ๑๐ วัน	43
6.	Scanning electron micrograph ของเชื้อ *Micromonospora* sp. A25 เลี้ยงบนอาหารวุ้น YM(ISP-2) ที่ ๓๐ °ซ อายุ ๑๐ วัน	44
7.	Scanning electron micrograph ของเชื้อ *Streptomyces* sp. SP5-1 เลี้ยงบนอาหารวุ้น YM(ISP-2) ที่ ๓๐ °ซ อายุ ๑๔ วัน	45
8.	TLC plate แสดงกลุ่มสารปฏิชีวนะที่เชื้อตัวแทนผลิตขึ้น	54

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

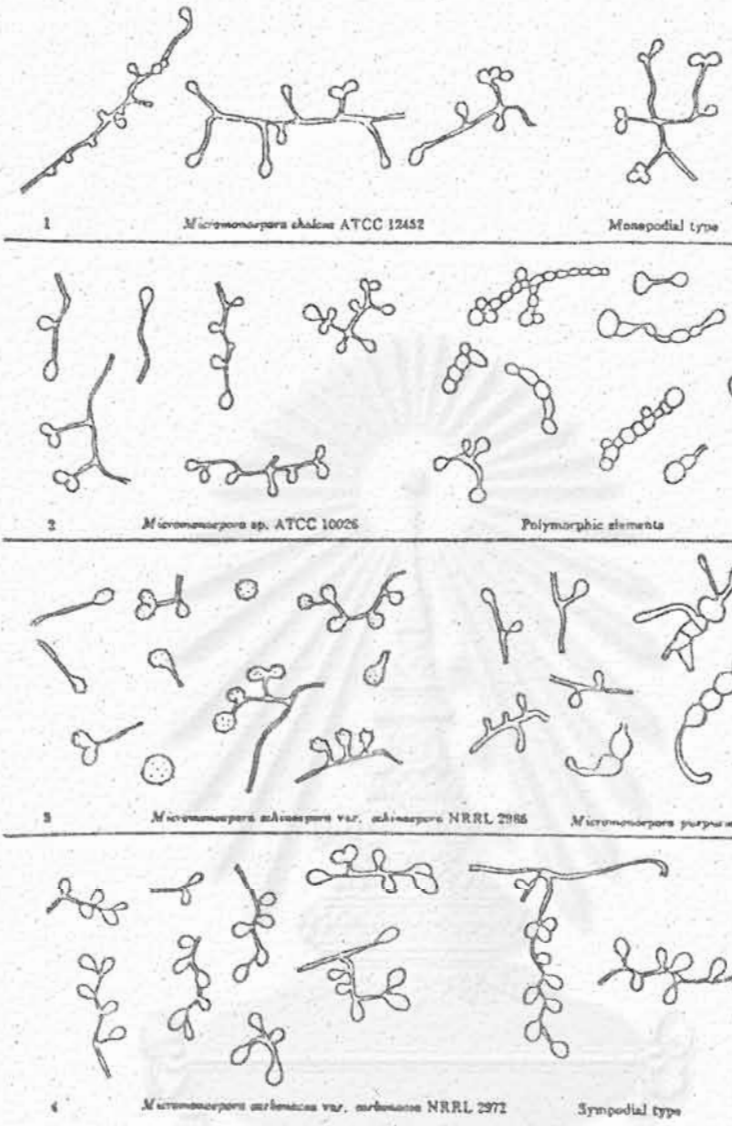
บทที่ ๑

บทนำ

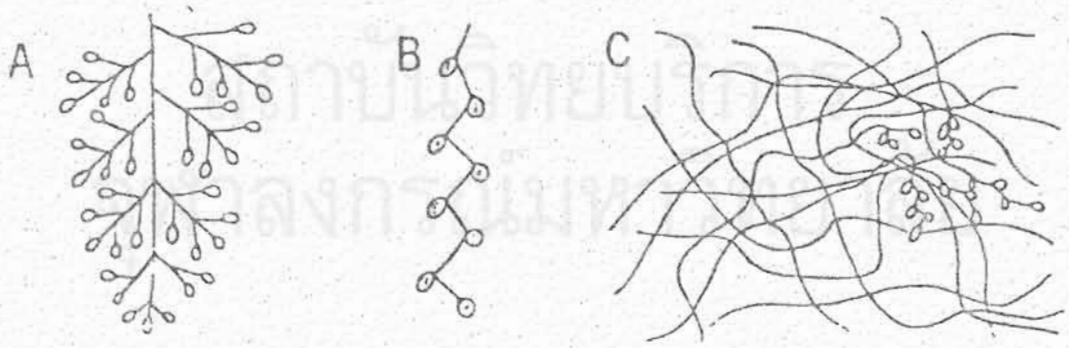
แบคทีเรียสกุล *Micromonospora* จัดเป็น actinomycetes จำพวกหนึ่ง ซึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น gentamicin sagamicin kanamycin megalomicin erythromycin mycinamicin halomicin mutamicin และ everninomicin โดยเฉพาะยา gentamicin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* sp.,และ *Pseudomonas aeruginosa* (๑,๒)

เชื้อ *Micromonospora* สามารถสร้างเส้นใย (substrate mycelium) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย ๐.๕ µm มักไม่สร้างสายใยอากาศ (aerial mycelium) ถ้าพบมักมีสีขาวหรือเทา เชื้อนี้ย้อมติดสีแกรมบวกไม่ใช่ acid-fast ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-diaminopimelic acid และ glycine โคโลนีบนอาหารวุ้นมีลักษณะสูงจากผิวอาหาร ทำให้เห็นเป็น walnut-kernel-like appearance โคโลนีอาจมีสีเหลืองส้ม ส้มแดง น้ำตาล น้ำตาลแดง หรือเขียวแกมน้ำเงิน สร้างสปอร์เพียงสปอร์เดียว มีก้านชูสปอร์สั้นหรือยาวแตกต่างกัน สปอร์มีสีน้ำตาลถึงดำ มีลักษณะเป็นเมือกหรือหนืด การแตกก้านของสปอร์เป็นได้ทั้ง monopodial หรือ sympodial (ภาพที่ ๑)

เชื้อนี้เจริญแบบต้องการอากาศยกเว้น ๒ สปีชีส์เท่านั้นที่เจริญแบบไม่ต้องการอากาศ sensitive ต่อ pH ที่ต่ำกว่า ๖.๐ เจริญดีที่ช่วงอุณหภูมิ ๒๐-๔๐ °ซ. แต่ไม่เกิน ๕๐ °ซ. หลายเชื้อสามารถสลายอินทรีย์สารจำพวก เซลลูโลส ไคติน และไซแลน พบเป็นซาโปรไฟต์ในดินและน้ำ (๓-๕) Cross และ Goodfellow (๖) สรุปลักษณะของเชื้อ *Micromonospora* กลุ่มที่ต้องการอากาศแต่ละสปีชีส์ (ตารางที่ ๑) โดยอาศัยลักษณะสีโคโลนีรงควัตถุที่ละลายน้ำ รูปร่างของสปอร์ ผิวของสปอร์ ก้านชูสปอร์ การทนเกลือ และความสามารถใช้ เคซีน และกลีเซอรอล



1 to 4. *Drawings from photomicrographs of the sporulating hyphae of Micromonospora.*



5. *Sporophore types of Micromonospora.* (A) *Monopodial system.* (B) *Sympodial system.* (C) *Mycelial web of M. carbonacea var.*

ภาพที่ ๑

ลักษณะรูปร่างสปอร์ของเชื้อ *Micromonospora* species (๔)

ตารางที่ ๑ Species of *Micromonospora*, aerobic species (๒)

	aurantiaca[a,b]	*bicolor*[c]	*brunea*[a,b]	*carbonacea*[d]	*chalcea*[e,f,g]	*coerulea*[f,g]	*echinospora*[h]	*elongata*[c]	*fulvopurpurea*[a,b]	*glabosa*[c,i]	*lilacina*[a,b]	*narashinoa*[f,k]	*parva*[f]	*purpurea*[h]	*purpureo-chromogenes*[i]	*rubra*[a,b]
Colony colour before sporulation	YO	G	B-dk B	OB	RB	dkBl G	PuB	pYB-GyB	OB-dk B	pYB	V-dkR	OB	pPk-O	OB-PuB	RB	RB-Pu
Soluble pigment	–	–	B-Bk	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	RB-dkB	–
Spores: spherical	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	?	+	+
Spores: oval	–	+	–	+	–	–	–	+	–	–	+	+	+	?	–	+
Spore surface: smooth	+		–	+	+	+	–		–		–		+	+?	+	–
Spore surface: warty	–		+	–	–	–			+		+		–	–	–	+
Spore surface: spiny	–		–	–	–	–	+		–		–		–	–	–	–
Sporulation morphology: monopodial				–	+	+	+	+		+		+		–	+	
Sporulation morphology: sympodial				+	–	–	–	–		–		–		–	–	
Sporulation morphology: cluster type	+		+	–	+	–	–	–	+	+		+		–	+	–
Sporulation morphology: open type	+		–	+	–	+	+	+	+	–		–		–	+	+
Sodium chloride tolerance: 1·5%				+	+	±	+					+		+	±	
Sodium chloride tolerance: 3·0%				±	+	–	±					+		±	–	
Sodium chloride tolerance: 4·0%				–	+	–	–					+		–	–	
Sodium chloride tolerance: 5·0%				–	±	–	–					±		–	–	
Sodium chloride tolerance: 7·0%				–	–	–	–					–		–	–	
Hydrolysis of casein				+	+		±						±	+	±	
Utilization of glycerol				±	–		–							–	+	

นอกจากนี้ยังแบ่งเชื้อ *Micromonospora* ได้เป็นสองกลุ่ม คือ พวกที่ต้องการอากาศ และพวกที่ไม่ต้องการอากาศ (๕) ดังรูปวิธานจำแนกสปีชีส์ (key to the species) ต่อไปนี้

Key to the species of genus **Micromonospora**

I. Aerobic.
  A. α-Melibiose utilized (for species in which carbohydrate data are lacking see IC or ID).
    1. Raffinose utilized.
      a. Sporophores arranged monopodially.
        i. Growth poor on Czapek's sucrose agar.
          1. *Micromonospora chalcea*
        ii. Growth fair to good on Czapek's sucrose agar.
          2. *Micromonospora halophytica*
    2. Raffinose not utilized.
      a. Sporophores arranged sympodially.
        3. *Micromonospora carbonacea*
      b. Spores often produced on monopodially arranged, short lateral spikes. In broth culture mycelium often formed into cluster colonies which fragment readily.
        i. D-Mannitol not utilized.
          4. *Micromonospora narashinoensis*
        ii. D-Mannitol utilized.
          See *Species incertae sedis*
      c. Spores produced monopodially either on long sporophores or in flower-like clusters.
        5. *Micromonospora melanosporea*
  B. α-Melibiose not utilized.
    1. L-Rhamnose utilized. Spores echinulate.
      6. *Micromonospora echinospora*
    2. L-Rhamnose not utilized. Spores aberrant.
      7. *Micromonospora purpurea*
  C. Produce characteristic pigments.
    1. Produce extensive dark brown to black pigment diffusing into agar.
      8. *Micromonospora purpureochromogenes*
    2. Do not produce brown or black diffusible pigment.
      a. Mycelial pigment green or blue-green.
        i. Cellulose hydrolyzed.
          9. *Micromonospora bicolor*
        ii. Cellulose not hydrolyzed.
          10. *Micromonospora coerulea*
  D. Pigments non-characteristic; colonies in shades of pale yellow, orange, brown or black.
    1. Growth vigorous on protein-containing media.
      11. *Micromonospora globosa*
    2. Growth not vigorous on protein-containing media.
      a. Does not grow on potato. Cellulose hydrolyzed.
        12. *Micromonospora elongata*
      b. Grows on potato. Cellulose not hydrolyzed.
        i. Isolated from soil.
          13. *Micromonospora parva*
        ii. Clinical isolate.
          14. *Micromonospora gallica*

II. Anaerobic.
  A. Cellulose not utilized; acetic and formic acids produced.
    15. *Micromonospora acetoformici*
  B. Cellulose utilized; acetic and propionic acids produced.
    16. *Micromonospora propionici*

<u>เชื้อสกุลอื่นที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ</u>

Actinoplanes เป็นแบคทีเรียที่สร้างเส้นใย ชนิด non-fragment เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด ๐.๒-๒.๖ µm แตกแขนง เป็นขดไม่สม่ำเสมอมีทั้งโค้ง หรือตรง มักไม่พบสายใยอากาศ ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-diamino pimelic acid (meso-DAP) sporangia มีรูปร่างกลม กลมรี หรือเป็นรูปทรงกระบอกปลายกลมจนถึงไม่สม่ำเสมอ ขนาด ๓-๒๐×๖-๓๐ µm ภายใน sporangia มีสปอร์รูปร่างกลมหรือกลมรี เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด ๑-๑.๕ µm เรียงกันเป็นขด เป็นสายตรงหรือไม่สม่ำเสมอ สปอร์เคลื่อนที่ได้ด้วย polar flagella (ภาพที่ ๒)

เชื้อนี้เจริญได้บนอาหารเปปโตน และ Czapek หรืออาหารอื่น โคโลนีมีสีส้ม แดง เหลือง และม่วง บางเชื้อสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ทำให้อาหารมีสีฟ้า แดง เหลือง น้ำตาลหรือเขียว เชื้อนี้ไม่ต้องการ organic growth factors บางสปีชีส์สร้าง H_2S เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศ เจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ ๑๘-๑๕ °ซ. พบอยู่ในดิน ซากพืชและสัตว์ (๕,๖)

