

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผลิตโดยแอคติโนไมซีตที่แยกจากมูลสัตว์กินพืช



นางสาวทีศนา นิธิสกุลกาญจน์

## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCED BY ACTINOMYCETES ISOLATED FROM  
HERBIVORE DUNG



Miss Tisana Nitisakulkan

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
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



ทิศนา นิธิสกุลกาญจน์ : สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผลิตโดยแอกติโนมัยซีตที่แยกจากมูล  
สัตว์กินพืช (BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCED BY ACTINOMYCETES  
ISOLATED FROM HERBIVORE DUNG) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ประภคต์สิน สีหนนนท์  
อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว, 179 หน้า

สามารถแยกแอกติโนมัยซีตได้ทั้งหมด 127 สายพันธุ์ จากตัวอย่างมูลสัตว์กินพืช 39 ตัวอย่าง จากสัตว์กินพืช 16 ชนิด ที่สุ่มตัวอย่างเก็บจาก 9 จังหวัด ในประเทศไทย สารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีตทั้ง 127 สายพันธุ์นำมาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ 6 ชนิด ด้วยวิธี MTT และทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar well พบว่าสารสกัดจากแอกติโนมัยซีตจำนวน 7.09, 18.90, 18.11, 8.66, 14.96 และ 6.93 % ออกฤทธิ์ยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์  $\leq 50\%$ ) ต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง (A375), มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW 620), มะเร็งกระเพาะอาหาร (KatoIII), มะเร็งตับ (HepG2), มะเร็งเต้านม (BT474) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) ตามลำดับ และนอกจากนี้สารสกัดจากแอกติโนมัยซีตจำนวน 32.28, 5.51 และ 28.35% ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดี่ยว, ยับยั้งราอย่างเดี่ยว และยับยั้งทั้งแบคทีเรียและรา ตามลำดับ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 แยกได้จากมูลควาย (*Bubalus bubalis*) จากจังหวัดนครปฐม ออกฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดและจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านม และออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cereviceae* and *Aspergillus niger* แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 แยกได้จากมูลควาย (*Bubalus bubalis*) จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ออกฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. cereviceae* and *A. niger* จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และเมื่อทำการตรวจสอบลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA พบว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 คือ *Streptomyces fradiae* (100% similarity) และ *Streptomyces coeruleorubidus* (99% similarity) ตามลำดับ

ภาควิชา จุลชีววิทยา  
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม  
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อผู้ผลิต..... ทิศนา นิธิสกุลกาญจน์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ประภคต์สิน สีหนนนท์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... จิตรตรา เพ็ญเขียว

4772586023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : ACTINOMYCETES / ANTICANCER / ANTIMICROBIAL

TISANA NITISAKULKAN : BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCED BY  
ACTINOMYCETES ISOLATED FROM HERBIVORE DUNG. THESIS ADVISOR :  
ASSOC.PROF PRAKITSIN SRIHANON, PH.D., THESIS COADVISER : ASST.  
PROF JITTRA PEUPUKEUW, 179 pp.

The 127 actinomycetes strains were isolated from dung of sixteen herbivores in Thailand and tested for their anticancer and antimicrobial activities. Anticancer activities were tested on six human cancer cell lines by MTT method and antimicrobial activities were tested against seven microorganism. Ethyl acetate extracts of fourteen days old actinomycetes culture broths showed 7.09, 18.90, 18.11, 8.66, 14.96 and 6.93 % cytotoxic activities (cell viability  $\leq 50\%$ ) against malignant (A375), colorectal (SW 620), gastric (KatoIII), liver (HepG2), breast (BT474) and T cell (Jurkat) cancer cell lines respectively. Ethyl acetate extracts of actinomycetes culture broths showed 32.28, 5.51 and 28.35% antimicrobial activities against bacteria, fungi and both bacteria and fungi respectively. Ac1-4 strain isolated from water buffalo (*Bubalus bubalis*) dung in Nakhon Pathom Province exhibited specific anticancer activity with breast (BT474) cancer cell and also showed antimicrobial activities against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cereviceae* and *Aspergillus niger*. Ac16-1 strain isolated from water buffalo (*Bubalus bubalis*) dung in Surat Thani Province exhibited the highest anticancer activity with T cell (Jurkat) and high anticancer activity with breast (BT474) cancer cell and also showed antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. cereviceae* and *A. niger*. Morphological characteristics of the Ac1-4 and Ac16-1 strains placed them in the genus *Streptomyces*. Molecular identification of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of the *Streptomyces* sp. Ac1-4 showed 100% similarity to *Streptomyces fradiae* where as Ac16-1 showed 99% similarity to *Streptomyces coeruleorubidus*. The results of this study indicated that herbivore dung is promising sources of actinomycetes producing bioactive compound.

Department Microbiology  
Field of study Industrial Microbiology  
Academic year 2007

Student's signature.....Tisana Nitisakulkan  
Advisor's signature.....Prakitsin Srihanon  
Co-advisor's signature.....Jittra Peupukeuw

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. ประทีปดีลิติน สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยเก็บตัวอย่างมูลสัตว์และได้ให้คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งได้ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ช่วยเหลือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมายซีสและได้ให้คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งได้ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็นข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุง วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการ สอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็นข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ที่กรุณารับเป็น กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็น ข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุง วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และให้ความรู้และความอนุเคราะห์เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง เซลล์มะเร็ง

ขอขอบคุณนางสาวสุนัดดา โยมญาติ นางสาวสุกัญญาณี แซ่ประเสริฐ และนางสาวธีร วัฒนา ภาระมาตย์ ที่ช่วยเหลือในด้านข้อมูลให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนางสาววันทนี ทาทอง และนายณัฐชัย เก่งพิพัฒน์ ที่ได้ให้คำแนะนำและ ความช่วยเหลือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมายซีส และนางสายพิน สุวรรณจณี ที่ให้ ความช่วยเหลือในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังใจ และช่วยเหลือสนับสนุนตลอดการทำวิทยานิพนธ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ประวัติการค้นพบ.....	4
2.2 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีทีส.....	5
2.3 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทีส.....	6
2.4 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีส.....	15
2.5 ความต้องการสารอาหารของแอกติโนมัยซีทีส.....	19
2.6 การแยกและการคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีส.....	21
2.7 สารปฏิชีวนะ.....	26
3. วิธีดำเนินงานวิจัย.....	41
3.1 อุปกรณ์.....	41
3.2 สารเคมี.....	43
3.3 ตัวอย่างมูลสัตว์.....	46
3.4 การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากมูลสัตว์ตัวอย่างมูลสัตว์.....	46
3.5 การเก็บรักษาแอกติโนมัยซีทีส.....	46
3.6 การค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะ.....	47
3.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (Growth) กับการสร้างสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1.....	54
3.8 การหาตัวทำลายที่เหมาะสมในการสกัดสารปฏิชีวนะ จากสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1.....	55
3.9 การแยกและทำให้สารสปิริวเนบริสุทซ์เบื้องต้น.....	56

บทที่	หน้า
3.10 การศึกษาตำแหน่งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ทดสอบบนแผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี.....	56
3.11 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1.....	57
3.12 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA.....	60
4. ผลการทดลอง.....	64
4.1 ลักษณะของตัวอย่างมูลสัตว์.....	64
4.2 การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากตัวอย่างมูลสัตว์.....	64
4.3 การทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์.....	70
4.4 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ...	75
4.5 การทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่ สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....	77
4.6 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....	83
4.7 ผลทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งและการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง จุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1.....	93
4.8 ผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342.....	99
4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (Growth) และการสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1.....	104
4.10 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารปฏิชีวนะ จากสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1.....	106
4.11 การแยกและทำให้สารปฏิชีวนะบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธี ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	109
4.12 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1....	114
4.13 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA.....	128



บทที่	หน้า
5. วิจัยรณัและสรุปลการทดลอง.....	134
รายการอ้างอิง.....	142
ภาคผนวก ก.....	150
ภาคผนวก ข.....	159
ภาคผนวก ค.....	162
ภาคผนวก ง.....	165
ภาคผนวก จ.....	173
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	179



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีทีส.....	27
2.2 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีทีสที่พบได้ยาก.....	29
3.1 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ที่ทดสอบ (CFU/ml) ที่มีความชุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard.....	50
3.2 แสดงส่วนผสมของรีเอเจนต์ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	62
4.1 แสดงแหล่งที่มา พีเอช และลักษณะของตัวอย่างมูลสัตว์.....	65
4.2 แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างมูลสัตว์ .....	68
4.3 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบของสารสกัดจาก เส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส.....	70
4.4 จำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม.....	76
4.5 ความสามารถในการยับยั้งเซลล์ไลนัมะเร็งมนุษย์ของสารสกัด จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส.....	78
4.6 แสดงจำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่มีผลต่อการยับยั้ง เซลล์ไลนัมะเร็งมนุษย์ในแต่ละชนิด.....	84
4.7 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Ac1-4 ที่สกัดด้วย เมทานอล เอทิลแอลกอฮอล์ และเฮกเซน.....	107
4.8 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Ac16-1 ที่สกัดด้วย เมทานอล เอทิลแอลกอฮอล์ และเฮกเซน.....	108
4.9 แสดงการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP.....	122
4.10 แสดงความสามารถในการสร้างรงควัตถุเมลานิน, การรีดิวซ์ไนเตรท และการ สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1.....	124
4.11 แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบ.....	125
4.12 ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	125
4.13 แสดงความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ที่พีเอชต่าง ๆ.....	126

ตารางที่	หน้า
4.14 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของแอกติโนมัยซีต สายพันธุ์ Ac1-4และ Ac16-1.....	126
4.15 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของแอกติโนมัยซีต สายพันธุ์ Ac1-4และ Ac16-1.....	127
4.16 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีต สายพันธุ์ Ac1-4 เปรียบเทียบกับ <i>Streptomyces fradiae</i> .....	131
4.17 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 เปรียบเทียบกับ <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> .....	132
4.18 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของ <i>S. longispororuber</i> <i>S. coerulescens</i> และ <i>S. viridochromogenes</i> .....	133
5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ความสามารถของการเจริญที่ อุณหภูมิและพีเอชต่าง ๆ ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ 16-1.....	138

## สารบัญรูป

รูปประกอบ	หน้า
2.1 แสดงตัวอย่างวงชีวิต (life cycle) ของแอกติโนมัยซีทีส <i>Streptomyces coelicolor</i> ....	7
2.2 แสดงองค์ประกอบภายในไซโตพลาสซึมของสายใยอาหารในแอกติโนมัยซีทีส.....	8
2.3 แสดงการสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีทีส.....	10
2.4 แสดงแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายคู่และสายสั้น.....	11
2.5 แสดงการสร้างสปอร์แบบสายยาวของแอกติโนมัยซีทีสใน สกุล <i>Streptomyces</i> .....	13
2.6 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอาหาร.....	14
2.7 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอากาศ.....	15
2.8 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides.....	32
2.9 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline.....	33
2.10 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม chloramphenicol.....	33
2.11 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide.....	34
2.12 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene.....	34
2.13 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin.....	35
2.14 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะ vancomycin.....	35
2.15 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง.....	37
4.1 แผนภูมิวงกลมแสดงการจัดกลุ่มการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....	77
4.2 แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% และจำนวนสายพันธุ์ที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งทุกชนิดมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 50%.....	86
4.3 แผนภูมิแท่งแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่ทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% อย่างน้อยหนึ่งเซลล์ไลน์.....	87
4.4 แสดงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งจุลินทรีย์ทดสอบและเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....	90
4.5 กราฟแสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ของสายพันธุ์ Ac1-4.....	93
4.6 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ของสายพันธุ์ Ac1-4.....	93
4.7 แสดงการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4.....	95

รูปประกอบ	หน้า
4.8 กราฟแสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) ของสายพันธุ์ Ac16-1.....	96
4.9 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ของสายพันธุ์ Ac16-1.....	96
4.10 แสดงการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1.....	98
4.11 ผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิส ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ (Jurkat).....	99
4.12 ผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิส ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ BT474.....	101
4.13 ผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิส ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ BT474.....	102
4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (Growth) และการสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac 1-4.....	105
4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (Growth) และการสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1.....	105
4.16 แสดงบริเวณยับยั้งที่ได้จากการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันใน สายพันธุ์ Ac 1-4.....	107
4.17 แสดงบริเวณยับยั้งที่ได้จากการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันใน สายพันธุ์ Ac 16-1.....	108
4.18 แสดงการแยกและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac1-4.....	109
4.19 แสดงการแยกและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1.....	111
4.20 แสดงภาพการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอกติโนมัยซีตที่ส สายพันธุ์ Ac1-4.....	114
4.21 แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า.....	115
4.22 แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 20,000 เท่า.....	116
4.23 แสดงภาพการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอกติโนมัยซีตที่ส สายพันธุ์ Ac16-1 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า.....	116

รูปประกอบ	หน้า
4.24 ภาพของเส้นใยอากาศที่กำลังพัฒนาไปเป็นสายสปอร์ ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10,000 เท่า.....	118
4.25 ภาพของสายสปอร์ในระยะเริ่มต้นของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 10,000 เท่า.....	119
4.26 ภาพของสายสปอร์ในระยะเจริญเต็มที่ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 7500 เท่า.....	119
4.27 ภาพสปอร์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 20,000 เท่า.....	120
4.28 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4.....	123
4.29 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1.....	123
4.30 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4.....	128
4.31 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1.....	129

# บทที่ 1

## บทนำ

แอกติโนมัยซีทีสเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในพวกแบคทีเรีย ดิคลีแแกรมบวก แต่มีลักษณะโคโลนีคล้ายราโดยมีการสร้างเส้นใย (hypha) ประกอบด้วย เส้นใยอาหาร (substrate mycelium), เส้นใยอากาศ (aerial mycelium) และสร้างสปอร์เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) (Cross และ Goodfellow, 1973) โคลินีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะเป็น ผงแป้ง หรือ เป็นแผ่นหนัง โคลินีมีหลากหลายสี เช่น ขาว เหลือง ส้ม ชมพู เขียว ม่วง และแดง เป็นต้น แต่ถ้าศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะเห็นเป็นเส้นใย และมีสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายขดม้วนอยู่บริเวณปลายเส้นใย เช่น *Streptomyces* หรือบางชนิดไม่สร้างสปอร์แต่เส้นใยจะแตกหักเป็นท่อนๆ ลักษณะคล้ายอาโทรสปอร์ (arthospore) เช่น *Nocardia* แอกติโนมัยซีทีสพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (saprophyte) สามารถย่อยสลายอินทรีย์วัตถุที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ เช่น เซลลูโลส ลิกนิน เพคติน และไคติน เป็นต้น สภาวะในอินทรีย์วัตถุที่เน่าเปื่อยผุพัง และในมูลสัตว์เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส เนื่องจากมีอินทรีย์วัตถุ, ความชื้น, ออกซิเจน และมีค่าความเป็นกรดเบสปานกลางถึงต่าง โดยมีรายงานสนับสนุนดังนี้ Sykes และ Skinner (1973) สามารถแยก *Streptosporangia* ได้จากมูลสัตว์ Mara และ Oragui (1981) แยกแอกติโนมัยซีทีสจิ้งนัส *Micromonospora*, *Streptomyces* และสายพันธุ์ *Rhodococcus coprophilus* ได้จากมูลสัตว์กินพืช (herbivore dung) ได้แก่ วัว, เกาะ, ม้า, ไก่ และ ห่าน Ouhdouch และคณะ, (1996) สามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้จากมูลแพะ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Candida tropicalis* และ *Pythium irregulare* ได้นอกจากนี้สามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้จากมูลอูฐ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Candida albicans*, *Candida tropicalis* และ *Pythium irregulare* ได้ แอกติโนมัยซีทีสในมูลสัตว์อาจได้มาจาก micro flora ของพืชอาหารสัตว์ หรือแอกติโนมัยซีทีส เอ็นโดไฟท์ (endophytic actinomycetes) ส่วนใหญ่อยู่ในจิ้งนัส *Streptomyces* (Ouhdouch และคณะ, 2001) ทำให้แอกติโนมัยซีทีสปะปนอยู่กับพืชอาหารสด หรืออยู่ในอาหารแห้งสำหรับ ปศุสัตว์ เช่น หญ้าแห้ง ฟางแห้ง หรือเมล็ดพืช ต่อมาจิ้งนัสมีรายงานสนับสนุนว่าพบ จิ้งนัส *Streptomyces*, *Micromonospora* และ *Nocardia* อยู่บริเวณรากพืช (rhizosphere) ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ พบ *Thermomonospora* ในฟางหมักและในมูลสัตว์ที่มีเซลลูโลสสูง (Gesheva, 2001) ดังนั้นมูลสัตว์จึงเป็นแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจในการแยกแอกติโนมัยซีทีส เนื่องจากเป็นแหล่งที่มีสภาวะเหมาะสม

ต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส และแอกติโนมัยซีทีสอาจติดมากับพืชอาหารสัตว์เข้าไปในทางเดินอาหาร แล้วถูกขับถ่ายออกมาอยู่ในมูลสัตว์

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสมีความหลากหลาย ได้แก่ สารยับยั้งจุลินทรีย์ สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง หรือสารยับยั้งเอนไซม์ นอกจากนี้ยังสร้างเอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การใช้เอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตโดย *Thermomonospora* spp. ในอุตสาหกรรมทอผ้าในการพิมพ์ลายผ้า เอนไซม์อะไมเลส ที่ผลิตโดย *Streptomyces* spp. ใช้ในการทำน้ำเชื่อมมอลโทส (maltose syrups) ด้านการเกษตรใช้เอนไซม์ไคตินเนสผลิตโดย *Streptomyces* spp. เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของราโดยเฉพาะราที่ก่อให้เกิดโรคพืช ด้านการแพทย์สารปฏิชีวนะ corminomycin ผลิตโดย *Actinomadura carminala* ใช้เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง, bleomycin sulfate ผลิตโดย *Streptomyces verticillus* ใช้เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยใช้บำบัดในผู้ที่เป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลือง, rifamycin B ผลิตโดย *Streptomyces albovinaceus* ใช้เป็นยาต้านไวรัส และ amphotericin B ผลิตโดย *Streptomyces nodosus* ใช้เป็นยาปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา 60-70% ของยาปฏิชีวนะผลิตจากแอกติโนมัยซีทีส และในจำนวนดังกล่าว 50% มาจาก *Streptomyces* spp. ด้วยปัจจุบันได้เกิดการดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรคเนื่องจากการกลายพันธุ์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้ทนต่อยาปฏิชีวนะได้ เช่น *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดวัณโรค เกิดการดื้อยาเนื่องจากเชื้อจะไปปรับเปลี่ยน antibiotic target ทำให้ยาที่ใช้อยู่ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ ดังนั้นการแยกแอกติโนมัยซีทีสเพื่อให้ได้หลากหลายสายพันธุ์ และมีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดื้อยาหรือโรคใหม่ ๆ ที่เกิดจากการติดเชื้อได้ มีผลช่วยแก้ปัญหาการดื้อยาและการแพ้ยา หรือการค้นพบสารยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นความก้าวหน้าของการพัฒนาในการรักษาโรคมะเร็ง แต่การที่จะแยกแอกติโนมัยซีทีสให้ได้หลากหลายสายพันธุ์และเป็นสายพันธุ์ใหม่ นั้นจำเป็นต้องคัดแยกจากแหล่งในธรรมชาติซึ่งยังไม่มีผู้นำมาแยกหาเชื้อชนิดนี้ เช่น ในมูลสัตว์เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาแยกหาแอกติโนมัยซีทีสซึ่งยังไม่มีรายงานในประเทศไทยว่านำมูลสัตว์มาแยกเชื้อชนิดนี้ แต่มีรายงานในต่างประเทศว่าสามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้จากมูลสัตว์ดังกล่าวข้างต้นดังนั้นการวิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาแยกหาแอกติโนมัยซีทีสที่มาจากมูลสัตว์กิ้งก่าในประเทศไทย ซึ่งคาดว่าจะมีความหลากหลายของสายพันธุ์เพราะเป็นแอกติโนมัยซีทีสประจำถิ่นในประเทศไทยที่ยังไม่มีการค้นพบ นอกจาก *Streptomyces* ซึ่งมีอยู่ 70-90% ของสายพันธุ์ทั้งหมดแล้วยังมุ่งเน้นที่จะศึกษาแอกติโนมัยซีทีสชนิดที่หายาก (rare actinomycetes) เช่น *Micromonospora*, *Microbispora*, หรือ *Decthylosporangium* เพื่อที่จะมีโอกาสพบสายพันธุ์ที่อาจสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ต่อไป



## วัตถุประสงค์

แยกแวกติโนมัยซีทีสจากมูลสัตว์กินพืชจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ และเซลล์มะเร็งได้ จำแนกสายพันธุ์ของแวกติโนมัยซีทีสที่คัดเลือก

## ขั้นตอนการวิจัย

1. สำรวจ และเก็บตัวอย่าง
2. แยกชนิดของแวกติโนมัยซีทีสจากมูลสัตว์กินพืชให้บริสุทธิ์ และเก็บเชื้อบริสุทธิ์
3. ทดสอบความสามารถของแวกติโนมัยซีทีสในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ และเซลล์มะเร็ง
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ของแวกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และทางอณูพันธุศาสตร์

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์ของแวกติโนมัยซีทีสที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็งได้ จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานของการศึกษาแวกติโนมัยซีทีสที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งสามารถนำเชื้อที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ต่อการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมยาต่อไป

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ประวัติการค้นพบ

แอกติโนมัยซีทีส (actinomycetes) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก คือ *aktis* แปลว่า a ray beam และ *mykes* แปลว่า fungus ซึ่งชื่อที่ตั้งขึ้นมานี้มาจากลักษณะโคโคไนท์ที่เป็นกลุ่มเส้นใยแผ่ออกเป็นรัศมี (ray fungus) เริ่มแรกแอกติโนมัยซีทีสถูกจัดกลุ่มให้อยู่ระหว่างแบคทีเรียและรา แต่ในปัจจุบันถูกจัดให้อยู่ในโปรคาริโอต (prokaryot) มีการรายงานถึงแอกติโนมัยซีทีสครั้งแรกในปี ค.ศ.1874 โดย Hansen อ้างถึงโดย Krsek และคณะ (2000) ได้พบจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเหมือนบาซิลลัส เซลล์เป็นรูปแท่ง (rod) ต่อกันเป็นสายยาว ต่อมาได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ชนิดนี้ว่า *Mycobacterium leprae* และในปี ค.ศ.1875 Cohn ได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สร้างสายใยและมีสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายซึ่งแยกได้จากก้อนน้ำตาที่พบในท่อตา (concretions of human lachrymal ducts) ว่า *Streptothrix foersteri* ในปี ค.ศ.1877 Harz อ้างถึงโดย Waksman (1950) ได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค lumpy jaw ในวัวที่ถูกค้นพบโดย Bollinger ว่า *Actinomyces bovis* เนื่องจากกลุ่มสายใยของเชื้อแผ่ออกเป็นรัศมี และในปี ค.ศ.1882 Kock แยกเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่เป็นสาเหตุของวัณโรคในมนุษย์ได้ (Krsek และคณะ, 2000) และในเวลาต่อมาได้มีรายงานถึงสปีชีส์อื่น ๆ เช่น *Saccharopolyspora rectivirgula* และบางสปีชีส์ของ *Thermoactinomyces* เป็นสาเหตุของโรคถุงลมโป่งพอง (farmer's lung), *Microsporum* เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังในวัวและแกะ, *Streptomyces scabies* เป็นสาเหตุของโรค potato scab ในมันฝรั่ง และ *Rhodococcus fascines* เป็นสาเหตุของโรค leaf galls (Miyadoh และคณะ, 1997) อย่างไรก็ตามแอกติโนมัยซีทีสส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมอย่างอิสระ (free-living) ทำหน้าที่หลักเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน (saprophytic organism) พบแอกติโนมัยซีทีสกระจายทั่วไปในดิน, แหล่งน้ำ, อากาศ และ ต้นพืช การค้นพบ Streptomycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside ที่ผลิตจาก *Streptomyces griseus* โดย Schatz และ Waksman ในปี ค.ศ. 1943 นำไปสู่การเพิ่มความสนใจในแอกติโนมัยซีทีสที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตยาปฏิชีวนะ ยาปฏิชีวนะหลายชนิดผลิตจาก *Streptomyces* sp. และ *Streptoverticillium* sp. ยาปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีทีสมีหลายกลุ่มเช่น chloramphenicol, tetracyclines, macrolides,  $\beta$ -lactam และ cephamycin แอกติโนมัยซีทีสไม่ผลิตเพียงแต่ antibacterial antibiotics เท่านั้นแต่ยังรวมถึง antifungal, anticancer และ antiviral antibiotics อีกด้วย และยัง