Nocardia เป็นแบคทีเรียที่สร้างเส้นใยแตกแขนง (branched vegetative hyphae) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๐.๕-๑.๒ µm เจริญบนผิวและแทงทะลุลงไปในอาหารวุ้น มักแบ่งเซลล์โดยหักเป็นท่อน (fragment) หรือแบ่งเซลล์เป็นแท่งสั้นถึงรูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ มักสร้างสายใยอากาศดูเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ อาจสร้างโคนิเดียเป็นสายสั้นหรือยาวบนสายใยอากาศ หรืออาจไม่พบทั้งบนสายใยอากาศ และ vegetative hyphae ไม่สร้างเอนโดสปอร์ sporangia, sclerotia หรือ synnemata

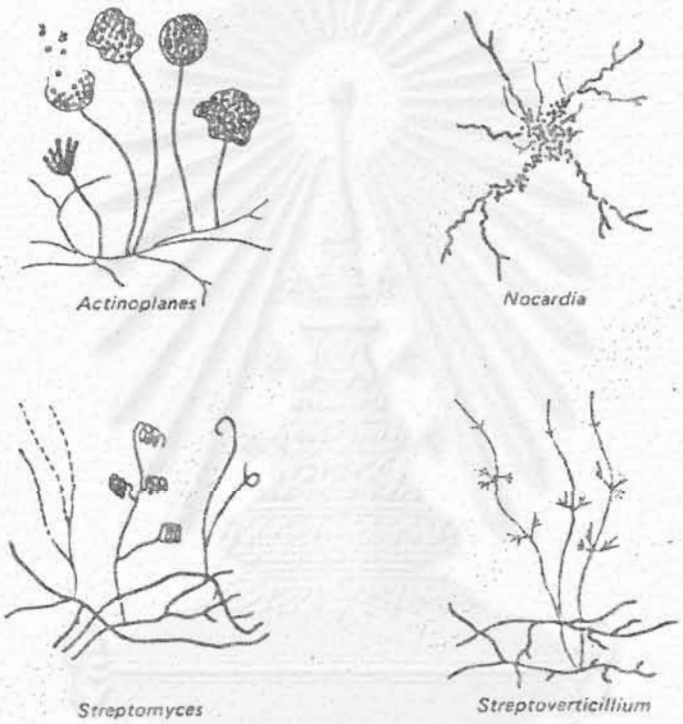
เป็นเชื้อแกรมบวกหรือแปรผัน บางเชื้อ partially acid-fast ขึ้นอยู่กับช่วงการเจริญ ต้องการอากาศเป็น mesophile, chemoorganotroph, ดำเนินเมตาโบลิซึมแบบหายใจ สร้างเอนไซม์แคตาเลส ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP, อะราบิโนสและกาแลคโตส กรดไขมันเป็น diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidyl inositol และ phosphatidylinositol mannosides มี straight

chain, unsaturated 10-methyl (tuberculostearic) fatty acids, mycolic acids (C_{46-60}) และกรดไขมันที่มี ๓ double bonds รวมทั้ง menaquinone ชนิด MK-8(H_4) หรือ MK-9(H_2) (เฉพาะเชื้อ *N. amarae*) พบเชื้อนี้ในดิน(๙)

Streptomyces เป็นแบคทีเรียที่สร้างเส้นใยแบบไม่มีผนังกั้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๐.๕-๒.๐ µm สายใยอากาศสร้างสปอร์เป็นสายมีสปอร์ ๓ หรือมากกว่านี้ (ภาพที่ ๒) สปอร์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง ๐.๕-๒.๐ µm ย้อมติดสีแกรมบวก ผนังเซลล์ประกอบด้วย L-diaminopimelic acid โคโลนีมีลักษณะเป็นเม็ด (granular) เป็นผงคล้ายแป้ง (powdery) เหมือนกำมะหยี่ (velvety) หรือจับเป็นก้อน (floccuse) เชื้อสกุลนี้สร้างรงควัตถุได้หลายชนิด เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศ สามารถใช้กลูโคส สลายเจลาติน เคซีน และแป้งรีดิวซ์เกลือไนเตรต pH เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง ๖.๕-๘.๐ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ ๒๕-๓๕ °ซ. บางเชื้อเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงมาก (๕,๖,๘)

Streptoverticillium เป็นแบคทีเรียที่สร้างเส้นใยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๑-๒ µm สายใยอากาศ แตกแขนงโดยรอบ (verticil) ๓-๖ เส้น ยาว ๑-๑๐ µm เฉลี่ย ๓-๕ µm โดยแตกแขนงเป็นช่วง ๆ ตามแนวของสายใยอากาศ ทำให้เห็นคล้ายลวดหนาม (barbed wire) ภาพที่ ๒ แขนงนี้จะแตกก้าน (secondary branches) ได้เป็น ๒-๑๒ แขนงหรือมากกว่า มีรูปคล้าย umbel และมีสปอร์เป็นสายโซ่ต่อออกมาอีก สปอร์มีรูปร่างกลมหรือสี่เหลี่ยมสายสปอร์ เป็นเส้นตรง โค้ง หรือคล้ายตะขอ เชื้อนี้ย้อมติดสีแกรมบวก ผนังเซลล์ประกอบด้วย L-diaminopimelic acid

เชื้อนี้เมื่อแยกได้ครั้งแรกมีโคโลนีขนาดเล็ก ผิวไม่สม่ำเสมอ หรือมีผิวเรียบ ต่อมาอาจเป็น weft เมื่อสร้างสายใยอากาศ โคโลนีอาจคล้ายกำมะหยี่หรือจับเป็นก้อน สร้างรงควัตถุได้หลายชนิด เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศ เจริญได้เหมาะสมที่อุณหภูมิประมาณ ๒๕-๓๕ °ซ. pH ๖.๕-๘.๐ เป็นซาโปรไฟต์ในดิน (๕,๖,๘)



ภาพที่ ๒ Schematic diagrams which represent the aerial mycelium and substrate mycelium of some actinomycete genera (๖)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

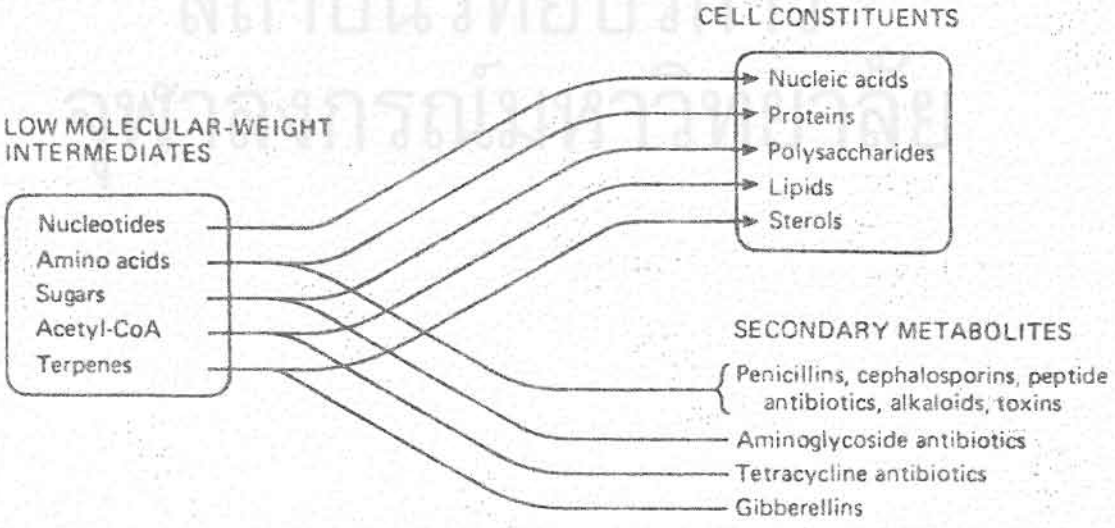
บทที่ ๒

การพัฒนาการหมักสารปฏิชีวนะ

secondary metabolism มีความสัมพันธ์กับ primary metabolism โดยที่ primary metabolism เป็น interrelated series ของ enzymes-catalysed reaction ซึ่งให้พลังงานแก่เซลล์กับช่วยสังเคราะห์ intermediate และสารโมเลกุลใหญ่จำพวกโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่จำเป็นต่อระบบของเซลล์ เป็นผลให้การควบคุมระบบเมตาโบลิกเกิดความสมดุล intermediateที่สร้างขึ้นเป็น primary metabolite ซึ่งไม่มีการสะสม แต่ของ secondary metabolism มีลักษณะเป็น lower form ของชีวิตที่สะสมอยู่ปริมาณมาก ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อสร้าง secondary metabolite จึงเป็นกุญแจสำคัญทางการค้า (๖)

ถึงแม้จะทราบโครงสร้างทางเคมีของสารจาก secondary metabolism ที่ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดแล้วก็ตาม เราอาจแบ่งกลุ่มสารนั้นเป็น ๔ กลุ่ม ตามความแตกต่างของสารเริ่มต้นที่ใช้สังเคราะห์ (ภาพที่ ๓) นิวคลีโอไทด กรดอะมิโน น้ำตาล acetyl-CoA และ terpene เป็นสารเริ่มต้นสำหรับสร้างองค์ประกอบของเซลล์และ metabolite ที่สำคัญทางอุตสาหกรรม (๔)

ภาพที่ ๓ ความสัมพันธ์ระหว่าง low molecular-weight intermediate ซึ่งจุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นกับผลผลิตที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์และ secondary metabolite (๔)



การผลิต secondary metabolites ไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเจริญของเชื้อ แต่สภาวะแวดล้อมมีอิทธิพลอย่างมาก แม้จะมีการพัฒนาเชื้อที่ใช้ผลิตทางอุตสาหกรรมด้านพันธุกรรมให้ผลิตสารปฏิชีวนะได้มาก แต่พันธุกรรมของเชื้อก็อาจไม่เสถียร (stable) สิ่งสำคัญในการพัฒนาการหมักจำเป็นต้องตระหนักถึง การปรับปรุงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะเหมาะสมของกระบวนการหมัก ดังจะกล่าวถึงบางหัวข้อต่อไปนี้ (๑๐)

ผลของสารอาหารต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ

แบคทีเรียทั่วไปต้องการสารอาหารหลายชนิด เชื้อที่ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะก็เช่นเดียวกัน ต้องการแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และไอออนของโลหะหลายชนิด บางเชื้อต้องการสารที่มีโมเลกุลซับซ้อนทั้งวิตามินและกรดอะมิโนอีกด้วย

คาร์บอนและพลังงาน เชื้อต้องการพลังงานเพื่อออกซิไดส์สารอินทรีย์ให้ได้สารคาร์บอนสำหรับสร้างองค์ประกอบของเซลล์ เชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่พบอยู่ในดิน จึงมีความสามารถใช้แหล่งสารอินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น simple sugars oligo-และ polysaccharides polyalcohols และ สารอินทรีย์ในรูปของเกลือไซเตียม substrate ที่นิยมใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ แป้ง oilและ simple sugar หลายชนิด อย่างไรก็ตามกรณีที่ใช้ในรูป crude preparation มักมีสารอื่นปะปนอยู่ด้วย เช่น ฟอสเฟต เกลือแร่ และสารประกอบไนโตรเจน เนื่องจากองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียมีปริมาณคาร์บอนสูง (ตารางที่ ๒) และคาร์บอนเกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน ดังนั้น carbon/energy substrate จึงเป็นองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทางอุตสาหกรรมมีการใช้แหล่งคาร์บอนผสมหลายชนิด เช่น กลูโคส เพื่อให้เชื้อใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างรวดเร็ว และใช้แป้งซึ่งมีราคาถูกเพิ่มเติมแทนกลูโคส อาหารที่ใช้หมัก อาจมี oil และ fatty acid เป็นส่วนประกอบ อาจใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกเช่น น้ำอ้อย beet molasses โดยเฉพาะ molass มีเกลือแร่ปะปนอยู่มาก ซึ่งอาจเป็นประโยชน์หรือโทษต่อการหมัก การเลือกแหล่งคาร์บอนขึ้นอยู่กับความสามารถของเอนไซม์ที่เชื้อมีอยู่ และลักษณะของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้น

ไนโตรเจน เชื้อที่ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายรูปแบบ ทั้งโปรตีน แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย เกลือไนเตรต และยูเรีย ถ้าใช้โปรตีนเชื้อต้องมี extracellular proteolytic enzyme เพื่อสลายเสียก่อน โปรตีนเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนรวมทั้งพลังงาน หากแหล่งคาร์บอนอื่นถูกใช้หมดไป เชื้อจะใช้โปรตีนแทน ทำให้เกิดแอมโมเนียออกมาในอาหาร pH จึงเพิ่มขึ้นซึ่งอาจเป็นผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสมีอยู่ในรูปฟอสเฟตอินทรีย์ หรือ ฟอสเฟตอินทรีย์ สารฟอสเฟตที่ซับซ้อนมักพบในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น โปรตีน ฟอสฟอรัสเป็น conserved substrate ที่หมุนเวียนอยู่ภายในเซลล์ และไม่หมดไปจากอาหาร เชื้อต้องการฟอสฟอรัสแตกต่างกัน และขึ้นอยู่กับสภาวะของการหมักด้วย ฟอสฟอรัสของเซลล์มีอยู่ในระดับ ๐.๒% และ ๑๐% หากมีมากเกินไปจะเป็น inhibitor หรือ repressor ในการผลิตสารปฏิชีวนะ

ซัลเฟอร์ มักใช้ซัลเฟอร์ในรูปซัลเฟต บางชนิดอยู่ในรูปโปรตีน เช่น cysteine และ methionine อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะมักมีซัลเฟอร์ปริมาณเกินพอ และต้องไม่ไปยับยั้งการเจริญหรือการสร้างสารปฏิชีวนะ ในสภาวะมีอากาศซัลเฟอร์เป็น conserved substrate