รวมถึงสารทุติยภูมิอีกหลายชนิดเช่น เอ็นไซม์ วิตามิน และสารยับยั้งเอ็นไซม์ จินส์อื่น ๆ ที่พบได้ยากที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Dactylosporangium*, *Microbispora*, *Streptosporangium* และ *Kibdelosporangium* (Krsek และคณะ, 2000)

## 2.2 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีทีส

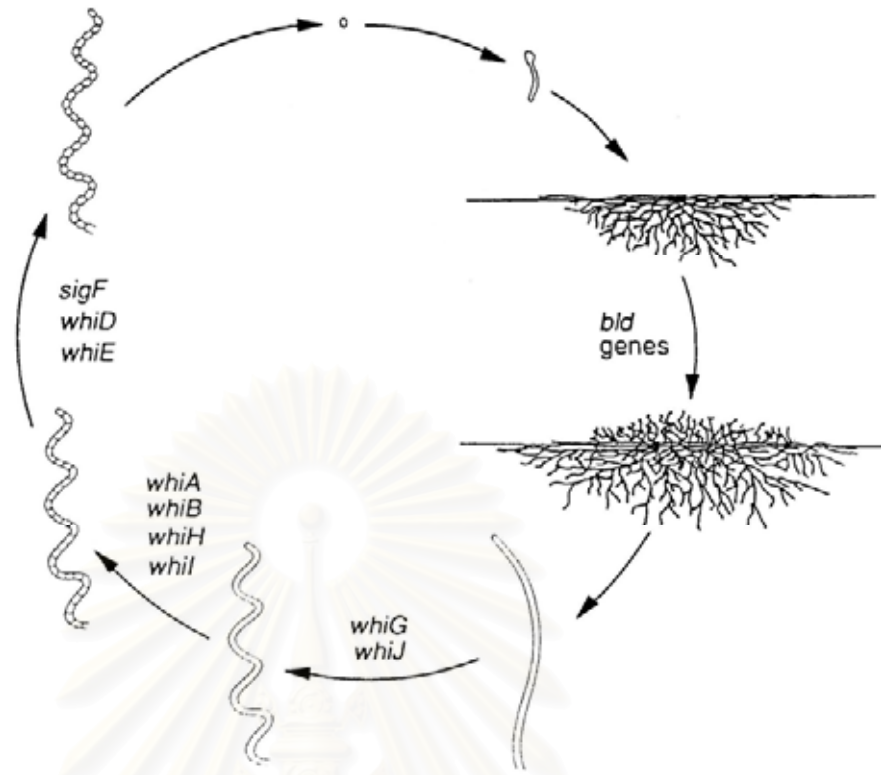
แอกติโนมัยซีทีสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ใน DNA มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (Krsek และคณะ, 2000) แอกติโนมัยซีทีสถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไม่โตคอนเดรีย (Cossa และ Goodfellow, 1973) นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทีสยังประกอบด้วย mucopeptide (*N*-acetyl glucosamine เชื่อมกับ *N*-acetyl muramic acid), glutamic acid, glycine และ alanine (Waksman และ Henrici, 1974) แต่ทางสัตวศาสตร์วิทยา แอกติโนมัยซีทีสมีลักษณะคล้ายรา คือมีการสร้างเส้นใยและสร้างสปอร์บนเส้นใยแต่เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์แล้วมีความแตกต่างกัน คือ ผนังเซลล์ของราประกอบด้วย glucans, mannans และ chitin (Cummins, 1958) และเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีสมีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของราก็มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-2.0 ไมโครเมตร มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) และหรือสร้างสปอร์ทั้งบนเส้นใยอากาศและบนเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือต่อกันเป็นสายยาว สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง ขดเป็นวงตรงส่วนปลาย ขดเป็นเกลียว และอาจมีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์ (sporangium) เช่น *Streptomyces* sp. สร้างสปอร์เป็นสายยาวบนเส้นใยอากาศ, *Thermomonospora* sp. สร้างสปอร์เดี่ยวอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (clusters) ทั้งบนเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร, *Nocardia* sp. สร้างเส้นใยอาหารแตกหักเป็นชิ้น ๆ (fragmenting substrate mycelium) และสร้างเส้นใยอากาศมีสายสปอร์ลักษณะเหมือน arthrospores, *Rhodococcus* sp. สร้างเส้นใยอาหารแตกหักเป็นชิ้น ๆ อย่างรวดเร็วแต่ละชิ้นจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นรูปกลม โคโลนีด้านบนมีลักษณะเป็น mass of coccoid elements, *Actinoplanes* sp. สร้างอับสปอร์รูปกลม (globose sporangia) บนผิวโคโลนี ภายในอับสปอร์บรรจุสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (zoospores) และ *Dactylosporangium* sp. สร้างอับสปอร์ยาว (tubular sporangia) บนผิวโคโลนีซึ่งภายในอับสปอร์บรรจุสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ และนอกจากนี้ยังสร้างสปอร์เดี่ยวรูปกลม (aleuriospores) บนเส้นใยอาหาร (William และคณะ, 1989)

## 2.3 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยซีทีส

### 2.3.1 การสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส

โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสเกิดจากการสร้างเส้นใยจำนวนมาก จนเกิดการรวมกันเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า โคโลนี (colony) ซึ่งความหมายของโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสจะต่างจากโคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียจะเกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนกัน แต่โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสเกิดจากการรวมกันของเส้นใย เป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มจากหัวเชื้ออาจมาจากสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่แตกหัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม เมื่อหัวเชื้อตกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะพัฒนาเป็นเส้นใยอาหาร เมื่อเส้นใยอาหารเจริญเต็มที่ จะแทงผ่านอาหารขึ้นมาเป็นเส้นใยอากาศซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง จากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี เช่น สร้างสปอร์โดยการแบ่งตัวของเส้นใยเริ่มจากการสร้างผนังกันภายในเส้นใย โดยทั่วไปเส้นใยมักมีผนังกันชั้นเดียวเพื่อความคงตัว และสร้างเป็นเส้นใยแข็ง (Kalakoutsii และ Agre, 1976) ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่นใน *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศเป็นโครงสร้างหลักของโคโลนี ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ใน *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่มีเส้นใยอากาศจะสร้างสปอร์และอับสปอร์ (sporangium) ตามลำดับโดยตรงจากเส้นใยอาหาร การสร้างเส้นใยของ *Sporichthya* ถูกจำกัดทำให้มีเส้นใยอากาศสั้น โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสมีลักษณะนูน (raised), เรียบแบน (flat) บางครั้งมีลักษณะคล้ายแผ่นหนัง (leather) มีความหลากหลายตั้งแต่นุ่มเหนียวจนถึงแข็ง สีของโคโลนีมีสี ขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง ฟ้า เขียว น้ำตาลและดำ ผิวของโคโลนีมีลักษณะเรียบ (smooth) สันนูน (ridged) ขรุขระ (rough) เป็นรอยย่น (wrinkled) เป็นเม็ดเล็ก (granular) เป็นผง (powder) หรือเป็นเกล็ด (squamous) ขนาดของโคโลนีขึ้นอยู่กับ สปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (Miyadoh และคณะ, 1997)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



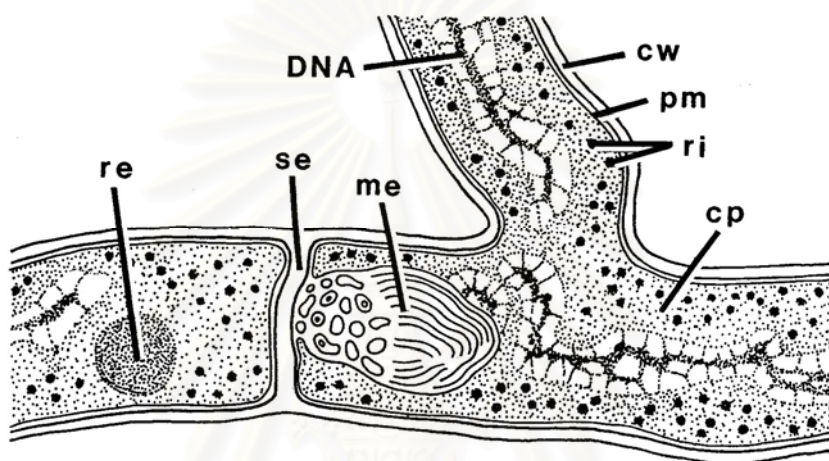
รูปที่ 2.1

แสดงตัวอย่างวงชีวิต (life cycle) ของแอกติโนมัยซีต *Streptomyces coelicolor* : ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม germ tube งอกออกมาจากสปอร์ เจริญโดยการยืดยาวและแตกแขนงบริเวณปลายเส้นใย ได้เส้นใยอาหารจำนวนมาก หลังจากนั้น 2-3 วัน เส้นใยจะเจริญแทงขึ้นมาจากในอาหารออกสู่อากาศกลายเป็นเส้นใยอากาศ ซึ่งถูกควบคุมโดย ยีน *bld* จากนั้นเจริญโดยการยืดยาวบริเวณปลายเส้นใย เมื่อเส้นใยอากาศเจริญเต็มที่ ยีน *whiG* และ *whiJ* ควบคุมให้ปลายเส้นใยม้วนเป็นเกลียว หลังจากนั้น ยีน *whiA*, *whiB*, *whiH* และ *whiI* ควบคุมให้มีการแบ่งเซลล์ที่ปลายเส้นใยโดยการสร้างผนังกันแบ่งเส้นใยออกเป็นส่วน ๆ ยีน *whiD* และ *sigF* ควบคุมให้ผนังเซลล์หนาขึ้นกลายเป็นผนังสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนต่อความแห้ง และ ยีน *whiE* ควบคุมให้สปอร์มีสีเข้มขึ้น [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

### 2.3.2 โครงสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีต

โคโลนีของแอกติโนมัยซีตจะมีการสร้างเส้นใย 2 แบบ คือ เส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศโดยเส้นใยทั้ง 2 แบบ จะแสดงลักษณะและหน้าที่ทางชีววิทยาที่แตกต่างกัน

โดยทั่วไปแอกติโนมัยซีทีสจะมีการสร้างเส้นใยทั้ง 2 แบบ แต่บางชนิดสร้างเฉพาะเส้นใยอาหารปกติไม่พบผนังกันเซลล์ภายในเส้นใย แต่อาจพบได้ในช่วงแรกของการแตกหักเป็นชิ้น ๆ (fragmentation) ของเส้นใย ภายในเส้นใยมีโครงสร้างหลักที่แสดงว่าแอกติโนมัยซีทีสเป็นโปรคาริโอต ดังแสดงในรูปที่ 2.2 คือ ไนไซโตพลาสซึม ประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ, ไรโบโซม และสารต่าง ๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น polyphosphates, lipids และ polysaccharides มีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ห่อหุ้มไซโตพลาสซึม ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์บางแห่งจะพัฒนาไปเป็น mesosomes ตรงบริเวณติดกับผนังเซลล์



**รูปที่ 2.2** แสดงองค์ประกอบภายในไซโตพลาสซึมของเส้นใยอาหารในแอกติโนมัยซีทีส: (cp) ไซโตพลาสซึม, (pm) เยื่อหุ้มเซลล์, (cw) ผนังเซลล์, (me) มีโทโซม, (se) ผนังกันเซลล์, (ri) ไรโบโซม, (DNA) สาย DNA, และ (re) แอ่งสะสมสารภายในเซลล์ [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