แคทไอออนและแร่ธาตุอื่น มักใช้โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ในรูปซัลเฟต ฟอสเฟต คลอไรด์ และอื่นๆ โดยทั่วไปพบไอออนอยู่ในน้ำและ substrate อื่น ผลของแคทไอออนต่อการหมักค่อนข้างซับซ้อนบางกรณีถ้ามีมากอาจกระตุ้นหรือยับยั้งการสร้างผลผลิต เชื้อหลายชนิดต้องการความสมดุลระหว่างโซเดียมและโพแทสเซียม แคลเซียมและแมกนีเซียม ทำให้เกลือไม่ละลาย บางครั้งมีผลในการดึงสารอื่นออกจากสารละลาย

เอนไซม์หลายชนิดต้องการ metal ion เป็น cofactor ไอออนเหล่านี้รวมทั้ง แคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก โคบอลท์ คอปเปอร์ ซิงค์ และโมเลปดีนัม เชื้อต้องการไอออนเหล่านี้เพียงปริมาณเล็กน้อย อาจช่วยเพิ่มอัตราการผลิต แต่ถ้ามีมากไปจะเป็นตัวยับยั้ง ผลิตภัณฑ์จากยีสต์ใช้เป็นแหล่งแร่ธาตุได้

complex nutrient แหล่งอาหารซับซ้อนหลายชนิดที่ใช้ในการหมัก เช่น pharmamedia และ corn steep liquor ช่วยในการเจริญของเซลล์ อาหารเหล่านี้มี โปรตีน น้ำตาล และสารอื่น (ตารางที่ ๓) ที่กระตุ้นให้เชื้อเจริญเร็วขึ้น

ตารางที่ ๒ ธาตุองค์ประกอบของแบคทีเรีย (๑๐)

Element	Percentage of dry weight		
	Luria (1960)	Zabriskie *et al.* (1980)	Pirt (1975)
Carbon	50	48	—
Oxygen	20	—	—
Nitrogen	14	12.5	12
Hydrogen	8	—	—
Phosphorus	3	2.5	1.5
Sulfur	1	0.6	0.3
Potassium	1	2.5	1.7
Sodium	1	0.7	—
Calcium	0.5	0.5	0.1
Magnesium	0.5	0.3	0.1–0.3
Chlorine	0.5	—	—
Iron	0.2	0.1	.015
Manganese		0.005	.005
Zinc		—	.005
Copper		0.015	.001
Cobalt		—	.001
Molybdenum		—	.001

ตารางที่ ๓ ธาตุองค์ประกอบของ Corn Steep Liquor (๑๐)

Component	g/kg
C	184.39
N	40.50
P	17.82
S	3.132
K	24.30
Mg	8.10
Na	1.08
Ca	0.324
Fe	0.162
Cu	0.0135
Mn	0.0270
Mo	0.0011
Cl^-	3.780
Zn	0.0945

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของอุณหภูมิ

จุลินทรีย์เป็น heterogeneous reactor ขนาดเล็กที่สามารถขนส่งสารอาหาร และเกิดปฏิกิริยาต่างๆ เพื่อสร้างผลผลิตหลายชนิดภายในโครงสร้างนั้น อุณหภูมิจึงอาจมีผลต่อสิ่งดังกล่าว และต่อการหมักอย่างซับซ้อน การเพิ่มอุณหภูมิทำให้ลดการละลายของออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งมีผลต่อการหมัก เชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะเจริญอยู่ในช่วง ๒๕° - ๓๕°ซ อัตราการผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิแต่การรักษาอัตราการผลิตที่เหมาะสมโดยขยายระยะเวลาการผลิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ผลของอุณหภูมิพอสรุปได้ดังนี้

- inactivation of a limiting enzyme
- general inactivation of multiple proteins
- increased death or maintenance rate
- breakdown of membranes
- breakdown of metabolic regulators
- increased errors in coding for macromolecules
- changes in protein conformation
- changes in molecular architecture of cytoplasmic membrane
- production or accumulation of "toxic" products

ผลของระดับ pH

ควรตระหนักถึงผลของระดับ pH ต่อเชื้อทั้งสภาวะเป็นกรดและ hydroxyl ion หากมีความเข้มข้นสูงจะทำปฏิกิริยาและทำลาย biological material ที่ความเข้มข้นต่ำไอออนเหล่านี้จะทำให้เกิด

- affect the dissociation of organic acids
- change the properties of cellular membranes
- affect the activity of extracellular enzymes
- affect cell wall formation
- affect the product distribution of microbial metabolism
- precipitate metal ions and inorganics
- affect the stability of secondary metabolites

จึงไม่น่าแปลกใจที่พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ชอบความเป็นกลางที่ pH 7 สำหรับการเจริญ

ผลของระดับ pH ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะค่อนข้างซับซ้อน เช่น มีผลต่ออัตราการผลิต distribution of antibiotic analogsและการสร้าง degradation products ผลของ pH ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ความคงตัวของสารปฏิชีวนะและชีวเคมีของ analog production

ผลของการกวนและการให้ออกซิเจน

การกวน (agitation) มีผลต่อการหมักคือ ทำให้สภาวะแวดล้อมของเชื้อมีความสม่ำเสมอและช่วยให้ออกซิเจนจากอากาศละลายลงในอาหาร ในห้องปฏิบัติการมักเลี้ยงเชื้อในฟลาสค์สำหรับเขย่าบน rotary shaker ความเร็ว ๒๐๐ - ๓๐๐ rpm การละลายของอากาศจากผิวหน้าลงสู่อาหารจึงขึ้นอยู่กับอัตราความเร็วของการเขย่า ขนาดและรูปร่างของฟลาสค์ ปริมาณของอาหารและความหนืดของอาหาร นอกจากออกซิเจนแล้ว คาร์บอนไดออกไซด์อาจมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะในฟลาสค์โดยการเขย่าอีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ ๓

แนวเหตุผล วัตถุประสงค์ และขอบเขตของการวิจัย

สารปฏิชีวนะเป็น secondary metabolites โดยทั่วไปผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์จำพวก actinomycetes เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าสารปฏิชีวนะเป็นยารักษาโรคที่เกิดกับคนและสัตว์หรือพืช ตลอดจนใช้ในการวิจัยทางชีวเคมี หรือใช้ในการศึกษากลไกการสร้างผนังเซลล์ การสร้างโปรตีนและกรดไขมันของแบคทีเรียอีกด้วย อุตสาหกรรมการผลิตสารปฏิชีวนะในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นของต่างประเทศ เช่น β-lactams ซึ่งผลิตแบบ semisynthetic หรือ synthetic นั้นเป็นผลงานวิจัยของประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เยอรมันนี สวิสเซอร์-แลนด์ อิตาลี และฝรั่งเศส (๖, ๑๑)

ปัจจุบันถึงแม้ว่าจะมีการค้นพบสารปฏิชีวนะกว่า ๖๐๐๐ ชนิด แล้วก็ตาม แต่ในประเทศเรายังมีการวิจัยการผลิตสารปฏิชีวนะในวงแคบ ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะก็ยังมีความสำคัญอยู่ และถึงแม้ว่าเราจะตื่นเต้นกับความสำเร็จทางด้าน gene technology แล้วก็ตาม แต่เทคนิคดังกล่าวก็ไม่อาจนำมาใช้ทำให้จุลินทรีย์ผลิตสารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างใหม่ทั้งหมดได้ (๑๐) จึงจำเป็นต้องแยกเชื้อใหม่จากแหล่งธรรมชาติ จากเหตุผลนี้จึงได้วางโครงการเพื่อ ๑. คัดเลือกเชื้อ *Micromonospora* และเชื้อสกุลอื่นที่สร้างสารปฏิชีวนะ เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

๒. ตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อรวมทั้งศึกษาโครงสร้างภายนอกของเชื้อโดยใช้ Scanning Electron Microscope

๓. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะตลอดจน

๔. ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารหรือกลุ่มสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นโดยวิธี thin layer chromato graphy (TLC)

การศึกษาครั้งนี้จะทราบว่าเชื้อ *Micromonospora* และเชื้ออื่นที่พบในประเทศเราสามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใดและสารที่ผลิตเป็นสารหรือกลุ่มสาร-ปฏิชีวนะในกลุ่มใด ทราบถึงการกระจายของเชื้อในแหล่งธรรมชาติ และผลการวิจัยยังจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางเคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา และอนุกรมวิธาน รวมทั้งเชื้อที่ได้จะเป็นแหล่ง new genes เพื่อใช้ในการศึกษา recombinant DNA และเป็น new gene bankอีกด้วย

บทที่ ๔

วัสดุ และ วิธีการ

๑. แหล่งของเชื้อ และการแยกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ

เก็บตัวอย่างดินชนิดต่าง ๆ จากหลายจังหวัดในประเทศไทย โดยเก็บดินบริเวณที่มีหญ้าหรือต้นไม้ปกคลุม หรือมีเศษหญ้าแห้ง ใบไม้แห้งปกคลุมอยู่ เช่น ดินตามซอกหิน ดินสวน ดินท้องนา ดินที่ใช้เพาะปลูกพืชไร่ รวมทั้งดินจอมปลวก ซึ่งมีอยู่ตามพื้นราบทั่วไป และตามบริเวณภูเขา

แยกเชื้อโดยนำตัวอย่างดินแห้ง ๑ กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ๙ มล. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ทิ้งไว้ประมาณ ๕ นาที นำส่วนที่เป็นน้ำใสมาทำให้เจือจางเป็น ๑:๑๐๐ ๑:๑๐๐๐ และ ๑:๑๐๐๐๐ ตามลำดับ แล้วไปเปตสารละลายดินแต่ละความเจือจาง ปริมาณ ๐.๐๕ มล. หยดลงบนอาหาร Potato-carrot extract agar และบนอาหาร Glycerol- asparagine agar เกลี่ยด้วยแท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว (spread plate technique) เพื่อให้เชื้อกระจายทั่ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน ๗-๑๐ วัน เลือกเก็บโคโลนีเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยนำไปเลี้ยงบน Yeast extract-malt extract agar slant เพื่อใช้ศึกษาขั้นต่อไป

๒. การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะขั้นต้น

นำเชื้อที่เพาะไว้บน Yeast extract-malt extract agar slant หนึ่งลูป เพาะลงในอาหารเหลว PY และ SS แต่ละชนิดซึ่งมีปริมาณ ๖๐ มล. ใน ฟลาสก์ ๒๕๐ มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ความเร็ว ๑๘๐ รอบต่อนาที อุณหภูมิ ๒๘ °ซ นาน ๓-๕ วัน

ทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของ fermentation broth โดยวิธี agar diffusion test (๑๑) การทดสอบนี้ใช้เชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ดังรายชื่อในตารางที่ ๒

ผสมเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร Nutrient agar (NA) และเชื้อยีสต์ในอาหาร Saburaud dextrose agar (SA) ที่หลอมเหลว และทำให้เย็นอุณหภูมิประมาณ ๔๕-๕๐ °ซ ดูดอาหารที่ผสมเชื้อใส่จานอาหารเส้นผ่าศูนย์กลาง ๑๐๐ มม. จานละ ๒๕ มล. ทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง นำ paper disc ที่ปราศจากเชื้อ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๖ มม.) ชุบ fermentation broth แล้ววางลงบนผิวอาหารที่มีเชื้อดังกล่าวให้ระยะห่างเท่าๆ กันจานละ ๕ หรือ ๖ discs แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ ๓๗ °ซ นาน ๑ - ๓ วัน

การตรวจสอบ fermentation broth ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ หากพบวงใส (inhibition zone) รอบ paper disc แสดงว่าเชื้อนั้นสร้างสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มม.) รวมเส้นผ่าศูนย์กลางของ disc ด้วย หากมีฤทธิ์เล็กน้อยให้อ่านผลเป็น ± และถ้าไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อให้อ่านผลเป็นลบ

๓. <u>การตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อ</u> ทำโดยอาศัยผลการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ ดังนี้

๓.๑ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ใช้เทคนิค simple inclined coverslip (๑๒) เพื่อดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ โดยนำ coverslip ที่ปราศจากเชื้อปักลงในจานอาหารวุ้น Yeast extract-malt extract agar ทำมุม ๔๕ องศา เขี่ยเชื้อจาก slant แตะลงบนผิววุ้นให้ทั่วบริเวณที่ coverslip สัมผัสกับวุ้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ๑๐-๑๔ วัน เชื้อจะเจริญทั้งบนอาหารและ coverslip นำ coverslip ที่มีเชื้อเจริญไปตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

๓.๒ ลักษณะทางการเจริญ เลี้ยงเชื้อบนอาหาร Yeast extract-Malt extract agar อาหาร Tyrosine agar และ Oatmeal agar (Difco) โดยวิธี crosshatch streak (๑๓) บนอาหารดังกล่าว บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๗-๑๔ วัน ตรวจผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านใต้ และวงควัตถุที่ละลายน้ำได้

๓.๓ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

การสลายแป้ง เลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มีแป้ง (inorganic salts-starch agar, ISP-4) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ๑๐ วัน ตรวจผลโดยราดไอโอดีนลงรอบโคโลนีของเชื้อ

ตารางที่ ๔ จุลินทรีย์ทดสอบ

Species	Strain designation	Medium
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	NA
Bacillus subtilis	ATCC 6633	NA
Pseudomonas aeruginosa	NCTC 10490	NA
Aeromonas hydrophila	JCM 2359	NA
Aeromonas sobria	JCM 2365	NA
Serratia marcescens	IAM 73060	NA
Escherichia coli	NIHJ JC-2	NA
Mycobacterium smegmatis	ATCC 607	NA+4% Glycerol
Candida albicans	IFO 0583	SA

ATCC, American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.