เส้นใยอาหาร คือ เส้นใยที่สร้างในระยะ vegetative cell จะเจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเจริญของสายใยชนิดนี้จะมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน โดยช่วงแรกสีของเส้นใยจะเป็นสีขาวหรือครีม แต่เมื่อเจริญเต็มที่ก็จะกลายเป็นสีเหลือง แดง ชมพู ส้ม เขียว หรือน้ำตาล และเมื่อเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะเกิดการเจริญอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-6 ชั่วโมง โดยจะมีการสร้าง germ tube หนึ่ง tube หรือหลาย tube ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นเส้นใยยาวและพัฒนาเป็นเส้นใยที่มีความซับซ้อนยิ่งขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยประเภทนี้พบได้ตั้งแต่ 0.2-0.8 ไมโครเมตร บางชนิดพบเส้นใยมีลักษณะโค้งและมีการแตกแขนง โครงสร้างของเส้นใยจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เชื้อเจริญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิและสารเคมีที่มีผลต่อการเจริญ เมื่อเชื้อมีอายุมากเส้นใยชนิดนี้จะมี

การแตกหักเป็นชิ้นส่วนสั้น ๆ บางชนิดอาจมีการแตกหักอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูงหรือเจริญอยู่ในภาวะที่เป็นของเหลว (Sykes และ Skinner, 1973)

เส้นใยอากาศ คือ เส้นใยที่สร้างขึ้นด้านบนของเส้นใยอาหาร พบมากในแอกติโนมัยซีทีส่วนใหญ่โดยเฉพาะ จินัส *Streptomyces* ลักษณะของเส้นใยอากาศจะแตกต่างกันไปตามกลุ่มของแอกติโนมัยซีที ส่วนประกอบของอาหาร และภาวะของการเลี้ยงเชื้อ เส้นใยอากาศส่วนใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1-1.4 ไมโครเมตร การเจริญของเส้นใยอากาศจะเริ่มจากกระบวนการแตกหน่อ (sprout) หรือแตกแขนง (branching) จากส่วนของเส้นใยอาหารแล้วเจริญขึ้นด้านบนสัมผัสกับอากาศ และเกิดการแบ่งตัว (subdivision) เพื่อเจริญต่อไปเป็นเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป โดยปกติเส้นใยชนิดนี้จะมีลักษณะสั้น, ยาว, ตรง หรือโค้ง และมีการแตกแขนงจำนวนมาก เส้นใยอากาศจะเจริญปกคลุมทั้งโคโลนี เมื่อสังเกตดูจะมีลักษณะคล้ายฝุ่นชอล์กอยู่บนเส้นใยอาหาร แอกติโนมัยซีทีบางกลุ่มสร้างสายใยอากาศที่มีลักษณะคล้ายวงแหวนเมื่อมองจากด้านบนของโคโลนี โดยลักษณะดังกล่าวเกิดจากการชักนำของยีนของสายใยที่จะพัฒนาไปเป็นสปอร์ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปรากฏการณ์นี้คือ การแพร่ของสารเคมีบางชนิด ความเข้มข้น อุณหภูมิและความชื้น (Waksman, 1950)

สปอร์ของแอกติโนมัยซีที การสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของกลุ่มและชนิด สปอร์มีหลายรูปร่างหลายลักษณะ เช่น กลม (globose) รูปไข่ (ovoid) รูปแท่ง (rod-shaped) และมีผิวสปอร์หลายรูปแบบ เช่น เรียบ (smooth), ขรุขระ (irregular rugose), สันนูนเป็นร่องขนาน (parallel rugose), ปุ่ม (warty), ตุ่มยาว (tuberculate), หนาม (spiny), และ เป็นขน (hairy) การสร้างสปอร์แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทตามลักษณะโครงสร้างภายนอกคือ สปอร์เดี่ยว (single spore), สายสปอร์ (spores formed in chains) และสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ (spore formed within sporangia)

1. กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว (monosporous) พบในหลายจินัส เช่น ใน *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (sporophores) เกิดขึ้นบนเส้นใยอาหาร สร้างสปอร์ติดอยู่กับก้านชูสปอร์สั้น ๆ และแยกออกมาเดี่ยว ๆ การสร้างสปอร์เริ่มจากส่วนปลายสุดของเส้นใยมีการพองตัวออก จากนั้นมีการสร้างผนังกันระหว่างก้านชูสปอร์และส่วนที่พองออกเป็นสปอร์ และสร้างผนังสปอร์หนาขึ้น (Kawamoto, 1989) ปลายสุดของก้านชูสปอร์อาจแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงของปลายก้านชูสปอร์ทำให้ *Thermomonospora* ที่สร้างสปอร์เดี่ยวตรงบริเวณปลายก้านชูสปอร์มีสปอร์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายเส้นใยอากาศ มีก้านชูสปอร์สั้นและไม่แตกแขนง อาจเรียกสปอร์เดี่ยวของทั้ง 3 จินัส

ข้างต้นว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยมีการโป่งออก (Cross, 1989) ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora*, และ *Saccharomonospora* แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงการสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีทีสใน (A) *Micromonospora*, (B) *Thermomonospora*, และ (C) *Saccharomonospora* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

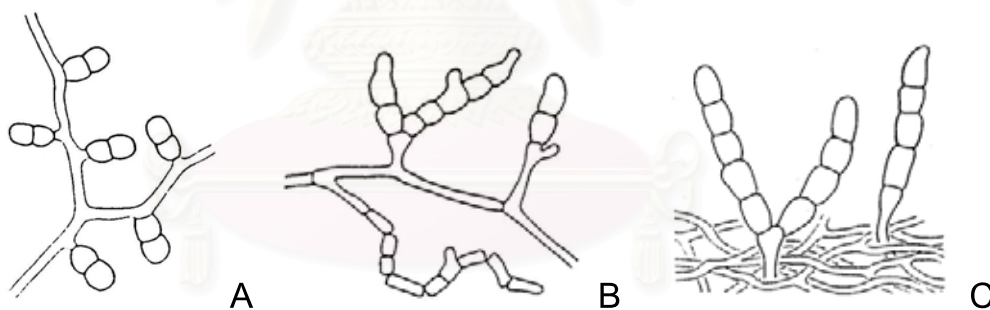
2. กลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสาย การสร้างสปอร์เป็นสายเกิดจากเส้นใยมีการแบ่งตัวเป็น segments ตามขวาง แต่ละ segments สามารถพัฒนาเป็นสปอร์ได้ ในแอกติโนมัยซีทีสมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้โดยพิจารณาถึงความยาวของสาย สปอร์หรือจำนวนสปอร์ คือ สปอร์คู่ (bisporous), สปอร์สายสั้น (oligosporous) และสปอร์สายยาว (polysporous)

สปอร์คู่ ประกอบด้วย คู่ของสปอร์เรียงต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก มีลักษณะเป็นสปอร์คู่ทรงรีมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรง หรือเกิดบนก้อนจุลสปอร์สั้น ๆ ลักษณะสปอร์ของ *Microbispora* แสดงดังรูป 2.4 (A) การสร้างสปอร์ของ *Microbispora* เริ่มจากเส้นใยอากาศแตกหน่อออกทางด้านข้างเป็นกิ่งสั้น ๆ จากนั้นส่วนที่เป็นกิ่งมีการพองออกและสร้างผนังกันตรงกลาง แอกติโนมัยซีทีสที่สร้างสปอร์แบบ bisporous ไม่ได้พบเฉพาะในจีนัส *Microbispora* เท่านั้นซึ่งลักษณะสปอร์ 2 สปอร์ ที่เรียงต่อกันตามแนวยาวยังพบใน *Actinomadura echinospora*, *Actinomadura rugatobispora* (Kroppenstedt และคณะ, 1990) อ้างอิงโดย Miyadoh และคณะ, 1990) และจีนัส *Actinobispora* (Jiang และคณะ, 1991)

สปอร์สายสั้น ส่วนมากพบ 7-20 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ เช่น *Nocardia brevicatena* สร้างสปอร์สายสั้น ๆ บนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ โดยมีจำนวนสปอร์ 2-7 สปอร์อยู่บนก้อนจุลสปอร์ สายสปอร์อาจมี



การแตกแขนง และมีการแตกหักของเส้นใยอาหารแสดงดังรูป 2.4 (B) *Saccharopolyspora rectivirgula* สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายมีจำนวนสปอร์น้อยกว่า 5 สปอร์บนก้านชูสปอร์ที่อยู่บริเวณด้านข้างและปลายของเส้นใย (Korn-Wendisch และคณะ, 1989) ในจีนัส *Actinomadura* และ *Microtetraspora* สร้างสายสปอร์สั้น ๆ บนเส้นใยอากาศ จำนวนสปอร์บนสายสปอร์มีตั้งแต่ 4 สปอร์ จนถึง 20 สปอร์ สายสปอร์อาจมีลักษณะตรง (straight), เป็นขอ (hooked), เป็นวงเปิด (open loop), หรือเป็นเกลียว (spiral) ซ้อนกัน 1-4 ชั้น เช่น *Actinomadura pusilla* สร้างสายสปอร์เป็นเกลียวพันซ้อนกันแน่น *Streptoverticillum* มีลักษณะเฉพาะคือ สร้างก้านชูสปอร์เป็นวงรอบเส้นใยแกน สายสปอร์สั้นอาจมีลักษณะปิดเป็นเกลียวซ้อนติดกัน หรือโค้งงอ และเส้นใยแกนที่มีสายสปอร์จะมีการบิดตัว (Locci และ Schofield, 1989) แสดงดังรูปที่ 2.5 (D) จีนัส *Macrospora*, *Microcelobospora* และ *Elytrosporangium* สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ในสายสปอร์สั้น ๆ อยู่บนเส้นใยอาหาร *Sporichthya polymorpha* สร้างสปอร์สายสั้นบนเส้นใยอากาศ ซึ่งสปอร์มีลักษณะเป็นรูปแท่งจนถึงรูปกลม *Catellatospora* สายสปอร์มีลักษณะตรงจนถึงโค้งงอ มีจำนวนสปอร์ 5-30 สปอร์ อยู่บนปลายก้านชูสปอร์ที่แทงขึ้นมาจากอาหาร ก้านชูสปอร์มีขนาดสั้นและอาจแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง (Asano และ Kawamoto, 1986) ดังแสดงในรูป 2.4 (C)



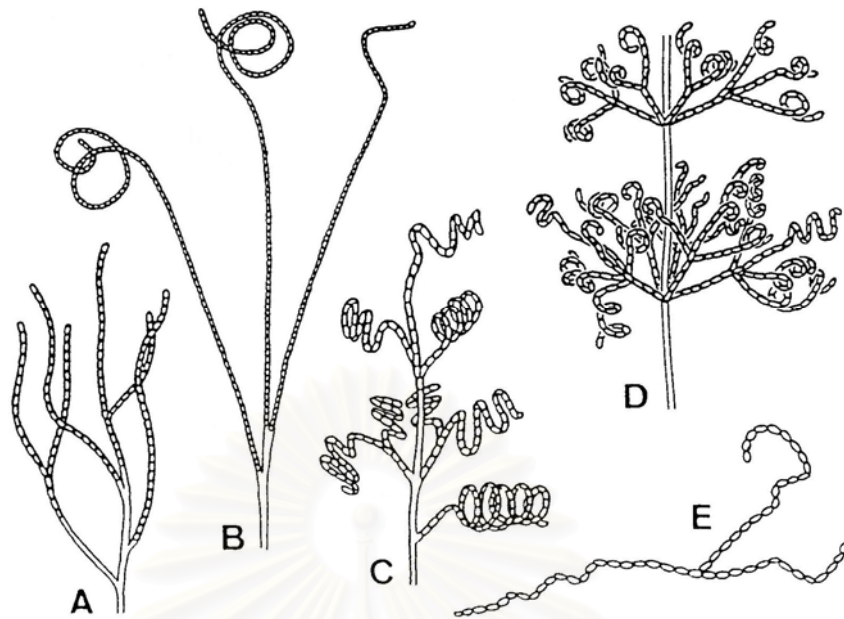
**รูปที่ 2.4** แสดงแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายคู่และสายสั้น A. การสร้างสปอร์แบบ disporous ของ *Microbispora*, B. และ C. การสร้างสปอร์แบบ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ [ที่มาจาก Atlas of Actinomycetes (1997)]

สปอร์สายยาว แอกติโนมัยซีทีสที่สร้างสปอร์สายยาวที่สำคัญ คือ จีนัส *Streptomyces* มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวมากกว่า 50 สปอร์ สปอร์ของ *Streptomyces* และแอกติโนมัยซีทีสชนิดอื่นที่มีสปอร์สายยาว มักเรียกว่า arthrospores คือมีการสร้างสปอร์เป็นสายโดยเกิดการแตกหักของเส้นใยที่เกิดจากการแบ่งเป็นส่วน ๆ ของเส้นใยเดิม บริเวณที่เกิดการแตกหักเกิดจากการกระตุ้นโดยยีนแบบสุ่ม ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้

เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ (Ettlinger และคณะ, 1958 อ้างถึงโดย Pridham และคณะ, 1958 อ้างถึงโดย Korn-Wendisch และ Kutzner, 1981) การสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศของ *Streptomyces* แสดงดังรูปที่ 2.5 (A, B, C และ D) ซึ่งมีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้ เป็น 4 ลักษณะคือ

- Rectiflexibiles ลักษณะของสายสปอร์ตรงหรือโค้งงอ
- Retinaculiaperti ปลายสายสปอร์คล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิด หรือเป็นเกลียวซ้อนกัน 1-3 ชั้น
- Spira สายสปอร์ม้วนเป็นเกลียว แยกออกได้เป็น 2 แบบ คือ เป็นวงปิดเป็นเกลียวติดกันแน่น และเป็นเกลียวแบบวงเปิดเกลียวยาวยึดไม่ติดกันแน่น
- Verticillati สายสปอร์ขดคล้ายกันหอย และแตกแขนงออกเป็น ซ่อ

ในบางกรณีสายสปอร์ขดเป็นเกลียวแน่นและมีสปอร์จำนวนมาก ทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์ หรือ pycnidia เช่นในจีโนส *Actinosporangium* และ *Actinopycnidium* ส่วนในจีโนส *Pseudonocardia* สร้างสายสปอร์บนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศที่มีลักษณะซิกแซก (zigzag shaped) จีโนส *Nocardiosis* สามารถสร้างสายสปอร์บนเส้นใยอากาศได้จำนวนมาก สปอร์อาจเป็นสายตรง งอ หรือซิกแซก (Meyer, 1989 อ้างถึงโดย Miyadoh และคณะ, 1997) แสดงดังรูปที่ 2.5 (E)

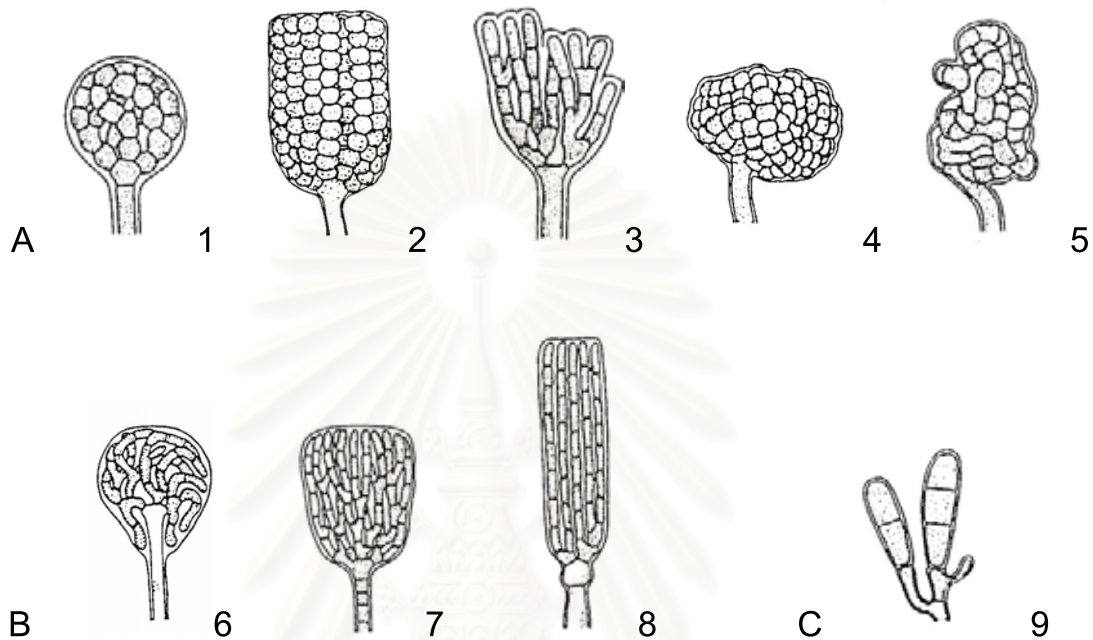


**รูปที่ 2.5** แสดงการสร้างสปอร์สายยาวของแอกติโนมัยซีทีสใน จีแนส *Streptomyces* : (A) *Rectiflexibiles*, (B) *Retinaculiaperti*, (C) *Spira*, (D) *Verticillati* ในเส้นใยอากาศของจีแนส *Streptoverticillum* และ *Streptomyces* และ (E) fragmenting branched ในเส้นใยอากาศของจีแนส *Nocardiopsis* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

3. กลุ่มที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ มีหลายจีแนสที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมาย สามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยซีทีสที่สร้างอับสปอร์ได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหารและกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร ประกอบด้วยจีแนส *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะเป็นทรงกลม หรือเกือบกลมจนถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-15 ไมโครเมตร อับสปอร์สร้างขึ้นบนเส้นใยอาหารโดยตรง โดยมีก้านชูอับสปอร์ (sporangiophore) ยื่นขึ้นมาจากเส้นใยอาหาร และที่ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์มีการแตกแขนงออกเป็นสายสปอร์หลายสายขดม้วนเป็นก้อนภายในผนังห่อหุ้ม หรือบางสปีชีส์ในจีแนส *Actinoplans* สร้างอับสปอร์รูปทรงกระบอก ทรงขวด ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 15 ไมโครเมตร ภายในอับสปอร์มีสปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย (Couch, 1963 อ้างถึงโดย Vobis, 1987) ลักษณะของอับสปอร์ในจีแนส *Actinoplans* แสดงดังรูปที่ 2.6 (A) จีแนส *Pilimelia* สร้างอับสปอร์บนผิวของอาหาร อับสปอร์มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก หรือ

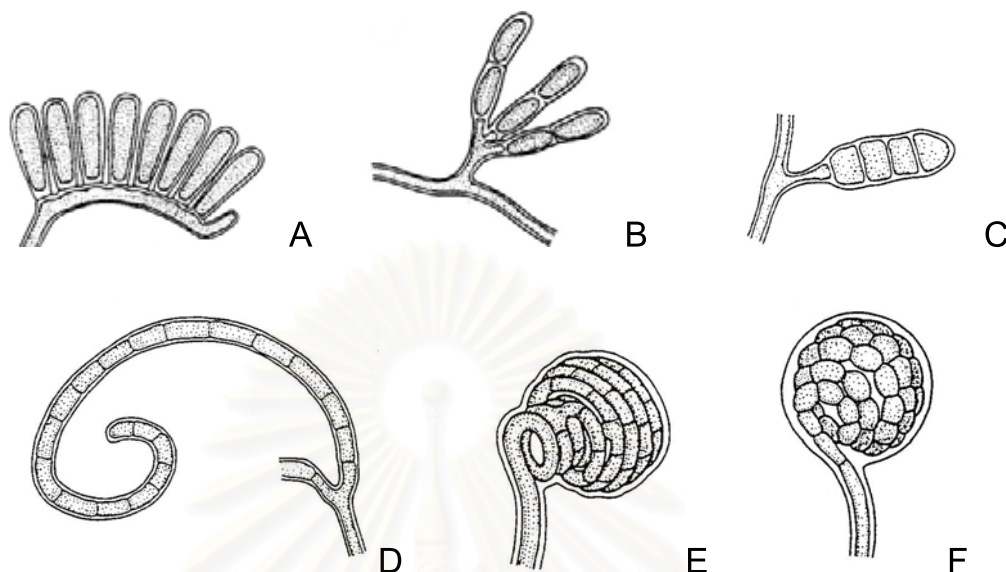
ทรงกลม ขนาดประมาณ 10-15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งเรียงตัวเป็นแถวขนานกัน หรือววนไม่เป็นระเบียบ ลักษณะของอับสปอร์ในจีนัส *Pilimelia* แสดงดังรูปที่ 2.6 (B) จีนัส *Dactylosporangium* จีนัสนี้มีจำนวนสปอร์แบบ oligosporous คือ มีสปอร์ประมาณ 2-5 สปอร์ อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ แสดงดังรูปที่ 2.6 (C) (Vobis และ Kothe, 1985)



**รูปที่ 2.6** แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอาหาร (A) *Actinoplanes* : 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู 4. กิ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง ; (B) *Pilimelia* : 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก ; (C) *Dactylosporangium* : 9. รูปทรงกระบอก [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศแสดงดังรูปที่ 2.7 ประกอบด้วยจีนัส *Planomonospora* สร้างอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในมีเพียงหนึ่งสปอร์ จีนัส *Planobispora* สร้างสปอร์คู่เรียงต่อกันตามยาวอยู่ในอับสปอร์ จีนัส *Planotetraspora* สร้างอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ เรียงต่อกันเป็นหนึ่งแถว (Runmao และคณะ, 1993) จีนัส *Planopolyspora* เมื่อเจริญเต็มที่อับสปอร์จะมีลักษณะเป็นเส้นยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมากเรียงต่อกันเป็นแถวเดี่ยวอยู่ในอับสปอร์ (Petrolini และคณะ, 1993) จีนัส *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นรูปทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเส้นใยพัฒนาเป็นสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายยาวขดม้วนอยู่ในอับสปอร์ จีนัส *Spirillospora* สร้างอับสปอร์เป็นรูปทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-24 ไมโครเมตร สปอร์เรียงตัวกันเป็นสายและขดเป็นวง ภายในวงของสายสปอร์มีการแตกแขนงของ

สายสปอร์ สปอร์มีลักษณะเป็นรูปแท่ง และโค้งงอ (Williams และ Sharples, 1976 อ้างถึงโดย Petrolini และคณะ, 1992)



**รูปที่ 2.7** แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอากาศ A) *Planomonospora* : สร้าง monosporous รูปกระบอก, B) *Planobispora* : สร้าง disporous รูปทรงกระบอก, C) *Planotetraspora* : สร้าง tetrasporous รูปทรงกระบอก, D) *Planopolyspora* : สร้าง polysporous รูปทรงคล้ายท่อ, E) *Spirillospora* : สร้าง polysporous รูปทรงกลม และ F) *Streptosporangium* : สร้าง polysporous รูปทรงกลม [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

## 2.4 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีส

โดยทั่วไปเมื่อ 20 ปีที่แล้วข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีสมีเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะรูปร่างและสีของเส้นใยอากาศ, เส้นใยอาหาร, พื้นผิวของสปอร์, รูปแบบของสายสปอร์และอับสปอร์, หรือการสร้างรงควัตถุ (diffusible pigment) และการสร้างรงควัตถุเมลานิน นอกจากนี้ลักษณะทางเคมีของเซลล์ คือ องค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย dibasic amino acid สามารถแบ่งผนังเซลล์ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ I - IV โดยแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันไปตามกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ 3 ของสายเตตระเปปไทด์ (tetrapeptide) และไกลซีนในอินเตอร์เปปไทด์บริดจ์ (interpeptide bridges) และยังรวมถึงการวิเคราะห์รูปแบบน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ คือ อะราบิโนส (arabinose), ฟรุคโคส (fucose), กาแลคโทส (galactose), เมดูโรส (madurose) และ ไซโลส (xylose) โดยอ้างอิงการ

จัดจำแนกตามBergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams และคณะ,1989) แต่ในระยะหลังได้มีการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ร่วมด้วย จึงทำให้ทราบถึงความใกล้เคียงกันในทางพันธุกรรมมากขึ้น และเป็นเหตุผลนำมาซึ่งการแก้ไขการจัดกลุ่มโดยย้ายบางสกุล (Genus) ในวงศ์ (Order) เดิมไปอยู่ในวงศ์ใหม่ถึงแม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะแตกต่างกันก็ตาม จากเกณฑ์การจำแนกข้างต้นสามารถจำแนกแอกติโนมัยซีที่ส่อออกได้เป็น 8 กลุ่ม (Miyadoh และคณะ, 1997) และ (William และคณะ, 1989)