IAM, Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo, Japan

IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan

JCM, Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan.

NCTC, National Collection of Type Cultures, London, England.

NIHJ, National Institute of Health, Japan.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ้าเชื้อสลายแป้งได้จะเห็นวงใสรอบโคโลนีนั้น

การสลายไคติน เลี้ยงเชื้อบนอาหาร Colloidal chitin agar บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๒๑ วัน ตรวจผลโดยสังเกตวงใสรอบโคโลนี ถ้าเชื้อมีเอนไซม์ไคตินเนสจะเห็นวงใสดังกล่าว

การสลายเซลลูโลส เลี้ยงเชื้อบนกระดาษกรองที่แขวนอยู่ในสารละลาย Czapek ซึ่งปราศจากน้ำตาลซูโครสในหลอดทดสอบ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๒๑ วัน หากมีการสลายกระดาษกรองจะหลุดไป แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์เซลลูโลสได้

การสลายโปรตีนในนม เลี้ยงเชื้อในอาหาร Skim milk broth บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๑๐-๑๔ วัน แล้วตรวจผลการตกตะกอนของนม และการสลายโปรตีนโดยเปลี่ยนน้ำนมเป็นสารละลายใส

การสลายเจลาติน เลี้ยงเชื้อใน Nutrient gelatin broth บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๒๑ วัน ตรวจผลโดยสังเกตการสูญเสียคุณสมบัติการแข็งตัวของเจลาติน เมื่อนำอาหารที่มีเชื้อเจริญไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ ๒๐ °ซ

การใช้แหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบนอาหาร ISP-9 ซึ่งมีกลูโคส กลีเซอรอล L -อะราบิโนส D-ไซโลส แมนนิตอล ฟรักโตส ซูโครส เมลิบิโอส แรมโนส และแรฟฟิโนส เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๑๐ วัน ตรวจผลโดยใช้การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคสเป็น positive control และ การเจริญบน basal medium เป็น negative control

๓.๔ การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM) เลี้ยงเชื้อบนจานอาหารวุ้น YM(ISP-2) บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ ๑๐-๑๔ วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว นำไป fix โดยใช้ ๒% osmium tetraoxide ใน ๑/๑๕ M-phosphate buffer (pH ๖.๘) และ ๒% glutaraldehyde ใน ๑/๑๕ M-phosphate buffer (pH ๖.๘) และทำ dehydration โดยนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อแช่ลงในสารละลาย ethanol ตามลำดับความเข้มข้น ครั้งละ ๑๕ นาที ดังนี้ คือ ความเข้มข้น ๕๐% ๑ ครั้ง ๗๐% ๑ ครั้ง ๘๐% ๓ ครั้ง ๙๐% ๑ ครั้ง ๙๕% ๑ ครั้ง และ ๑๐๐% ๒ ครั้ง (๑๔) นำตัวอย่างไปทำให้แห้งและทำ ion

sputtering โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วย SEM

๔. <u>การศึกษาสภาวะเหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ</u>

๔.๑ การเลือก seed medium ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะ เขี่ยเชื้อ A6-2, A25, SP5-1 และ A5-1 เชื้อละ ๑ ลูป ลงเลี้ยงในอาหาร GMP และ GSC ซึ่งบรรจุปริมาณ ๖๐ มล. ในฟลาสก์ ๒๕๐ มล. บ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว ๑๘๐ รอบต่อนาที ที่ ๒๘ °ซ นาน ๒ วัน ดูดเชื้อที่เจริญดีแล้วใส่หลอดจุกเกลียวที่ปราศจากเชื้อหลอดละ ๖ มล. นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเส้นใย หากเชื้อเจริญดีจะสร้างเส้นใยมากสังเกตจากการตกตะกอนหลังจากหมุนเหวี่ยง เลือกอาหารที่เชื้อเจริญดีสำหรับเตรียม inoculum

๔.๒ การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบต่างกัน ใช้แหล่งคาร์บอนพวก starch sucrose glucose และ glycerol แหล่งไนโตรเจนพวก peptone beef extract soybean meal และ fish meal และธาตุอาหารอื่นๆ ดูรายละเอียด ในสูตรอาหาร PY SS FS และ SG (ภาคผนวก) เลี้ยงเชื้อ A6-2, A25, SP5-1 และ A5-1 ในอาหาร GSC เพื่อเตรียม inoculum นาน ๒ วัน (ข้อ ๔.๑) เพาะ inoculum ๑% ลงในอาหารที่มีองค์ประกอบต่างกันบรรจุปริมาณ ๑๒๐ มล. ในฟลาสก์ ๕๐๐ มล. เปรียบเทียบความสามารถผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อในสภาวะของอาหารที่มีระดับ pH 6-8 และบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว ๒๐๐ รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ ๒๘ °ซ , ๓๐ °ซ นาน ๓, ๕ หรือ ๗ วัน

ทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียพวก *S. aureus, B.subtilis* และเชื้อรา *Aspergillus niger* เช่นเดียวกับวิธีการที่อธิบายไว้ในข้อ ๒ การเตรียม fermentation broth เพื่อทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ หลังจากหมักเชื้อแล้วดูด fermentation broth ใส่หลอดจุกเกลียวที่ปราศจากเชื้อ ๖ มล./หลอด นำไปหมุนเหวี่ยง (๓๐๐๐ รอบ/นาที) เพื่อให้เส้นใยตกตะกอน และใช้ไมโครไปเปตดูด supernatant หยดลง paper disc (๘ มม.) ๕๐ µl/disc โดยเทคนิคปราศจากเชื้อ แล้วนำไปวางลงบนผิวอาหารที่ผสมเชื้อทดสอบ หากพบวงใส (inhibition zone) รอบ paper disc หลังการบ่มเชื้อ แสดงว่า fermentation broth ของเชื้อนั้นมีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์

๕. การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารหรือกลุ่มสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

นำ fermentation broth ประมาณ ๑๐ มล. ซึ่งหมุนเหวี่ยงเอาเส้นใยออก (๔๐๐๐ รอบต่อนาที) และกรองผ่าน filter unit แล้ว (Millex-HA, ๐.๔๕ μm) มาสกัดสารหรือกลุ่มสารปฏิชีวนะด้วย chloroform ๑๐ มล. และ ตามด้วย n-butanol ๑๐ มล. ใช้ Silica gel precoated plate GF_{245} เป็น stationary phase ใช้ Chloroform : Ethanol๖:๔ เป็น mobile phase และตรวจสอบภายใต้แสง UV (245 nm)

fermentation broth ที่นำไปตรวจสอบด้วย TLC ของเชื้อ A6-2 เลี้ยงในอาหาร FS (๓๕°ซ ๗ วัน) , เชื้อ A25 เลี้ยงในอาหาร PY (๓๐°ซ ๗ วัน), เชื้อ SP5-1 เลี้ยงในอาหาร PY (๒๘°ซ ๕ วัน) และเชื้อ A5-1 เลี้ยงในอาหาร PY (๓๐°ซ ๕ วัน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ ๕

ผลการทดลอง

๑. แหล่งของเชื้อและการแยกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ

เก็บตัวอย่างดินหลายตัวอย่างจากจังหวัดสุรินทร์ อุตรดิตถ์ สระบุรี สุโขทัย เพชรบุรี และชัยภูมิ นำมาแยกเชื้อโดยใช้อาหาร Potato-carrot extract agar(PCA) ได้เชื้อ actinomycetes ทั้งหมด ๔๔ ไอโซเลต และใช้อาหาร Glycerol-asparagine agar กับดินบางตัวอย่างเท่านั้น แยกได้เชื้อ ๓ ไอโซเลต (SG16-1, SG18 และ SG29-1) เก็บรักษาเชื้อเหล่านี้ไว้โดยเลี้ยงบน Yeast extract malt extract agar slant (YM)

๒. การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะขั้นต้น

ผลการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยสารปฏิชีวนะที่สร้างจากเชื้อที่แยกได้โดยหมักเชื้อในอาหารเหลว PY และ SS พบว่าเชื้อ ๑๘ ไอโซเลต ซึ่งเลี้ยงในอาหาร PY หรือ SS มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เชื้อ ๓๐ ไอโซเลต ซึ่งเลี้ยงในอาหาร PY และเชื้อ ๓๔ ไอโซเลต ซึ่งเลี้ยงในอาหาร SS มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และเชื้อที่มีฤทธิ์ฆ่า *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 ได้แก่ SP5-1, SP5-2,A5-1 และ A25 พบว่าเชื้อ SP5-1 และ SP5-2 มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Candida albican* ด้วย สารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแกรมลบพวก *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 , *Aeromonas hydrophila* JCM 2359 *Aeromonas sobria* JCM 2365 , *Serratia marcescens* IAM 73060 และ *Escherichia coli* NIHJ JC-2 เชื้อ SP16-5, SG29-1, A6-1 และ A22-1 ไม่แสดงฤทธิ์การฆ่าเชื้อใดเลย (ตารางที่ ๕)

ตารางที่ 5 การสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ โดยเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่

รหัสเชื้อ	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน (จังหวัด)	ชนิดของอาหาร	วงใสจากการยับยั้ง (มม.)								
			S. aureus	*B. subtilis*	*Ps. aeruginosa*	*A. hydrophila*	*A. sobria*	*Ser. marcescens*	*E. coli*	*My. smegmatis*	*C. albicans*
SP4-1	สุรินทร์	PY	0	20.6	0	0	0	0	0	0	0
		SS	9.2	12.4	0	0	0	0	0	0	0
SP5-1	สุรินทร์	PY	12.2	13.2	0	0	0	0	0	14.0	10.7
		SS	0	0	0	0	0	0	0	±	11.0
SP5-2	สุรินทร์	PY	12.4	18.4	0	0	±	0	0	24.0	11.8
		SS	0	0	0	0	0	0	0	±	11.1
SP7-1	สุรินทร์	PY	±	18.0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	14.7	0	0	0	0	0	0	0
SP16-5	อุตรดิตถ์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SG16-1	อุตรดิตถ์	PY	13.8	17.3	0	0	0	0	0	0	0
		SS	10.0	17.5	0	0	0	0	0	0	0
SG18	สระบุรี	PY	0	19.5	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SG29-1	สุโขทัย	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37-2	อุตรดิตถ์	PY	0	±	0	0	0	0	0	±	0
		SS	8.6	±	0	0	0	0	0	0	±
41-2	เพชรบุรี	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	9.1	9.6	0	0	0	0	0	0	0
A01	ชัยภูมิ	PY	0	18.5	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	±	0	0	0	0	0	0	0
A04-1	ชัยภูมิ	PY	0	12.8	0	0	0	0	0	0	0
		SS	11.5	13.4	0	0	0	0	0	0	0
A5-1	ชัยภูมิ	PY	16.5	26.5	0	0	0	0	0	21.6	0
		SS	0	23.4	0	±	0	0	±	20.0	0

ตารางที่ ๕ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน (จังหวัด)	ชนิดของอาหาร	วงใสจากการยับยั้ง (มม.)								
			S. aureus	*B. subtilis*	*Ps. aeruginosa*	*A. hydrophila*	*A. sobria*	*Ser. marcesceans*	*E. coli*	*My. smegmatis*	*C. albicans*
A6-1	ชัยภูมิ	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A6-2	ชัยภูมิ	PY	±	±	0	0	0	0	0	0	0
		SS	11.7	12.3	0	0	0	0	0	0	0
A6-3	ชัยภูมิ	PY	±	8.8	0	0	0	0	0	0	0
		SS	10.9	11.5	0	0	0	0	0	0	0
A8	ชัยภูมิ	PY	±	17.8	0	0	0	0	0	0	0
		SS	±	14.4	0	0	0	0	0	0	0
A10-1	ชัยภูมิ	PY	±	19.9	0	0	0	0	0	0	0
		SS	8.4	0	0	0	0	0	0	0	0
A11	ชัยภูมิ	PY	0	9.0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A16-3	ชัยภูมิ	PY	±	15.8	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	±	0	0	0	0	0	0	0
A18-2	ชัยภูมิ	PY	9.7	17.4	0	0	0	0	0	±	±
		SS	±	±	0	0	0	0	0	0	0
A21-1	ชัยภูมิ	PY	0	16.7	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A21-2	ชัยภูมิ	PY	0	±	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A22-1	ชัยภูมิ	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A25	ชัยภูมิ	PY	0	11.0	0	0	0	0	0	11.5	0
		SS	±	20.0	0	0	0	0	0	13.0	0

ตารางที่ ๕ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน (จังหวัด)	ชนิดของอาหาร	วงใสจากการยับยั้ง (มม.)								
			S. aureus	*B. subtilis*	*Ps. aeruginosa*	*A. hydrophila*	*A. sobria*	*Ser. marcescens*	*E. coli*	*My. smegmatis*	*C. albicans*
B1	ชัยภูมิ	PY	8.6	12.6	0	0	0	0	0	0	0
		SS	8.7	9.7	0	0	0	0	0	0	0
B2	ชัยภูมิ	PY	±	19.4	0	0	0	0	0	0	0
		SS	7.7	7.6	0	0	0	0	0	0	0
B3	ชัยภูมิ	PY	±	10.7	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	±	0	0	0	0	0	0	0
B4-2	ชัยภูมิ	PY	9.0	8.7	0	0	0	0	0	0	0
		SS	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0
B5-1	ชัยภูมิ	PY	0	8.6	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	9.4	0	0	0	0	0	0	0
B8	ชัยภูมิ	PY	±	7.7	0	0	0	0	0	0	0
		SS	9.2	8.0	0	0	0	0	0	0	0
B9	ชัยภูมิ	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	21	0	0	0	0	0	0	0
B11	ชัยภูมิ	PY	0	7.6	0	0	0	0	0	0	0
		SS	±	±	0	0	0	0	0	0	0
B21-1	ชัยภูมิ	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	±	±	0	0	0	0	0	0	0
B12-2	ชัยภูมิ	PY	0	10.7	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	10.7	0	0	0	0	0	0	0
B12-3	ชัยภูมิ	PY	±	8.6	0	0	0	0	0	0	0
		SS	±	16	0	0	0	0	0	0	0
A16-2	ชัยภูมิ	PY	9.4	13.3	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	0	0	0	0	±	0	0	0
C1-1	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	16	0	0	0	0	0	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๕ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน (จังหวัด)	ชนิดของอาหาร	วงใสจากการยับยั้ง (มม.)								
			S. aureus	*B. subtilis*	*Ps. aeruginosa*	*A. hydrophila*	*A. sobria*	*Ser. marcescens*	*E. coli*	*My. smegmatis*	*C. albicans*
C1-2	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	19	0	0	0	0	0	0	0
C2-1	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	21	0	0	0	0	0	0	0
C2-2	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	21	0	0	0	0	0	0	0
C3	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	18	0	0	0	0	0	0	0
C4-1	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	20	0	0	0	0	0	0	0
C5	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	±	0	0	0	0	0	0	0
C6-1	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	19	0	0	0	0	0	0	0
C6-2	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	19	0	0	0	0	0	0	0
C8	สุรินทร์	PY	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SS	0	20	0	0	0	0	0	0	0

๓. <u>การตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อ</u>

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ตารางที่ ๖) ลักษณะทางการเจริญ (ตารางที่ ๗) ลักษณะทางสรีรวิทยา (ตารางที่ ๘) และการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ (ตารางที่ ๙) สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้หลายสกุล (๕, ๗, ๘, ๑๐) ดังนี้

Micromonospora species : A6-2, A6-3, A16-2, A16-3, A21-2
A25, B 1, B 2, B 3, B 8
B 9, B 11, B12-1, B12-2, B12-3
C2-1, C2-2, C4-1, C6-2, C 8

Streptomyces species : SP4-1, SP5-1, SP5-2, SP16-5, SG16-1
41-2, A01, A04-1, A 8, A10-1
B4-2, B5-1, C1-1, C 3, C 5

Streptoverticillium species : A5-1

Actinoplanes species : A21-1, A22-1, C1-2

Nocardia species : SG18, SG29-1, A6-1

Unidentified group : 37-2, SP7-1, A11, A18-2, C6-1

นำเชื้อตัวแทนที่คัดเลือกไปศึกษาสภาวะเหมาะสมเพียง ๔ ไอโซเลต ได้แก่เชื้อ *Micromonospora* sp. A6-2 และ A25 เชื้อ *Streptomyces* sp. SP5-1 และ *Streptoverticilium* sp. A5-1

ลักษณะของโคโลนีของเชื้อทั้ง ๔ ไอโซเลต ซึ่งเลี้ยงบนอาหารวุ้น YM(ISP-2) แสดงไว้ในภาพที่ ๔ และภาพจาก Scanning Electron Microscope ของเชื้อ ๓ ไอโซเลต แสดงไว้ในภาพที่ ๕, ๖ และ ๗

ตารางที่ ๖ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่น บนอาหาร Yeast extract-malt extract agar (14 วัน)

รหัสเชื้อ	สายของสปอร์	รูปร่างสปอร์	สีของสปอร์	รงควัตถุ	ปฏิกิริยาของรงควัตถุต่อ	
					0.05 N HCl	0.05 N NaOH
SP4-1	ขดเกลียว	กลมรี	ม่วงอ่อน	น้ำตาลม่วง	-	-
SP5-1	ตรงหรือโค้ง	กลมรี	เทาขาว	เหลือง	-	-
SP5-2	ตรงหรือโค้ง	กลมรี	เทาขาว	เหลือง	-	-
SP7-1	ตรงหรือโค้ง	กลม	ขาว	น้ำตาล	-	-
SP16-5	ตรงหรือโค้ง	กลมรี	เทาเข้ม	-		
SG16-1	ขดเกลียว	กลมรี	เทา	เหลือง	-	-
SG18	ตรง	กลมรี	ส้มปนขาว	-		
SG29-1	ตรงหรือโค้ง	กลม	ขาว	-		
37-2	โค้ง	กลมรี	เทาเข้ม	น้ำตาล	-	-
41-2	ตรงหรือโค้ง	กลมรี	ม่วงอ่อน	น้ำตาลม่วง	-	-
A01	โค้ง	กลมรี	เนื้อ	-		
A04-1	ขดเกลียว	กลมรี	ม่วงอ่อน	น้ำตาล	-	-
A5-1	ตรง	กลม	ขาวปนส้ม	น้ำตาลเหลือง	-	-
A6-1	ตรงหรือโค้ง	กลมรี	ขาวส้ม	-		
A6-2	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำเขียว	น้ำตาลม่วง	-	-
A6-3	สปอร์เดี่ยว	กลมรี	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-	-
A8	รูปขอ	กลม	เทา	-		
A10-1	รูปขอ	กลมรี	เทา	น้ำตาลเข้ม	-	-
A11	พบเส้นใย	-	-	-		
A16-3	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำเขียว	น้ำตาล	-	-
A18-2	พบเส้นใย	-	-	น้ำตาลม่วง	-	-
A21-1	คล้ายสปอร์แรงเจียม	กลม	น้ำตาล	น้ำตาลม่วง	-	-
A21-2	สปอร์เดี่ยว	กลม	น้ำตาลดำ	น้ำตาลม่วง	-	-
A22-1	คล้ายสปอร์แรงเจียม	กลม	น้ำตาล	-		
A25	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำเขียว	น้ำตาลม่วง	-	-

ตารางที่ ๖ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สายของสปอร์	รูปร่างสปอร์	สีของสปอร์	รงควัตถุ	ปฏิกิริยาของรงควัตถุต่อ	
					0.05 N HCl	0.05 N NaOH
B1	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำม่วง	-		
B2	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำ	ดำม่วง	-	-
B3	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำ	-		
B4-2	ตรง	กลมรี	เนื้อ	เหลืองส้ม	-	-
B5-1	ขดเกลียว	กลม	เทาขาว	-		
B8	สปอร์เดี่ยว	กลม	ม่วง	-		
B9	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำ	-		
B11	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำ	-		
B12-1	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำ	ม่วงดำ	-	-
B12-2	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำ	-		
B12-3	สปอร์เดี่ยว	กลม	น้ำตาล	น้ำตาล	-	-
A16-2	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำน้ำตาล	-		
C1-1	ตรงหรือโค้ง	กลมรี	ขาว	-		
C1-2	สปอร์แรงเจียม	กลม	ขาว	-		
C2-1	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำ	-		
C2-2	สปอร์เดี่ยว	กลม	ขาว	-		
C3	ตรงหรือโค้ง	กลมรี	เทา	-		
C4-1	สปอร์เดี่ยว	กลม	น้ำตาลส้ม	-		
C5	ขดเกลียว	กลม	ขาวเทา	-		
C6-1	ตรงหรือโค้ง	กลมรี	ชมพู	-		
C6-2	สปอร์เดี่ยว	กลม	ดำ	-		
C8	สปอร์เดี่ยว	กลม	น้ำตาลส้ม	-		

ตารางที่ ๗ ลักษณะทางการเจริญของเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่น

รหัสเชื้อ	ชนิดของอาหาร	ลักษณะของโคโลนี			
		การเจริญ	เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านใต้	รงควัตถุที่ละลายได้
SP4-1	YM	ดี	แห้ง น้ำตาลม่วง	น้ำตาล	น้ำตาลม่วง
	Tyrosine	ดี	แห้ง แดง	แดง	แดง
	Oatmeal	ดี	แห้ง ชมพู	แดง	แดง
SP5-1	YM	ดี	แห้ง ครีมขาว	เขียวอมเหลือง	เหลือง
	Tyrosine	ดี	แห้ง ครีมเทา	เขียวอมเหลือง	เหลือง
	Oatmeal	ดี	แห้ง ครีมเทา	เขียวอมเหลือง	-
SP5-2	YM	ดี	แห้ง ครีมขาว	เขียวอมเหลือง	เหลือง
	Tyrosine	ดี	แห้ง ครีมเทา	น้ำตาลอมเขียว	เหลือง
	Oatmeal	ดี	แห้ง ครีมเทา	น้ำตาลอมเขียว	-
SP7-1	YM	ดี	แห้ง เหลืองอ่อน	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาล
	Tyrosine	ดี	แห้ง เหลืองชมพู	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาล
	Oatmeal	ปานกลาง	แห้ง น้ำตาลอ่อน	น้ำตาล	น้ำตาลแดง
SP16-5	YM	ดี	แห้ง ครีม	เหลืองอมน้ำตาล	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง ครีมขาว	เหลืองอมน้ำตาล	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง ครีมเหลือง	เหลืองส้ม	-
SG16-1	YM	ดี	แห้ง ครีม	เหลืองอมเขียว	เหลือง
	Tyrosine	ดี	แห้ง ครีม	เหลืองอมเขียว	เหลืองส้ม
	Oatmeal	ดี	แห้ง ครีม	เหลือง	เหลือง
SG18	YM	ดี	แห้ง ส้มขาว	เหลืองส้ม	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง ส้ม	ส้ม	-
	Oatmeal	ปานกลาง	แห้ง ส้ม	ส้ม	-

ตารางที่ ๗ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของอาหาร	ลักษณะของโคโลนี			
		การเจริญ	เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านใต้	รงควัตถุที่ละลายได้
SG29-1	YM	ดี	แห้ง เนื้อ	เหลือง	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง เหลืองอมน้ำตาล	เหลืองอมน้ำตาล	เหลืองอมน้ำตาล
	Oatmeal	ปานกลาง	แห้ง ขาว	ขาวอมเหลือง	-
37-2	YM	ดี	แห้ง ขาว	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาล
	Tyrosine	ดี	แห้ง น้ำตาลอ่อน	น้ำตาลอ่อน	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง เทา	น้ำตาลดำ	-
41-2	YM	ดี	แห้ง น้ำตาลอ่อน	น้ำตาล	น้ำตาลม่วง
	Tyrosine	ดี	แห้ง น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง
	Oatmeal	ดี	แห้ง(มีหยดน้ำ) แดง	ชมพู	แดง
A01	YM	ดี	ชื้นน้อย เหลืองอมน้ำตาล	เหลืองอมน้ำตาล	-
	Tyrosine	ดี	ชื้นน้อย ครีม	ครีม	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง เนื้อ	เนื้อ	-
A04-1	YM	ดี	แห้ง ม่วง	ม่วงน้ำตาล	ม่วงน้ำตาล
	Tyrosine	ดี	แห้ง ม่วงแดง	ม่วงแดง	ม่วงแดง(จาง)
	Oatmeal	ดี	แห้ง(มีหยดน้ำ) ชมพู	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง
A5-1	YM	ดี	แห้ง ครีม	ครีมปนส้ม	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง ชมพูขาว	ชมพูขาว	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง แดง	แดง	-
A6-1	YM	ดี	แห้ง ส้ม	ส้ม	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง ส้ม	ส้ม	เหลืองส้ม
	Oatmeal	ปานกลาง	แห้ง เนื้อ	เนื้อ	-

ตารางที่ ๙ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของอาหาร	ลักษณะของโคโลนี			
		การเจริญ	เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านใต้	รงควัตถุที่ละลายได้
A6-2	YM	ดี	ชื้น น้ำตาลม่วง	น้ำตาลม่วง	น้ำตาล
	Tyrosine	ปานกลาง	ชื้น น้ำตาลส้ม	น้ำตาลส้ม	-
	Oatmeal	ดี	ชื้น น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
A6-3	YM	ดี	ชื้น ม่วง	ม่วง	ม่วง
	Tyrosine	ปานกลาง	ชื้น น้ำตาลส้ม	น้ำตาลส้ม	-
	Oatmeal	ดี	ชื้น น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
A8	YM	ดี	ชื้นน้อย ครีม	ครีม	-
	Tyrosine	ดี	ชื้นน้อย ขาวอมเขียว	เหลืองน้ำตาล	เหลืองน้ำตาล
	Oatmeal	ดี	แห้ง เทา	เทา	-
A10-1	YM	ดี	แห้ง น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม
	Tyrosine	ดี	แห้ง ดำน้ำตาล	ดำน้ำตาล	ดำ
	Oatmeal	ดี	แห้ง เทาขาว	เหลืองอมเขียว	เหลืองอมเขียว
A11	YM	ดี	ชื้นน้อย ส้ม	ส้ม	-
	Tyrosine	ปานกลาง	แห้ง เนื้อ	เนื้อ	ส้มจาง
	Oatmeal	ปานกลาง	แห้ง เนื้อ	เนื้อ	-
A16-3	YM	ดี	ชื้น ดำน้ำตาล	ดำน้ำตาล	น้ำตาล
	Tyrosine	ปานกลาง	ชื้นน้อย น้ำตาล	น้ำตาล	-
	Oatmeal	ดี	ชื้น น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
A18-2	YM	ปานกลาง	ชื้นน้อย ส้ม	ส้ม	-
	Tyrosine	ปานกลาง	ชื้นน้อย น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล
	Oatmeal	ดี	ชื้นน้อย น้ำตาล	น้ำตาล	-