### 1. *Micromonococcus*, *Microbacterium* และจิ้นส์ที่ใกล้เคียง

วงศ์นี้หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic) เป็น chemoorganotrophic ผนังเซลล์มี L-diaminopimelic acid (L-DAP) หรือ meso-diaminopimelic acid (meso-DAP) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ สมาชิกในวงศ์นี้มีความหลากหลายเป็นอย่างมาก ได้แก่ จิ้นส์ *Micrococcus*, *Kineococcus*, *Luteococcus*, และ *Microlunatus* เป็นพวกที่ไม่สร้างเส้นใยมีเซลล์เป็นรูปกลม จิ้นส์ *Arthrobacter*, *Aureobacterium* และ *Curtobacterium* เซลล์มีลักษณะเป็นรูปกลม รูปแท่ง และรูปตัววี (V shaped) จิ้นส์ *Cellulomonas* เซลล์มีลักษณะเป็นรูปแท่งมีการแตกแขนงของเซลล์ *Oerskovia* และ *Dermatophilus* เป็นจิ้นส์ที่มีการสร้างเส้นใยอาหารและมีการแตกหักของเส้นใยกลายเป็นสปอร์เคลื่อนที่ได้ โดยเส้นใยมีผนังกันแบ่งตัวทั้งตามยาวและตามขวาง จิ้นส์ *Agromyces* สร้างเส้นใยอาหารและมีการแตกหักของเส้นใยเป็นสปอร์รูปกลม และรูปแท่ง จิ้นส์ *Nocardioides* และ *Promicromonospora* สร้างทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศและมีการแตกหักของเส้นใยกลายเป็นสปอร์รูปแท่ง

### 2. *Mycobacterium*, *Nocardia* และจิ้นส์ที่ใกล้เคียง

วงศ์นี้มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ซับซ้อนประกอบด้วย meso-DAP, micolic acid และ arabinogalactan ได้แก่ จิ้นส์ที่มีเซลล์เป็นรูปกลม และหรือรูปแท่ง ไม่สร้างเส้นใย คือจิ้นส์ *Corynebacterium* มีการสร้างผนังกันตามขวางภายในเซลล์รูปแท่ง, *Gordona*, *Thukamurella* และ *Mycobacterium* เซลล์เป็นรูปแท่งบางครั้งสร้างเส้นใยที่มีการแตกแขนง จิ้นส์ *Rhodococcus* สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงยืดยาว และมีการแตกหักเป็นรูปกลมจนถึงแท่งสั้น *Nocardia* สร้างเส้นใยอาหารมีการแตกหักเป็นรูปกลมและรูปแท่ง และสร้างเส้นใยอากาศมีสายสปอร์ (conidia) สั้นจนถึงยาว ในวงศ์นี้มีสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม คือ C.

*glutamium* และ *C. monoogenes* มีความสามารถในการผลิตกรดกลูตามิก และทางการแพทย์ คือ *M. bovis* สายพันธุ์ BCG ใช้ผลิตวัคซีนป้องกันวัณโรค

### 3. *Pseudonocardiaceae* และจีสที่ใกล้เคียง

วงศ์นี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP มีน้ำตาล arabinose, galactose และ rhamnose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ จีสที่สร้างสายสปอร์ยาวบนเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร คือ *Actinopolyspora* และ *Amycolatopsis* จีสที่สร้างสายสปอร์ยาวบนเส้นใยอากาศอย่างเดี่ยวและสร้างสปอร์เคลื่อนที่ได้ คือ *Saccharopolyspora* และ *Actinokineospora* จีส *Pseudonocardia* และ *Saccharothrix* สร้างเส้นใยอากาศเป็นรูปซีกแซก จีส *Saccharomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศ จีสที่สร้างโครงสร้างคล้ายอับสปอร์รูปกลม (pseudosporangium) บนเส้นใยอากาศและสร้างสปอร์เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Kibdelosporangium*, *Kutzneria* และ *Thermocrisum* จีส *Actinosynnema* สร้างสายสปอร์บน synnemata ที่ถูกสร้างขึ้นบนเส้นใยอาหาร สปอร์เคลื่อนที่ได้

### 4. *Micromonosporaceae*

วงศ์นี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP หรือ L-lysine มีน้ำตาล xylose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ มีชั้น peptidoglycan ชนิด glycolyl วงศ์นี้ส่วนมากเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างแต่เส้นใยอาหารที่มีการแตกแขนงแต่ไม่แตกหัก แบ่งออกได้เป็นจีสที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหารภายในบรจุสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Actinoplanes*, *Pilimelia* (สร้างอับสปอร์ทรงกลม หรือ ทรงกระบอก ภายในบรจุสปอร์จำนวนมาก) และ *Dactylosporangium* (สร้างอับสปอร์รูปนิ้ว ภายในบรจุสปอร์เรียงตัวเป็นแถวเดี่ยว 2-4 สปอร์) จีสที่ไม่สร้างอับสปอร์แต่สร้างสปอร์บนสายใยอาหาร คือ *Micromonospora* (สร้างสปอร์เดี่ยวทรงกลมขนาดใหญ่) และ *Catellatospora* (สร้างสปอร์สายสั้น) และยังประกอบด้วยกลุ่มที่สร้างเส้นใยอากาศจำนวนน้อยสร้างสปอร์สายสั้นบนเส้นใยอากาศ โดยสายสปอร์และเส้นใยอากาศมักพันกันเป็นก้อนกลมคล้ายอับสปอร์ คือ จีส *Catenuloplanes* และ *Couchioplanes* (สปอร์เคลื่อนที่ได้)

### 5. *Thermomonosporaceae*

วงศ์นี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP เส้นใยอาหารแตกแขนงแต่ไม่แตกหัก ได้แก่ จีส *Thermomonospora* ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบของเซลล์ เป็นพวก thermophilic เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45-50°C แยกได้จากกองอินทรีย์วัตถุที่เกิดการหมัก สร้างสปอร์เดี่ยว

(aleuriospores) ที่ปลายน้ำชูสปอร์ที่แตกแขนงจากเส้นใยอากาศ อาจสร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารด้วย จินัส *Actinomadura* มีน้ำตาล madurose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ สร้างสายสปอร์แบบ artrospores บนเส้นใยอากาศสายสปอร์อาจสั้นหรือยาวมีลักษณะตรง ม้วน หรือขดเป็นวง ผิวสปอร์เรียบ ขรุขระ หรือเป็นหนาม

#### 6. *Streptosporangiaceae*

วงศ์นี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP มีน้ำตาล madurose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ สมาชิกในวงศ์นี้มีความหลากหลาย ใช้จำนวนสปอร์ การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ และการสร้างสายสปอร์บนก้านชูสปอร์เป็นเกณฑ์ในการแบ่งจินัส สมาชิกในวงศ์นี้ส่วนใหญ่สร้างสายสปอร์หรืออับสปอร์บนเส้นใยอากาศ จินัสที่สร้างสปอร์สายสั้น ๆ และสปอร์ไม่เคลื่อนที่ ได้แก่ *Microbispora* (2 สปอร์) และ *Microtetraspore* (4 สปอร์) จินัสที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์และสปอร์เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Planobispora* (สองสปอร์เรียงต่อกันตามยาวในอับสปอร์รูปกระบอก) และ *Planomonospora* (หนึ่งสปอร์อยู่ในอับสปอร์รูปทรงกระบอก) จินัส *Streptosporangium* สร้างสปอร์เป็นสายจำนวนมากเรียงต่อกันขดเป็นวงอยู่ในอับสปอร์ทรงกลม สปอร์ไม่เคลื่อนที่

#### 7. *Streptomycetaceae*

วงศ์นี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย L-DAP หายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic) เป็น chemoorganotrophic เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดที่สุดในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ จินัส *Streptomyces* สร้างเส้นใยอาหารแตกแขนงและแตกหักเล็กน้อย สร้างสายสปอร์ยาว (มากกว่า 50 สปอร์) บนเส้นใยอากาศที่เจริญเต็มที่ สายสปอร์อาจมีลักษณะโค้ง ปลายงอเหมือนตะขอ ปลายม้วนเป็นวง ขดเป็นเกลียว ผิวสปอร์อาจเรียบ ขรุขระ มีหนามหรือมีขน มีจำนวนน้อยที่สร้างสปอร์สายสั้น หรืออาจจะมีโครงสร้างคล้าย Sclerotia, pycnidia, sporangia และ synnemata จินัส *Streptoverticillium* สร้างเส้นใยอากาศเป็นสายตรง มีก้านชูสปอร์แตกแขนงออกเป็นวง (verticils) รอบเส้นใยหลัก ปลายก้านชูสปอร์สร้างสปอร์สายสั้นหลายสาย ผิวสปอร์เรียบ หรือขรุขระเล็กน้อย

#### 8. กลุ่มอื่น ๆ

เป็นจินัสที่ไม่สามารถจัดเข้าในกลุ่มอื่นได้ เช่น *Frankia* สร้างเฉพาะเส้นใยอาหาร อาศัยอยู่ในปมรากพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่วทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจน, *Geodermatophilus* เซลล์มีลักษณะกลมถึงสี่เหลี่ยมแบ่งเซลล์โดยการสร้างผนังกันตามยาวและตามขวาง, *Nocardiopsis* สร้างสปอร์สายยาวบนเส้นใยอากาศ, *Kineosporia* สร้างโครงสร้างคล้ายอับสปอร์รูปกระบอกบนเส้นใย



อาหาร, *Spirillospora* สร้างสายสปอร์ขดอยู่ในอับสปอร์รูปกลมบนเส้นใยอากาศ สายสปอร์มีการแตกแขนง, *Sporichthya* มีความแตกต่างจากลักษณะของแอกติโนมัยซีทีสตามปกติ คือไม่สร้างเส้นใยอาหาร สร้างแต่เส้นใยอากาศสายสั้นที่แบ่งตัวเป็นรูปแท่ง, *Actinocorallia* สร้างสปอร์สายยาวเป็นกลุ่มที่ปลายก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงจากเส้นใยอาหาร, *Actinobisposa* สร้างสปอร์รูปไข่ 2 สปอร์เรียงต่อกันตามยาวบนเส้นใยอาหาร อาจมีการสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศที่สร้างขึ้นอย่างเบาบาง, *Glycomyces* สร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศที่ไม่มีการแตกหัก สร้างสปอร์สายสั้น, *Thermoactinomyces* สร้างสปอร์เดี่ยวทั้งบนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ภายในสปอร์ประกอบด้วย dipicolinic acid ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูงเหมือนกับ endospores ใน แบคทีเรีย สกุล *Bacillus* ซึ่ง *Thermoactinomyces* มีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีนและไซโตซีน ใน DNA น้อยกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rRNA มีความใกล้เคียงกับ จีโนม *Bacillaceae* มากกว่าแอกติโนมัยซีทีส

## 2.5 ความต้องการสารอาหารของแอกติโนมัยซีทีส

แอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มมีความต้องการสารอาหารแตกต่างกันอย่างมาก บางกลุ่มสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน แต่บางกลุ่มเจริญได้เฉพาะอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน นอกจากนี้แอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มยังสามารถปรับตัวให้ใช้สารอาหารได้หลากหลายอีกด้วย โดยปริมาณการสร้างเซลล์ของแอกติโนมัยซีทีสจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารที่เชื่อได้รับ อาหารเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีสมีทั้งแบบสังเคราะห์และแบบที่ใช้สารอินทรีย์ในธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ถูกใช้เพื่อการศึกษารูปร่างลักษณะของแอกติโนมัยซีทีส ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อแบบสารอินทรีย์มักถูกใช้เพื่อจุดประสงค์เฉพาะ เช่น ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Streptomyces griseus* เพื่อผลิต streptomycin ภายในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ต้องใช้เวลาที่ยาวนานและได้ผลผลิตต่ำ