ตารางที่ ๙ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของอาหาร	ลักษณะของโคโลนี				
		การเจริญ	เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน		สีของโคโลนีด้านใต้	รงควัตถุที่ละลายได้
A21-1	YM	ปานกลาง	ขึ้นน้อย	น้ำตาลส้ม	น้ำตาลส้ม	น้ำตาล
	Tyrosine	ปานกลาง	ขึ้นน้อย	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล
	Oatmeal	ดี	ขึ้นน้อย	น้ำตาล	น้ำตาล	-
A21-2	YM	ปานกลาง	ขึ้น	ดำม่วง	ดำม่วง	ม่วง
	Tyrosine	ปานกลาง	ขึ้น	ดำส้ม	ดำส้ม	-
	Oatmeal	ปานกลาง	ขึ้น	ม่วงดำ	ม่วงดำ	-
A22-1	YM	ดี	แห้ง	เหลืองเขียว	เหลืองเขียว	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง	น้ำตาลส้ม	น้ำตาลส้ม	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง	เหลืองส้ม	เหลืองส้ม	-
A25	YM	ดี	ขึ้น	ดำเขียว	ดำเขียว	-
	Tyrosine	ปานกลาง	ขึ้น	ส้มดำ	ส้มดำ	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้น	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-

หมายเหตุ YM = Yeast extract - Malt extract agar

Tyrosine = Tyrosine agar

Oatmeal = Oatmeal agar (Difco)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๗ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของอาหาร	ลักษณะของโคโลนี				
		การเจริญ	เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน		สีของโคโลนีด้านใต้	รงควัตถุที่ละลายได้
B1	YM	ดี	ขึ้นน้อย	ดำม่วง	ดำ	-
	Tyrosine	ดี	ขึ้นน้อย	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้นน้อย	น้ำตาล	น้ำตาล	-
B2	YM	ดี	ขึ้นน้อย	ดำม่วง	ดำ	ดำม่วง
	Tyrosine	ดี	ขึ้นน้อย	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	ดำ
	Oatmeal	ดี	ขึ้นน้อย	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
B3	YM	ดี	ขึ้น	ดำ	ดำ	-
	Tyrosine	ดี	ขึ้น	ดำ	ดำ	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้น	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
B4-2	YM	ดี	แห้ง	ส้ม	ส้มเข้ม	เหลืองส้ม
	Tyrosine	ดี	แห้ง	ส้ม	ส้มแดง	เหลืองส้ม
	Oatmeal	ดี	แห้ง	ส้ม	ส้ม	-
B5-1	YM	ดี	แห้ง	เทา	เหลืองน้ำตาล	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง	เทาขาว	เหลืองน้ำตาล	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง	เทา	น้ำตาล	-
B8	YM	ดี	ขึ้น	ม่วง	ม่วงอมน้ำตาล	-
	Tyrosine	ดี	ขึ้น	ม่วงอมน้ำตาล	ม่วงอมน้ำตาล	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้น	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
B9	YM	ดี	ขึ้น	ส้มอมดำ	น้ำตาลอมเขียว	-
	Tyrosine	ดี	ขึ้น	เหลืองส้ม	เหลืองส้ม	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้น	ส้มอมดำ	ดำ	-

ตารางที่ ๗ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของอาหาร	ลักษณะของโคโลนี				
		การเจริญ	เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน		สีของโคโลนีด้านใต้	รงควัตถุที่ละลายได้
B11	YM	ดี	ขึ้นน้อย	ดำส้ม	ดำส้ม	-
	Tyrosine	ดี	ขึ้น	น้ำตาลส้ม	น้ำตาลส้ม	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้น	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
B12-1	YM	ดี	ขึ้นน้อย	ดำ	ดำ	ม่วงดำ
	Tyrosine	ดี	ขึ้นน้อย	ส้มดำ	ส้มดำ	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้น	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
B12-2	YM	ดี	ขึ้นน้อย	ดำ	ดำ	-
	Tyrosine	ดี	ขึ้นน้อย	ส้มดำ	ส้มดำ	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้นน้อย	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
B12-3	YM	ดี	ขึ้น	น้ำตาลส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล
	Tyrosine	น้อย	ขึ้นน้อย	น้ำตาล	น้ำตาล	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้น	น้ำตาลส้ม	น้ำตาลส้ม	-
A16-2	YM	ดี	ขึ้น	ดำม่วง	ดำ	-
	Tyrosine	ดี	ขึ้นน้อย	น้ำตาลม่วง	น้ำตาลม่วง	-
	Oatmeal	ดี	ขึ้น	น้ำตาลดำ	น้ำตาลดำ	-
C1-1	YM	ดี	แห้ง	ส้มอมขาว	ส้ม	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง	น้ำตาลเหลือง	น้ำตาลเหลือง	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง	เนื้อ	ส้ม	-
C1-2	YM	ดี	ขึ้น	แดง	ส้มแดง	-
	Tyrosine	ปานกลาง	แห้ง	เนื้อ	เนื้อ	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง	แดง	แดง	-

ตารางที่ ๙ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของอาหาร	ลักษณะของโคโลนี				
		การเจริญ	เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน		สีของโคโลนีด้านใต้	รงควัตถุที่ละลายได้
C2-1	YM	ดี	ชื้น	น้ำตาลส้ม	น้ำตาล	-
	Tyrosine	ดี	ชื้น	เหลืองส้ม	เหลืองส้ม	-
	Oatmeal	ดี	ชื้น	น้ำตาลส้ม	น้ำตาล	-
C2-2	YM	ปานกลาง	แห้ง	ครีม	ครีม	-
	Tyrosine	ปานกลาง	แห้ง	ครีมอมเหลือง	ครีม	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง	ขาว	ขาว	-
C3	YM	ดี	แห้ง	น้ำตาลเทา	น้ำตาล	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง	เทา	เทา	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง	น้ำตาลขาว	น้ำตาลดำ	-
C4-1	YM	ดี	ชื้นน้อย	เหลืองส้ม	เหลืองส้ม	-
	Tyrosine	ปานกลาง	ชื้นน้อย	ส้ม	เหลืองส้ม	-
	Oatmeal	ดี	ชื้นน้อย	เหลืองส้ม	ส้ม	-
C5	YM	ดี	แห้ง	น้ำตาล	น้ำตาล	-
	Tyrosine	ดี	แห้ง	เทา	เทา	-
	Oatmeal	ดี	แห้ง	น้ำตาลเทา	น้ำตาล	-
C6-1	YM	ดี	ชื้นน้อย	ส้มอมขาว	ส้ม	-
	Tyrosine	ปานกลาง	แห้ง	ส้มแดงอมขาว	ส้ม	-
	Oatmeal					
C6-2	YM	ดี	ชื้น	ดำ	ดำ	-
	Tyrosine	ดี	ชื้น	ส้มดำ	ส้มดำ	-
	Oatmeal	ดี	ชื้น	น้ำตาลดำ	ดำ	-

ตารางที่ ๙ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ชนิดของอาหาร	ลักษณะของโคโลนี				
		การเจริญ	เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน		สีของโคโลนีด้านใต้	รงควัตถุที่ละลายได้
C8	YM	ดี	ขึ้นน้อย	น้ำตาลส้ม	น้ำตาลส้ม	-
	Tyrosine	ดี	ขึ้นน้อย	เหลืองส้ม	เหลืองส้ม	
	Oatmeal	ดี	ขึ้นน้อย	เนื้ออมส้ม	เนื้ออมส้ม	-

หมายเหตุ YM = Yeast extract - Malt extract agar

Tyrosine = Tyrosine agar

Oatmeal = Oatmeal agar (Difco)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๙

รหัสเชื้อ	Starch	Chitin	Cellulose	Gelatin	Skim milk	
					Coa	Pep.
SP4-1	+	-	-	+	+	-
SP5-1	+	-	-	±	-	-
SP5-2	+	-	-	±	-	-
SP7-1	+	-	-	+	-	+
SP16-5	+	-	-	+	-	+
SG16-1	+	-	-	+	+	±
SG18	-	-	-	+	-	-
SG29-1	-	-	-	+	-	-
37-2	-	-	-	+	-	+
41-2	+	-	-	+	-	+
A01	±	-	-	+	-	±
A04-1	+	-	-	+	-	-
A5-1	+	-	-	+	-	+
A6-1	-	-	-	+	-	-
A6-2	±	-	-	+	-	±
A6-3	+	-	-	+	-	±
A8	+	-	-	+	+	-
A10-1	-	-	-	+	+	+
A11	-	-	-	-	-	-
A16-3	±	-	-	+	-	+
A18-2	±	-	-	+	-	-
A21-1	+	-	-	-	-	-
A21-2	+	-	-	+	-	-
A22-1	+	-	-	+	-	-
A25	+	-	-	+	-	±

+, แสดงปฏิกิริยา; ±, แสดงปฏิกิริยาเล็กน้อย; -, ไม่แสดงปฏิกิริยา

Coa, Coagulation ; Pep., peptonization

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๙ ลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่น

รหัสเชื้อ	Starch	Chitin	Cellulose	Gelatin	Skim milk	
					Coa	Pep.
B1	-	-	-	+	-	-
B2	+	-	-	±	-	-
B3	±	-	-	+	-	-
B4-2	-	±	-	+	+	±
B5-1	+	-	-	±	+	-
B8	+	-	-	+	-	-
B9	+	-	-	+	-	-
B11	+	-	-	-	-	-
B12-1	±	-	-	+	-	-
B12-2	+	-	-	+	-	±
B12-3	-	-	-	+	-	-
A16-2	±	-	-	+	-	-
C1-1	-	-	-	+	-	-
C1-2	+	-	-	+	-	-
C2-1	+	-	-	+	+	±
C2-2	-	-	-	+	-	-
C3	+	-	-	+	-	-
C4-1	+	-	-	+	-	-
C5	+	-	-	+	-	-
C6-1	-	-	-	+	-	-
C6-2	+	-	-	+	-	+
C8	+	-	-	±	-	-

+, แสดงปฏิกิริยา; ±, แสดงปฏิกิริยาเล็กน้อย; -, ไม่แสดงปฏิกิริยา

Coa, Coagulation; Pep., peptonization

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๙ การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่น

รหัสเชื้อ	Glucose	Glycerol	L-Arabinose	D-Xylose	Mannitol	Fructose	Sucrose	Melibiose	Rhamnose	Raffinose
SP4-1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
SP5-1	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
SP5-2	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
SP7-1	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
SP16-5	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
SG16-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SG18	+	+	±	+	±	+	+	+	±	±
SG29-1	+	+	±	±	+	+	+	±	±	±
37-2	+	+	-	-	+	+	+	+	±	±
41-2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A01	+	+	±	±	±	+	±	±	-	-
A04-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A5-1	+	+	+	+	+	+	±	+	±	-
A6-1	+	+	±	+	+	+	+	+	±	+
A6-2	+	+	-	+	±	±	+	+	±	-
A6-3	+	+	±	+	±	±	±	+	±	-
A8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
A10-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A11	+	+	+	±	+	+	+	+	+	±
A16-3	+	±	+	+	+	+	+	+	-	±
A18-2	+	-	-	+	+	+	±	-	-	±
A21-1	+	±	+	+	+	+	±	+	-	±
A21-2	+	-	-	-	±	±	±	-	-	±
A22-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A25	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+

+, ใช้ได้ดี ; ±, ใช้ได้เล็กน้อย ; -, ไม่ใช้

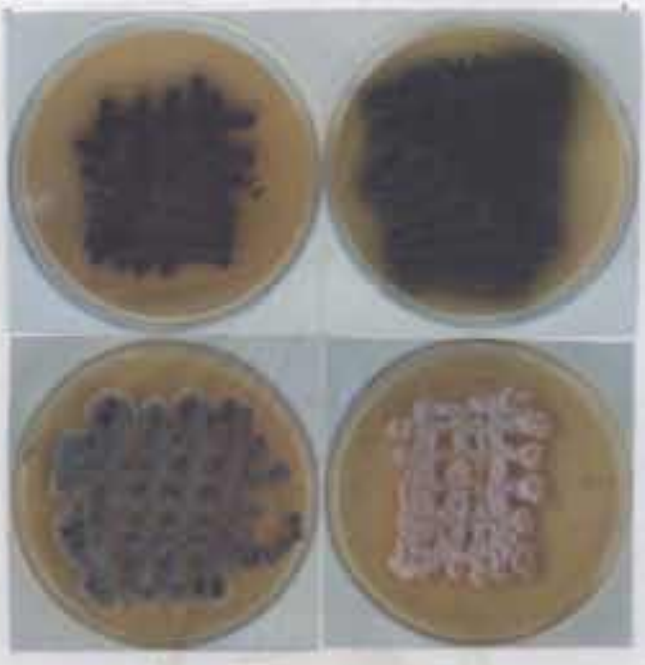
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๙ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	Glucose	Glycerol	L-Arabinose	D-Xylose	Mannitol	Fructose	Sucrose	Melibiose	Rhamnose	Raffinose
B1	+	+	-	±	±	±	+	±	-	-
B2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	±	±	-	-	-	-	±	±	-	±
B4-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B5-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
B8	+	+	+	±	+	+	+	+	±	+
B9	+	+	±	±	+	+	+	+	±	+
B11	+	-	-	-	±	±	±	+	-	-
B12-1	+	±	±	±	±	+	±	+	-	+
B12-2	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
B12-3	+	±	-	-	±	+	±	-	-	-
A16-2	+	±	+	+	±	+	±	±	+	+
C1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1-2	+	±	+	±	+	+	+	+	+	-
C2-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2-2	+	+	±	-	±	±	+	+	+	±
C3	+	-	+	-	-	-	±	-	-	-
C4-1	-	-	+	±	+	-	+	+	+	-
C5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C6-1	+	±	+	+	±	±	±	±	+	±
C6-2	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
C8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, ใช้ได้ดี ; ±, ใช้ได้เล็กน้อย ; -, ไม่ใช้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ ๕ ลักษณะโคโลนีของเชื้อตัวแทนที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งเลี้ยงบนอาหารวุ้น YM(ISP-2) ที่ ๓๐ °ซ.

๑. Micromonospora sp. A6-2 (อายุ ๑๐ วัน)

๒. Micromonospora sp. A25 (อายุ ๑๐ วัน)

๓. Streptomyces sp. SP5-1 (อายุ ๑๔ วัน)

๔. Streptoverticilium sp. A5-1 (อายุ ๑๐ วัน)

จากภาพการทำ scanning พบว่า สปอร์ของเชื้อ *Micromonospora* sp.A6-2 และ A25 มีลักษณะรูปร่างกลมอยู่เดี่ยวๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ ๐.๘ μm ผิวไม่เรียบ (irregular) แต่ถ้าสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ (oil immersion) จะเห็นสปอร์ผิวเรียบ ส่วนเชื้อ *Streptomyces* sp.SP5-1 ลักษณะสปอร์เป็นแท่งสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ ๐.๗ × ๑.๓ μm ผิวเรียบ แต่ถ้าสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ (oil immersion) จะเห็นรูปร่างคล้ายกลมรี

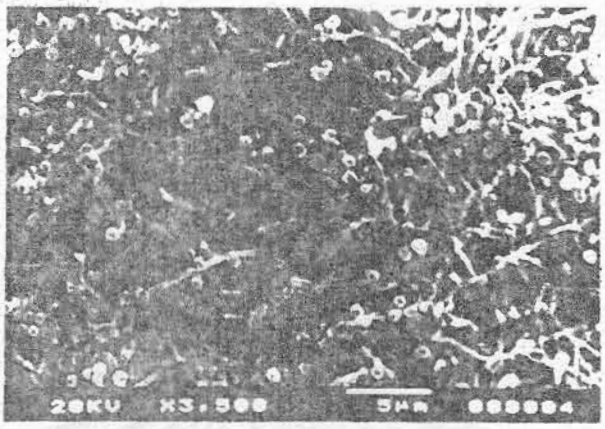
๔. <u>การศึกษาสภาวะเหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ</u>

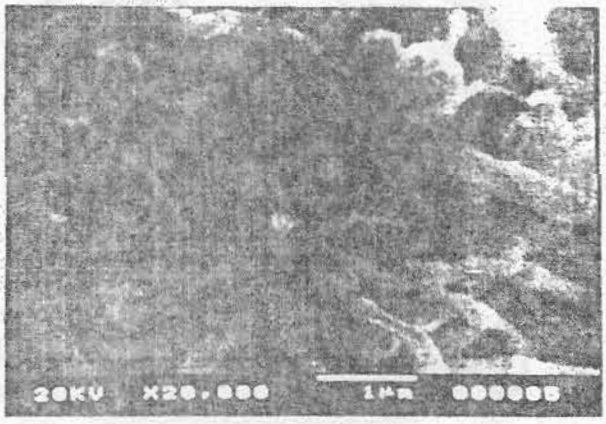
พบว่า การเจริญของเชื้อทั้ง ๔ ไอโซเลตในอาหาร GMP (ตารางที่ ๑๐) เชื้อ SP5-1 เจริญได้ดี แต่เชื้อ A25 และ A5-1 เจริญปานกลาง ส่วนเชื้อ A6-2 เจริญเพียงเล็กน้อย และเชื้อทั้ง ๔ ไอโซเลตเจริญได้ดีในอาหาร GSC ดังนั้นจึงเลือกอาหารนี้เป็น seed medium เพื่อใช้เตรียม inoculum ตารางที่ ๑๐-๑๑ ยังแสดงถึงการเจริญของเชื้อทั้ง ๔ ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหาร PY และ SS โดยใช้ seed culture ๑%

ผลการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *B.subtilis* ATCC 6633 ของสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตโดยเชื้อทั้ง ๔ ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว PY และ SS ที่ระดับ pH ต่างกัน บ่มไว้ที่ ๒๘ °ซ พบว่า การเลี้ยงในอาหาร PY ที่ pH ๗.๔๔ เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีกว่าที่ระดับ pH อื่นและการเลี้ยงในอาหารชนิดนี้จะให้ผลดีกว่า อาหาร SS (ตารางที่ ๑๒) การเลี้ยงในอาหาร FS และ SG ให้ผลการฆ่าเชื้อไม่ดีนัก (ตารางที่ ๑๓)

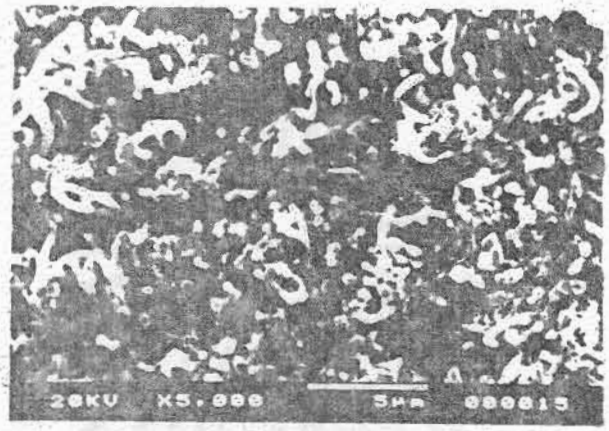
ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *S.aureus* ATCC 25923 และ *B.subtilis* ATCC 6633 ของสารปฏิชีวนะเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร PY บ่มไว้ที่ ๑๐ °ซ พบว่าเชื้อ A6-2 และ A25 ให้ผลไม่ดี (ตารางที่ ๑๔) การเลี้ยงเชื้อในอาหาร FS บ่มไว้ที่ ๓๕ °ซ. ๕-๗ วัน พบว่า fermentation broth ของเชื้อ A25 ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อทั้งสอง (ตารางที่ ๑๕)

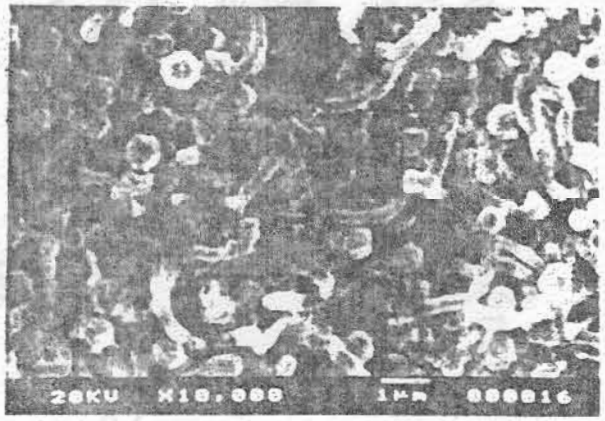
ด้วยเหตุที่เชื้อ *Micromonospora* sp,A6-2และ A25 ผลิตสารปฏิชีวนะได้ไม่เป็นที่พอใจ (ตารางที่ ๑๒-๑๕) จึงลองเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนของอาหาร SG จากเดิม starch ๑% เป็น starch ๒% และเดิมไม่มี glucose จึงเพิ่ม glucose ๐.๕% ลงในอาหาร (SG-1)





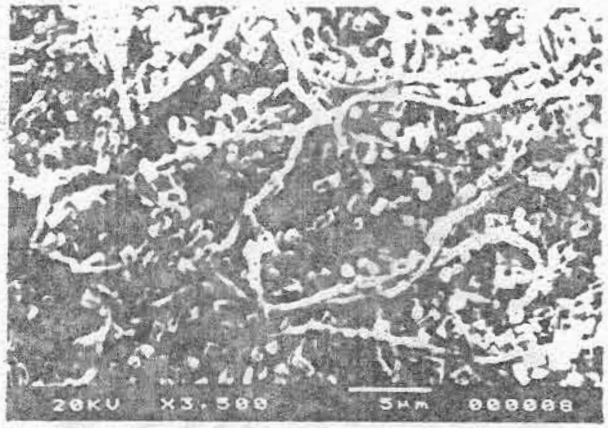
ภาพที่ ๕ (บนและล่าง) Scanning electron micrograph ของเชื้อ *Micromonospora* sp.A6-2 เลี้ยงบนอาหารวุ้น YM (ISP-2) ที่๓๐°ซ. อายุ ๑๐ วัน

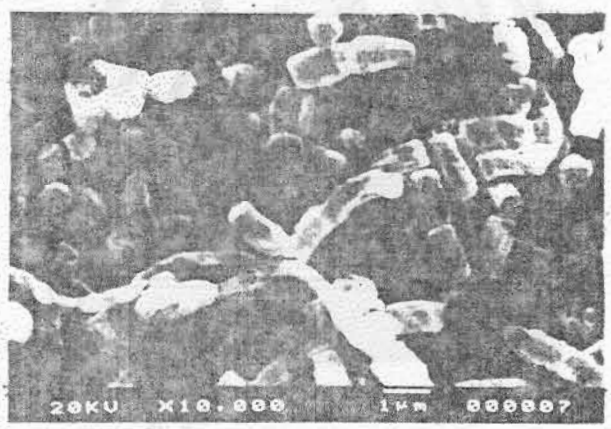




สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ ๖ (บนและล่าง) Scanning electron micrograph ของเชื้อ *Micromonospora* sp. A25 เลี้ยงบนอาหารวุ้น YM(ISP-2) ที่ ๓๐ °ซ อายุ ๑๐ วัน





ภาพที่ ๙ (บนและล่าง) Scanning electron micrograph ของเชื้อ *Streptomyces* sp. SP5-1 เลี้ยงบนอาหารวุ้น YM (ISP-2) ที่ ๓๐ °ซ อายุ ๑๔ วัน

ตารางที่ ๑๐ การเจริญของเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว PY และ SS เมื่อใช้ seed culture ๑% ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว GMP

รหัสเชื้อ	ระยะเวลา (วัน)	การเจริญในอาหาร GMP	PY (pH 7.84)	SS (pH 7.0)
A6-2	2	+		
	3		+	++
	5		++	+++
A25	2	++		
	3		++	+++
	5		+++	++++
SP5-1	2	+++		
	3		++	+++
	5		+++	+++
A5-1	2	++		
	3		+++	++++
	5		++++	++++

++++, เจริญดีมาก ; +++, เจริญดี ; ++, เจริญปานกลาง ; +, เจริญเล็กน้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑๑ การเจริญของเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว PY และ SS เมื่อใช้ seed culture ๑% ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว GSC

รหัสเชื้อ	ระยะเวลา (วัน)	การเจริญในอาหาร GSC	PY (pH 8.02)	SS (pH 6.65)
A6-2	2	+++		
	3		++	++++
	5		+++	++++
A25	2	+++		
	3		++	+++
	5		+++	++++
SP5-1	2	+++		
	3		+++	++++
	5		+++	++++
A5-1	2	+++		
	3		++++	++++
	5		++++	++++

++++, เจริญดีมาก ; +++, เจริญดี; ++, เจริญปานกลาง; +, เจริญเล็กน้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑๒ ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *B. subtilis* ของสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PY และ SS ระดับ pH ต่างกันที่ ๒๘ °ซ.

รหัสเชื้อ	ระยะเวลา (วัน)	inhibition zone (mm)					
		PY			SS		
		(6.77	7.84	8.02)	(6.65	7.0	7.65
A6-2	3	0	12.3	0	±	±	±
	5	0	12.4	±	±	±	8.5
		(6.41)					
A25	3	0	12.0	0	0	0	0
	5	0	12.2	0	±	0	0
		(6.50)					
SP5-1	3	0	9.2	0	0	0	0
	5	0	9.6	±	±	0	0
A5-1	3	NT	12.5 / 26.3*	12.6 / 20.4*	0	10.3	0
	5	NT	12.8 / 27.2*	16.8 / 21.1*	9.1 / 14.4*	16.0	10.2

±, มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเล็กน้อย; NT, not test * วงใสรอบนอก

ตารางที่ ๑๓ ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *B.subtilis* ของสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว FS และ SG ระดับ pH ต่างกันที่ ๒๘ °ซ.

รหัสเชื้อ	ระยะเวลา (วัน)	inhibition zone (mm)			
		(7.20 FS	7.55)	(7.16 SG	7.97)
A6-2	3	8.4	0	8.3	0
	5	8.5	8.2	9.1	0
A25	3	±	0	±	±
	5	0	0	0	0
SP5-1	3	±	8.4	±	0
	5	0	8.9	0	0
A5-1	3	8.3* 11.7	NT	NT	NT
	5	11.3* 13.1	NT	NT	NT

±, มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเล็กน้อย ; NT, not test * วงใสรอบนอก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑๔ ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *S.aureus* และ *B.subtilis* ของสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว PY (pH7.9)ที่ ๓๐ °ซ

รหัสเชื้อ	ระยะเวลา (วัน)	inhibition zone (mm)	
		S.aureus	*B.subtilis*
A6-2	5	0	17.1 (จาง)
	7	0	0
A25	5	0	±
	7	14.4	0
SP5-1	5	10.0	13.3
	7	0	13.4
A5-1	5	14.0	16.6
	7	15.7	19.2
		19.4*	25.4*

±, มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเล็กน้อย * วงใสรอบนอก

ตารางที่ ๑๕ ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *S.aureus* และ *B.subtilis* ของสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว FS (pH 7.27) ที่ ๓๕ °ซ.

รหัสเชื้อ	ระยะเวลา (วัน)	inhibition zone (mm)	
		S.aureus	*B.subtilis*
A6-2	5	9.3	9.5
	7	8.7	8.7
A25	5	0	0
	7	0	0
SP5-1	5	0	10.6
	7	0	8.4
A5-1	5	0	9.3
	7	9.6	10.9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากเลี้ยงเชื้อทั้งสองที่ ๑๐ °ซ. นาน ๕-๗ วัน และทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อ พบว่าสารปฏิชีวนะจากเชื้อ A6-2 มีฤทธิ์แตกต่างจากเดิมไม่มาก แต่เชื้อ A25 ให้ผลดีขึ้น (ตารางที่ ๑๖)

ผลการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อรา *Aspergillus niger* เมื่อนำ fermentation broth ซึ่งเลี้ยงเชื้อ A6-2, A25, SP5-1 และ A5-1 ในอาหาร PY (๕ วัน) มาทดสอบ พบว่าไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราชนิดนี้ การเลี้ยงเชื้อ A6-2 และ A25 ในอาหาร FS (๗ วัน) ก็ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อนี้เช่นเดียวกัน

๕. การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารหรือกลุ่มสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้น โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

พบว่ากลุ่มสารปฏิชีวนะที่นำมาทดลองนี้ มีสภาพของข้ัวอยู่ในเกณฑ์ปานกลางกล่าวคือ เมื่อใช้ chloroform เป็น mobile phase จะไม่สามารถแยก spot ให้เคลื่อนที่ได้ แต่เมื่อใช้ n-butanol จะเห็นว่ากลุ่มสารทั้งหมดจะเคลื่อนที่ไปที่ front เมื่อทำการปรับเปลี่ยน polarity ของ mobile phase จะพบว่า $CHCl_3$: EtOH, 6:4 เป็น solvent ที่ดีที่สุด ทำให้แยกสารได้ชัดเจน และมีค่า Rf ดังนี้ ของเชื้อ A25 Rf. ๐.๔๔ เชื้อ SP5-1 Rf. ๐.๕๐ และ ๐.๕๔ ส่วนเชื้อ A6-2 และ A5-1 ไม่พบ spot ที่เด่นชัด (ภาพที่ ๔)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ๑๖ ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *S.aureus* และ *B.subtilis* ของสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว SG-1 (pH ๗.๒) บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ.

รหัสเชื้อ	ระยะเวลา (วัน)	inhibition zone (mm)	
		S.aureus	*B.subtilis*
A6-2	5	10.4	8.3
	7	11.5	8.2
A25	5	0	16.5
	7	0	16.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Silica gel/$CHCl_3$: EtOH, 6:4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ ๔ TLC plate แสดงกลุ่มสารปฏิชีวนะที่เชื้อตัวแทนผลิตขึ้น

บทที่ ๖

วิจารณ์ สรุป และข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกเชื้อพวก actinomycetes ครั้งนี้ พบเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะหลายสกุล คือ *Micromonospora, Streptomyces, Streptoverticillium, Actinoplanes Nocardia* และเชื้อที่ยังไม่สามารถจัดเข้าอยู่สกุลใด (๔-๘,๑๐) จากผลการแยกเชื้อ โดยเลี้ยงบนอาหาร PCA พบว่าเชื้อ *Micromonospora* sp. จะเจริญให้เห็นโคโลนีของเชื้อช้ากว่าพวก *Streptomyces* sp. ดังนั้นหากไม่คุ้นเคยจะทำให้แยกเชื้อนี้ได้ยาก การสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Micromonospora* sp. ซึ่งที่ผิวมีลักษณะขึ้นและหนาช่วยบอกความแตกต่างได้

ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่น พบว่า ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแกรมบวก พวก *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 เชื้อที่แยกได้ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ บางเชื้อเท่านั้นที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 และ *Candida albicans* IFO 0583

การเปรียบเทียบการผลิตสารปฏิชีวนะโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ พบว่าในอาหารควรมีแป้งและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จึงจะผลิตได้ดี และเลี้ยงเชื้อที่ pH ประมาณ ๗.๒-๗.๔ บ่มไว้ที่ ๒๘°-๓๐°ซ บนเครื่องเขย่าความเร็ว ๒๐๐ รอบต่อนาที แหล่งอาหารจะสัมพันธ์กับชนิดของสารที่เชื้อผลิตขึ้น ซึ่งจะอาจคาดเดาสภาวะเหมาะสมได้ (๑๐)

จาก spot บน TLC พบว่า เชื้อ *Micromonospora* sp.A25 ให้ spot เดียว (Rf. ๐.๔๘) และเชื้อ *Streptomyces* sp.ให้สอง spot (Rf.๐.๕๐ และ ๐.๕๘) spot ของ A25 ใกล้เคียงกับ spot ล่างของ SP5-1 ซึ่งเป็น minor spot จึงอาจเป็นสารเดียวกัน ส่วน Rf. ๐.๕๘ ของ SP5-1 เป็น major spot เชื้อ A6-2 และ A5-1 ไม่เห็น spot ใดๆ บน TLC ซึ่งอาจจะเป็นได้ที่มีสารอื่นที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ แต่ไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีการที่ทำนี้ อย่างไรก็ตาม จาก spot ที่พบบน TLC ครั้งนี้ ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มใด เพราะไม่ได้เปรียบเทียบกับ reference

การแยกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะในประเทศไทย โดยเฉพาะเชื้อสกุล *Micromonospora* ยังน่าสนใจอยู่ ถึงแม้จะมีการศึกษามากแล้วในต่างประเทศ แต่การศึกษาเชื้อพร้อมกันหลายสกุลจะทำให้งานมีขอบเขตกว้างไป จึงอาจไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากเชื้อแต่ละสกุลสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ที่สภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการวิจัยครั้งนี้ก็พบว่า เชื้อ *Micromonospora* sp. และเชื้อสกุลอื่นสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ แต่ก็ยังอยู่ในเกณฑ์ที่จะนำไปพัฒนาให้ถึงขั้นอุตสาหกรรมไม่ได้ ควรมีการศึกษาโดยแยกเชื้อใหม่ให้กว้างขวางกว่านี้ ผลงานนี้จะเป็นเพียงแนวทางหรือประโยชน์ต่อนักวิจัยอื่นที่กำลังศึกษาถึงการผลิตสารปฏิชีวนะ และช่วยให้เกิดความคิดที่จะแยกเชื้อชนิดใหม่หรือพัฒนาการผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ได้เร็วขึ้นในโอกาสต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Umezawa, H. 1978. *Index of Actinomycetes Antibiotics*, USACO Corporation, Tokyo.

2. Shanson, D.C. 1982. *Microbiology in Clinical Practice*. Wright PSG, London., p. 36.

3. Luedemann, B.M. and B.C. Brodsky. 1964. Taxonomy of gentamicin-producing *Micromonospora*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1963*, p. 116-124.

4. Luedemann, B.M. and B.C. Brodsky. 1965. *Micromonospora carbonacea* sp. n., an Everninomicin-producing organism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 1964*. p. 47-52.

5. Luedemann, B.M. 1974. Genus I. *Micromonospora In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., ed. by R.E. Buchanan and N.E. Gibbons, The Williams and Wilkins Co., Baltimore., p. 846.

6. Sykes, G. and F.A. Skinner. 1973. *Actinomycetales : Characteristics and practical importance*. Academic Press Inc., London.

7. Goodfellow, M. and M.P. Lechevalier. 1986. Genus *Nocardia In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2, ed. by H.A. Sneath, Williams & Wilkins Co., Baltimore., 1459.

8. Katzner, H.J. 1981. The Family Streptomycetaceae *In the Procaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. vol II., ed. by M.P. Starr et al., Springer-Verlag, Berlin. p. 2028.

9. Rose, A.H. 1979, *Economic Microbiology : Secondary Products of Metabolism*, vol 3, Academic Press Inc., London, p.10-12.

10. Queener, S.W. and L.E. Day, 1986. *Antibiotic-Producing Streptomyces, In The Bacteria*, vol IX, Academic Press Inc., London.

11. Lorian, V. 1980. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, The Williams and Wilkins Company., Baltimore, p. 176.

12. Williams, S.T. and T. Cross.1971. Actinomycetes : Slide and coverslip methods *In Methods in Microbiology*, vol 4, ed. by C.Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.

13. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 313-340.

14. Enokita, R; T. Okazaki ; A.Torikata and M.Arai. 1986. Personal communication. Sankyo Fermentation Research Laboratories, Tokyo, Japan.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดต่อไปนี้เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น ๑๐๐ มล. ฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ ๑๒๐ °ซ นาน ๑๕ นาที ยกเว้นการเตรียมอาหารน้ำตาลในการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน ซึ่งต้องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ ๑๑๐ °ซ นาน ๑๐ นาที

๑. Carbon utilization medium (ISP-9)

Carbohydrate	1.0	g
$(NH_4)_2 SO_4$	0.264	g
$KH_2 PO_4$. anhydrous	0.238	g
K_2HPO_4. $3H_2O$	0.565	g
$MgSO_4$. $7H_2O$	0.1	g
Pridham and Gottlied trace salts (B)	0.1	ml
Agar	1.5	g

pH 6.8-7.0

Trace salts (B)

$CuSO_4$. $5H_2O$	0.64	g
$FeSO_4$. $7H_2O$	0.11	g
$MnCl_2$.$4H_2O$	0.79	g
$ZnSO_4$.$7H_2O$	0.15	g
Distilled water	100.0	ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. Colloidal chitin agar

Colloidal chitin	0.1-0.25	g
Agar	2.0	g

ค. FS medium

Soluble starch	3.0	g
Yeast extract	0.3	g
Soybean meal	0.7	g
Fish meal	0.5	g
Corn steep liqour	0.2	g
Beef extract	0.1	g
$CaCO_3$	0.1	g

pH 7.2

ง. Glycerol-asparagine agar

L-asparagine (anhydrous basis)	0.1	g
Glycerol	1.0	g
K_2HPO_4 (anhydrous basis)	0.1	g
Trace salts solution (A)	0.1	ml
Agar	2.0	g

Trace salts solution (A)

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.1	g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	g
Distilled water	100.0	ml

๔. GMP medium

Glucose	1.5	g
Peptone	0.6	g
Beef extract	0.3	g
Yeast extract	0.3	g
NaCl	0.5	g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.25	g

pH 7.0

๕. GSC medium

Glucose	1.0	g
Glycerol	1.0	g
Sucrose	1.0	g
Soybean meal	0.5	g
Casamino acids	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
$CaCO_3$	0.1	g

pH 7.0

๗. Inorganic salts - starch agar

Soluble starch	1.0	g
K_2HPO_4 (anhydrous basis)	0.1	g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.1	g
NaCl	0.1	g
$(NH_4)_2 SO_4$	0.2	g
$CaCO_3$	0.2	g
Trace salts solution (A)	0.1	ml
Agar	2.0	g

pH 7.0-7.4

๘. Nutrient agar (Difco)

๙. Nutrient gelatin broth

Beef extract	1.0	g
Peptone	1.0	g
NaCl	0.1	g
Gelatin	10.0	g

๑๐. Oatmeal agar (Difco)

๑๑. Potato-carrot extract agar

Potato	3.0	g
Carrot	0.25	g
Agar	1.5	g

นำ potato และ carrot ที่หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ มาต้ม นานประมาณ ๓๐ นาที ที่ ๑๐๐ °ซ แล้วกรองเอาส่วนที่เป็นน้ำด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำ และวุ้นให้ได้ตามปริมาณที่กำหนด

๑๒. PY medium

Glucose	2.0	g
Soluble starch	1.0	g
Yeast extract	0.3	g
Peptone	0.5	g
Beef extract	0.5	g
$CaCO_3$	0.3	g
NaCl	0.5	g

๑๓. Sabouraud dextrose agar (Difco)

๑๔. Skim milk broth

Skim milk (Difco)	10.0	g

๑๕. SS medium

Sucrose	1.5	g
Soybean meal	1.5	g
Glycerol	0.5	g
Corn steep liquor	0.5	g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.05	g
$FeSO_4 . 7H_2O$	0.05	g
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.001	g
$CaCO_3$	0.2	g

pH 6.5-7.0

SG medium สูตรเดียวกับ SS medium แต่ใช้ Starch ๑% แทน Sucrose และ Glucose ๒% แทน Glycerol

๑๖. Tyrosine agar

Glycerol	1.5	g
L-tyrosine (Difco)	0.05	g
L-asparagine (Difco)	0.1	g
K_2HPO_4 (anhydrous basis)	0.05	g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.05	g
NaCl	0.05	g
$FeSO_4 . 7H_2O$	0.01	g
Trace salts solution (A)	0.1	ml
Agar	2.0	g

pH 7.2-7.4

๑๗. Yeast extract - malt extract agar

Glucose	1.0	g
Peptone	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
Malt extract	0.3	g
Agar	2.0	g

pH 6.2

๑๘. Yeast extract - malt extract agar (ISP-2)

Glucose	0.4	g
Yeast extract	0.4	g
Malt extract	1.0	g
Agar	2.0	g

pH 7.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อ – นามสกุลผู้เสนอ สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์
ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330 โทร. 2511871-7

ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะที่สร้าง โดยเชื้อ *Micromonospora* species และเชื้อสกุลอื่นที่เกี่ยวข้อง*

[1]สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ [2]กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ และ [2]นิจศิริ เรืองรังษี

Antimicrobial activity of antibiotics produced by *Micromonospora* species and related genera

[1]Somboon Tanasupawat, [2]Kittisak Likhitwitayawuid and [2]Nijsiri Ruangrungsi

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา และ[2]ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบครั้งนี้แยกได้เชื้อ *Micromonospora* sp. จำนวน 20 ไอโซเลต *Streptomyces* sp. 15 ไอโซเลต *Streptoverticillium* sp. 1 ไอโซเลต *Actinoplanes* sp. 3 ไอโซเลต *Nocardia* sp. 3 ไอโซเลต และ unidentified group 5 ไอโซเลต เชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกพวก *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 มีบางไอโซเลตเท่านั้นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 และเชื้อ *Candida albicans* IFO 0583

*ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2530