### แหล่งคาร์บอน

แอกติโนมัยซีทีสสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ทั้งสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนและไม่ซับซ้อน โดยสารอินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ กรดอินทรีย์ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส โปรตีน โพลีเปปไทด์ และกรดอะมิโน เป็นต้น แอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มสามารถใช้สารประเภทอื่นได้ เช่น ไขมัน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน สารประกอบที่มีวงเบนซีน หรือสารที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ลิกนิน แทนนิน และยาง เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยแอกติโนมัยซีทีสจะเลือกแหล่ง

อาหารที่ใช้ได้ง่ายมาใช้ในการเจริญก่อน โดยแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ได้แก่ กลูโคส มอลโตส เดกซ์ตริน แป้ง กลีเซอรอล กรดอินทรีย์ และโปรตีน รองลงมาได้แก่ ซูโครส และน้ำตาลประเภทอื่น ๆ (Cohn, 1943) โดยทั่วไปแอกติโนมัยซีทีสมักใช้โปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน มากกว่าคาร์โบไฮเดรต ซึ่งทดสอบได้ด้วยการเติมโปรตีน หรืออนุพันธ์ของโปรตีน เช่น เปปโตน และเติมกลูโคส หรือคาร์โบไฮเดรตประเภทอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน พบว่าแอกติโนมัยซีทีสจะใช้โปรตีนเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนก่อน โดยจะขับของเสียออกมาในรูปของแอมโมเนียจำนวนมาก (Waksman และ Lomaniz, 1925)

คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วยังมีบทบาทเป็นสารบัฟเฟอร์อีกด้วย เนื่องจากถ้ามีเฉพาะโปรตีนหรืออนุพันธ์ของโปรตีนทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว จะทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียอย่างรวดเร็วจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีภาวะเป็นด่างสูงเกินกว่าที่เชื้อจะเจริญได้ จากปัจจัยดังกล่าวทำให้กลูโคสเข้ามา มีบทบาทสำคัญในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส แม้ว่าในอาหารจะมีโปรตีนหรือเปปโตนอยู่แล้วก็ตาม เพราะการย่อยสลายกลูโคสจะก่อให้เกิดกรด ซึ่งสามารถใช้ในการปรับสมดุลกับแอมโมเนียที่ถูกสร้างขึ้นจากการย่อยสลายโปรตีนได้ (Waksman, 1950) กรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดออกซาลิก (oxalic acid) กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) เป็นสารประกอบคาร์บอนที่ไม่ค่อยดีนักต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส ในขณะที่กลีเซอรอล แมนนิทอล และแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีมากของการเจริญของเชื้อ (Lechevalier, 1967) จากการที่แอกติโนมัยซีทีสสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายประเภท จึงสามารถใช้คุณสมบัติดังกล่าวเป็นเกณฑ์ในการจำแนกแอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มได้ โดยเฉพาะใน *Streptomyces* เกือบทุกชนิดสามารถใช้กลูโคส แมนนิส แป้ง เดกซ์ตริน และกลีเซอรอลได้ (Pridham และ Gottlieb, 1948)

### แหล่งไนโตรเจน

แอกติโนมัยซีทีสไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ได้ ดังนั้น โปรตีน เปปโตน หรือกรดอะมิโน จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ รองลงมาคือ ไนเตรทและเกลือของแอมโมเนียม โดยไนเตรทถูกจัดให้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่าเกลือของแอมโมเนียมเนื่องจากไนเตรททำให้เกิดประจุลบ แต่เกลือของแอมโมเนียมจะให้ประจุบวก ซึ่งไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส นอกจากนี้ยังพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตจะถูกใช้ได้ดีกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ (Waksman และ Lomanitz, 1925) แอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มสามารถย่อยสลายโปรตีนได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น บางกลุ่มสามารถย่อยสลายเจลาติน บางกลุ่มสามารถ

สร้างเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic) ซึ่งจะตกตะกอนโปรตีนในนมได้ (Sykes และ Skinner, 1973)

### แร่ธาตุ

แอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มสามารถใช้แร่ธาตุ เช่น ฟอสฟอรัส โปแทสเซียม และ แมกนีเซียมได้ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ในขณะที่ความต้องการซัลเฟอร์ แคลเซียม และ เหล็กนั้นยังไม่มีที่ยืนยันที่แน่นอน แต่พบว่าแอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มสามารถเจริญได้ดีเมื่อเติม ธาตุเหล็กลงไปในการเลี้ยงเชื้อ และมีรายงานว่าสังกะสีมีบทบาทสำคัญในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มด้วย แร่ธาตุเหล่านี้แม้จะต้องการในปริมาณน้อย แต่ก็เป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้ สำหรับการเจริญของเชื้อ (Pridham และ Gottlieb, 1948)

Gesheva และคณะ (2004) ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่ม nonpolyenic macrolide ใน *Streptomyces hygroscopicus* 111-81 พบว่า ใช้แล็กโทส หรือ กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมจากแหล่งเดิมคือกากถั่วเหลือง เติมแร่ธาตุที่จำเป็น คือ แมงกานีส คอปเปอร์ และซัลเฟอร์ ในปริมาณน้อย ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเป็น 6 เท่า จากอาหารสูตรเดิม

## 2.6 การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีส

พบแอกติโนมัยซีทีสได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ในดินสามารถพบแอกติโนมัยซีทีสเป็นที่สองรองจากแบคทีเรีย (Sykes และ Skinner, 1973) ซึ่งดำรงชีวิตแบบ saprophytic เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลาย biopolymers ที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ เช่น ลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพคติน เคราติน และไคติน เป็นต้น สภาพที่เน่าเปื่อยผุพังของอินทรีย์วัตถุในมูลสัตว์ เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส ซึ่งนอกจากในดินแล้ว มูลสัตว์เป็นอีกแหล่งหนึ่งซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งสำหรับแยกแอกติโนมัยซีทีสได้ โดยมีรายงานสนับสนุนดังนี้ Zaher และคณะ (1952) แยก *Streptomyces griseus* ได้จากมูลสัตว์ ซึ่งสายพันธุ์ที่แยกได้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งโปรโตซัวได้ 3 ชนิดคือ *Herpetomonas culicidarum*, *Euglena gracilis* และ *Tetrahymena gelleii* Kuo และ Hartman (1966) แยก *Thermoactinomyces vulgaris* ได้จากมูลสัตว์ตามแหล่งต่าง ๆ ในรัฐไอโอวา (Iowa) ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยสายพันธุ์ที่แยกได้เป็น thermophilic actinomycete ที่มีความสามารถในการ

สร้างเอ็นไซม์อะไมเลส Weiner และ Rhodes (1974) แยก *Streptomyces* ได้จากมูลวัว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Salts-Starch Agar Sykes และ Skinner (1973) สามารถแยก *Streptosporangia* ได้จากมูลสัตว์ซึ่งสายพันธุ์นี้พบได้น้อยในสิ่งแวดล้อม Ohta และ Ikeda, (1978) แยก *Streptomyces griseus* และ *Streptomyces antibioticus* ได้จากมูลสัตว์และพบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุและสารที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น (malodor agent) Mara และ Oragui (1981) แยกแอกติโนมัยซีทีสจิ้งจอก *Micromonospora*, *Streptomyces* และสายพันธุ์ *Rhodococcus coprophilus* ได้จากมูลสัตว์กินพืช (herbivore dung) ได้แก่ วัว, เกาะ, ม้า, ไก่ และ ห่าน Nedwell และคณะ (1993) แยก *Micromonospora* spp. ได้จากมูลม้า Ouhdouch และคณะ (1996) สามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้จากมูลสัตว์ในประเทศโมร็อกโก (Morocco) ซึ่งสายพันธุ์ที่แยกได้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* และ *Pythium irregulare* ได้ Ouhdouch และคณะ (2001) สามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้จากมูลแพะและมูลอูฐ ซึ่งสายพันธุ์ที่แยกได้สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Candida tropicalis*, *Candida albican* และ *Pythium irregulare* Lee (2006) แยก *Amycolatopsis sulphurea* และ *A. albidoflavus* ได้จากมูลค้างคาวที่อยู่ในถ้ำบน เกาะ Jeju ประเทศเกาหลี แอกติโนมัยซีทีสในมูลสัตว์อาจได้มาจาก micro flora ของพืชอาหารสัตว์ (actinomycetes endophyt) หรืออยู่ในอาหารแห้งสำหรับปศุสัตว์ เช่น หญ้าแห้ง ฟางแห้ง และ เมล็ดพืช โดยมีรายงานสนับสนุนว่าพบแอกติโนมัยซีทีสจิ้งจอก *Streptomyces*, *Micromonospora*, และ *Nocardia* อยู่บริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ พบ *Thermomonospora* ในฟางหมักและในมูลสัตว์ที่มีเซลลูโลสสูง (Gesheva, 2001) จึงมีวิธีแยกแอกติโนมัยซีทีสจากมูลสัตว์ดังรายงานต่อไปนี้

Ouhdouch และคณะ (1996) แยก Actinomycetes จากมูลสัตว์ในประเทศโมร็อกโกโดยนำมูลสัตว์มาเจือจางใน 0.9%NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้มูลสัตว์ละลายเข้ากัน (homogenize) โดยใช้คลื่นเสียง (sonicate) เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นบีบเค้นสารละลายมูลสัตว์เกลี่ยลงบน ผิวน้ำอาหาร Olson Agar

Nedwell และคณะ (1993) แยก *Micromonospora* spp. ได้จากมูลม้า โดยนำก้อนมูลม้าที่แห้งแล้วล้างบริเวณภายนอกด้วยแอลกอฮอล์ ตัดเอาชิ้นส่วนข้างในก้อนหนัก 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บดให้มูลสัตว์กระจายเข้ากับน้ำโดยใช้เครื่อง homogenizer เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเจือจางสารแขวนลอยมูลสัตว์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บีบเค้นสารแขวนลอยมูลสัตว์เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Casein-peptone-starch Agar (pH 7.0) ที่เติม cycloheximide 50 ug/ml

Mara และ Oragui (1981) แยกแอกติโนมัยซีทีสจิ้งนัส *Micromonospora*, *Streptomyces* และสายพันธุ์ *Rhodococcus coprophilus* ได้จากมูลสัตว์กินพืช ซึ่งทำการแยกโดยซังมูลสัตว์ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและทำการเจือจางจนถึงระดับ  $10^{-5}$  จากนั้นนำสารละลายมูลสัตว์แต่ละระดับการเจือจางแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ  $55^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที เพื่อลดจำนวนแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่แอกติโนมัยซีทีส จากนั้นปิเปตสารละลายมูลสัตว์เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร MM3 Agar (pH 7.0) ที่เติม nalidixic acid 5 mg/L, sodium azide 3.5 mg/L และ cycloheximide 50 ug/ml

Ohta และ Ikeda (1978) แยก *Streptomyces griseus* และ *Streptomyces antibioticus* จากมูลสัตว์โดยตากมูลสัตว์ให้แห้ง บดเป็นผง ซัง 1 กรัม นำมาเจือจางใน 0.9% NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยให้ตะกอนหยาบตกตะกอน 10 นาที ปิเปตสารละลายเจือจางเกลี่ยบนผิวหน้าของอาหาร Pig Feces Extract Agar (pH 7.3)

Kuo และ Hartman (1966) แยก *Thermoactinomyces vulgaris* จากมูลสัตว์โดยนำมูลสัตว์มาตากให้แห้งแล้วเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นปิเปตสารละลายมูลสัตว์เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase-yeast extract-dung extract-salts Agar ที่เติม penicillin G 1.0 ug/ml บ่มที่อุณหภูมิ  $55^{\circ}\text{C}$

Zaher และคณะ (1952) แยก *Streptomyces griseus* จากมูลสัตว์ โดยนำมูลสัตว์ไปตากแห้งแล้วบดให้ละเอียด ละลายใน 0.85% NaCl เขย่าให้มูลสัตว์ละลายที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที ตั้งพักไว้ให้กากมูลสัตว์ตกตะกอน ปิเปตสารละลายมูลสัตว์เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร Glucose-asparagine และ Glucose-peptone Agar (pH 7.0) ที่เติม cycloheximide 50 ug/ml

แอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้ส่วนใหญ่ 95 % คือจิ้งนัส *Streptomyces* ซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นสกุลอื่นๆ จึงจัดเป็นแอกติโนมัยซีทีสที่พบได้ยาก (rare actinomycetes) เช่น *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Streptosporangium*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Planomonospora*, และ *Planobispora* (Lazzarini และคณะ, 2000) จึงมีวิธีที่จำเพาะในการแยกแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มนี้ดังนี้

Boudjella และคณะ (2005) แยกจิ้งนัส *Streptosporangia* จากดินในทะเลทราย Sahara (Saharan) โดยการนำดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อด้วยน้ำ

กลั่นฆ่าเชื้อ บีเปตสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Citin-B Vitamins Agar ที่เติม kanamycin 25 ug/ml และ cycloheximide 50 ug/ml

Zitouni และคณะ (2005) แยกจีโนม *Nocardiosis* และ *Saccharothrix* จากดินในทะเลทราย Sahara (Saharan) โดยนำดินมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วบีเปตสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ มาเกลี่ยลงบนผิวหน้าของ Humic-Vitamin-B- Agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin 10 ug/ml, หรือ erythromycin 10 ug/ml และ chloramphenicol 25 ug/ml

Suzuki และคณะ (2001) แยกจีโนม *Planomonospora* จากดิน โดยใช้อาหาร Humic acid-trace salts gellan gum (pH9) เป็นอาหารที่ใช้คัดเลือก ซึ่ง *Planomonospora* จะสร้างอับสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถแยกสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้จากอับสปอร์โดยใช้ 0.1% skim milk 5 mM *N*-cyclohexyl-2-amino-ethanesulfonic acid (CHES) pH9 เป็นสารละลายในการล้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ออกมา จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 °C เป็นเวลา 90 นาที แยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที วิธีนี้สามารถแยกสกุล *Planomonospora* ได้ 246 สายพันธุ์จากดินตัวอย่างทั้งหมด 1,200 ตัวอย่าง

Suzuki และคณะ (2000) แยกจีโนม *Actinobispora* จากดิน โดยการอบดินตัวอย่างที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.85% NaCl 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสปอร์ เจือจางสายละลายสปอร์ด้วย 0.85% NaCl และนำมาเกลี่ย (spread) บนผิวหน้าอาหาร Humic acid-Vitamin Gellan Gum ที่เติมสารปฏิชีวนะ leucomycin 1 ug/ml, nivobiocin 1 ug/ml, tuniamycin 0.5 ug/ml, cycloheximide 50 ug/ml และ nystatin 50 ug/ml การใช้วิธีนี้สามารถแยกสกุล *Actinobispora* ได้ 18% ของตัวอย่างดิน

Suzuki และคณะ (1999) แยกจีโนม *Sporichthya* จากดิน จีโนมนี้มีการสร้าง zoospore นำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 60 นาที เพื่อลดจำนวนของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่แอกติโนมัยซีทีส จากนั้นเติมสารละลาย 0.1% skim milk ใน 10 mM MOPs (morpholinepropanesulfonic acid) pH8 ในดินที่อบแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 60 นาที แยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที เจือจางสปอร์ใน 0.85% NaCl นำสารละลายสปอร์ เกลี่ยบนอาหาร Humic acid-Vitamin Agar (HVG)

Hayakawa และคณะ (1996) แยก *Microtetraspora glauca* จากดิน โดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บีเปต

สารละลายดิน 0.5 มิลลิลิตร ที่ระดับการเจือจาง  $10^{-1}$  เติมนลงในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (5 mmol/l, pH7.0) 5 มิลลิลิตร ที่มีการเติม benzethonium 0.05% บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร LSV-SE Agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin 20 mg/L, norfloxacin 20 mg/L และ nalidixic acid 10 mg/L

Hayakawa และคณะ (1995) แยก *Actinomadura viridis* จากดิน โดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 60 นาที เจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.0 % นำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร Humic acid-Vitamin Agar ที่ผสม kanamycin, josamycin, lysozyme และ nalidixic acid

Hayakawa และคณะ (1991) แยก *Streptosporangium*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora* และ *Microbispora* จากดินโดยแต่ละจีโนมส์โดยทำ pretreatment แตกต่างกัน คือ *Streptosporangium* ทำการแยกโดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 60 นาที เจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม benzethonium chloride (BC) 0.01% นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L และ leucomycin 1 mg/L จีโนมส์ *Dactylosporangium* แยกโดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม benzethonium chloride (BC) 0.03% นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV Agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L และ tunicamycin 10 mg/L จีโนมส์ *Micromonospora* แยกโดยนำดินตัวอย่างมาตากลม แล้วเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.5 % นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV Agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L และ tunicamycin 20 mg/L จีโนมส์ *Microbispora* แยกโดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.5 % และ chlorhexidine gluconate 0.03% นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV Agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L

จากรายงานข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าการแยกแอกติโนมัยซีทีส ในสกุลที่จำเพาะนั้น ต้องมีการทำ pretreatment อาจทำโดยการอบดินด้วยความร้อน หรือใช้สารเคมีเพื่อทำลายเซลล์ vegetative ของแบคทีเรีย และใช้อาหารที่จำเพาะต่อสายพันธุ์นั้น ๆ อาจมีการเติมสารปฏิชีวนะในความเข้มข้นที่สายพันธุ์นั้นต้านทานได้ และสามารถยับยั้งสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการ เช่นการเติมสารปฏิชีวนะเพื่อลดจำนวนของ *Streptomyces* ที่เป็นประชากรหลักในดิน นอกจากนี้การเติมสาร

บางอย่างสามารถกระตุ้นการเจริญของแอคติโนมัยซีทีส โดยพบว่าการเติมไคตินเป็นการเพิ่มจำนวนแอคติโนมัยซีทีสในดินมากขึ้น (Gryndler และคณะ, 2003)

## 2.7 สารปฏิชีวนะ (Antibiotics)

สารปฏิชีวนะหมายถึงสารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ โดยส่วนมากจะเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีมวลโมเลกุลต่ำ สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีความเข้มข้นน้อย ๆ (Demain, 1999) และจะไม่รวมถึงสารสกัดจากพืช หรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ เพราะสารเหล่านี้ใช้ความเข้มข้นสูงในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ ปัจจุบันสารปฏิชีวนะอาจรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้สารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากธรรมชาติเป็นต้นแบบ การทำงานของสารปฏิชีวนะแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbistatic และฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbicidal ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbistatic ร่างกายจะกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้ระบบการป้องกันของร่างกายคือ phagocytosis, การผลิตแอนติบอดี, การผลิต interferon เมื่อมีการติดเชื้อจากไวรัส และ กลไกการปฏิเสธรของลำไส้โดยการเกิดอาการท้องเสีย อาเจียน ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbicidal จะฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการทำให้เซลล์แตก แต่ร่างกายยังคงได้รับผลจากสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ปัจจุบันสารปฏิชีวนะในตลาดยาจำนวน 26% สกัดได้มาจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ, 38% เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่สารตั้งต้นมาจากธรรมชาติ, 4% มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยให้มีโครงสร้างเหมือนกับสารจากธรรมชาติ และ 31% มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี สารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากธรรมชาติ 63% นำมาใช้ยับยั้งแบคทีเรีย และ 61% นำมาใช้ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

### 2.7.1 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีทีส

แอคติโนมัยซีทีสเป็นแหล่งสำคัญของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ 65-75% ผลิตจากแอคติโนมัยซีทีส รองลงมาคือราและแบคทีเรีย สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีทีส 80% ผลิตจาก *Streptomyces* ดังตารางที่ 2.1 (Krsek และคณะ, 2000) และ (Kieser และคณะ, 2000) และนอกจากนั้นผลิตจากแอคติโนมัยซีทีสที่พบได้ยาก ดังตารางที่ 2.2 (El-Tarabily และ Sivasithamparam, 2005)



ตารางที่ 2.1 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	คุณสมบัติที่ยัง
<i>Actinomadura carminata</i>	Carminomycin	เซลล์มะเร็ง
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Erythromycin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces albovinaceus</i>	Rifamycin B	ไวรัส
<i>Streptomyces albus</i>	8-Azaguanine	ไวรัส
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tetracycline	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicidin	รา
<i>Streptomyces griseus</i>	Cycloheximide	รา
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin	แบคทีเรีย
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Rifamicins	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotericin B	รา
<i>Streptomyces noursei</i>	Nystatin	รา
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Vancomycin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces peucetius</i>	D Daunorubicin HCL	เซลล์มะเร็ง
<i>Streptomyces rimosus</i>	Oxytetracycline	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphenicol	แบคทีเรีย, ไวรัส
<i>Streptomyces verticillus</i>	Bleomycin sulfate	เซลล์มะเร็ง
<i>Streptomyces spp.</i>	Actinomycin D	เซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	คุณสมบัติที่ยัง
<i>Nocardia lactamdurans</i>	Cephamycin C	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces orchidaceae</i>	Cycloserine	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces roseosporus</i>	Daptomycin	แบคทีเรีย
<i>Micromonospora olivoasterospora</i>	Fortimicin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces</i> spp.	Fosfomycin	แบคทีเรีย
<i>Micromonospora</i> spp.	Gentamicin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lincomycin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces argillaceus</i>	Mithramycin	เซลล์มะเร็ง
<i>Streptomyces verticillatus</i>	MitomycinC	เซลล์มะเร็ง
<i>Streptomyces nataensis</i>	Natamycin	รา
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomycin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces tendae</i>	Nikkomycin	รา
<i>Nocardia uniformis</i>	Norcardicin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces niveus</i>	Novobiocin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Oleandomycin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces verticillus</i>	Phleomycin	เซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	คุณสมบัติที่ยัง
<i>Streptomyces cacaoi</i> var. <i>asoensis</i>	Polyoxins	รา
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	Pristinamycin	แบคทีเรีย
<i>Nocardia lurida</i>	Ristocetin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces spectabilis</i>	Spectinomycin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces amofaciens</i>	Spiramycin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces graminofaciens</i>	Streptogramins	แบคทีเรีย
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Teichoplanin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces cattleya</i>	Thienamycin	แบคทีเรีย
<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Tobramycin	แบคทีเรีย

ตารางที่ 2.2 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสที่พบได้ยาก

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	อ้างอิง
<i>Actinoplanes</i> sp	Xanthone	Cooper และคณะ (1992)
<i>Actinoplanes</i> sp	Sch 54445	Min และคณะ (1997)
<i>A. brasiliensis</i>	A/672	Palleroni (1989)
<i>A. caeruleus</i>	Heptaene	Palleroni (1989)
<i>A. deccanensis</i>	Lipiarmycin	Palleroni (1989)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีตที่พบได้ยาก

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	อ้างอิง
<i>A. ianthinogenes</i>	Naphthoquinone	Palleroni (1989)
<i>A. ferrugineus</i>	L-azetidine-2-carboxylic acid	Palleroni (1989)
<i>A. missouriensis</i>	5-azacytidine	Palleroni (1989)
<i>A. philippinensis</i>	Macrocyclic lactone	Palleroni (1989)
<i>A. teichomyceticus</i>	Lipoglycopeptide	Carelli และคณะ (1995)
<i>A. utahensis</i>	Echinocandin	Boeck และคณะ (1989)
<i>Actinomadura madurae</i>	Simaomicin	Maiese และคณะ (1990)
<i>Actinomadura hibisca</i>	Pradimicin FA-1	Sawada และคณะ (1990)
<i>Microbispora</i> sp.	SCH 31828	Patel และคณะ (1988)
<i>Microbispora</i> sp.	Glucosylquestiomycin	Igarashi และคณะ (1998)
<i>Micromonospora</i> sp.	Spartanamicins	Nair และคณะ (1992)
<i>Micromonospora</i> sp.	Rustmicin	Sigmund และ Hirsch (1998)
<i>Micromonospora</i> sp.	Micromonosporin	Thawai และคณะ (2004)
<i>M. carbonacea</i>	Everninomicin	Kawamoto (1989)
<i>M. coerulea</i>	Glutarimide	BeomSeok และคณะ (1999)
<i>M. echinospora</i>	Gentamicin	Kawamoto (1989)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีทีสที่พบได้ยาก

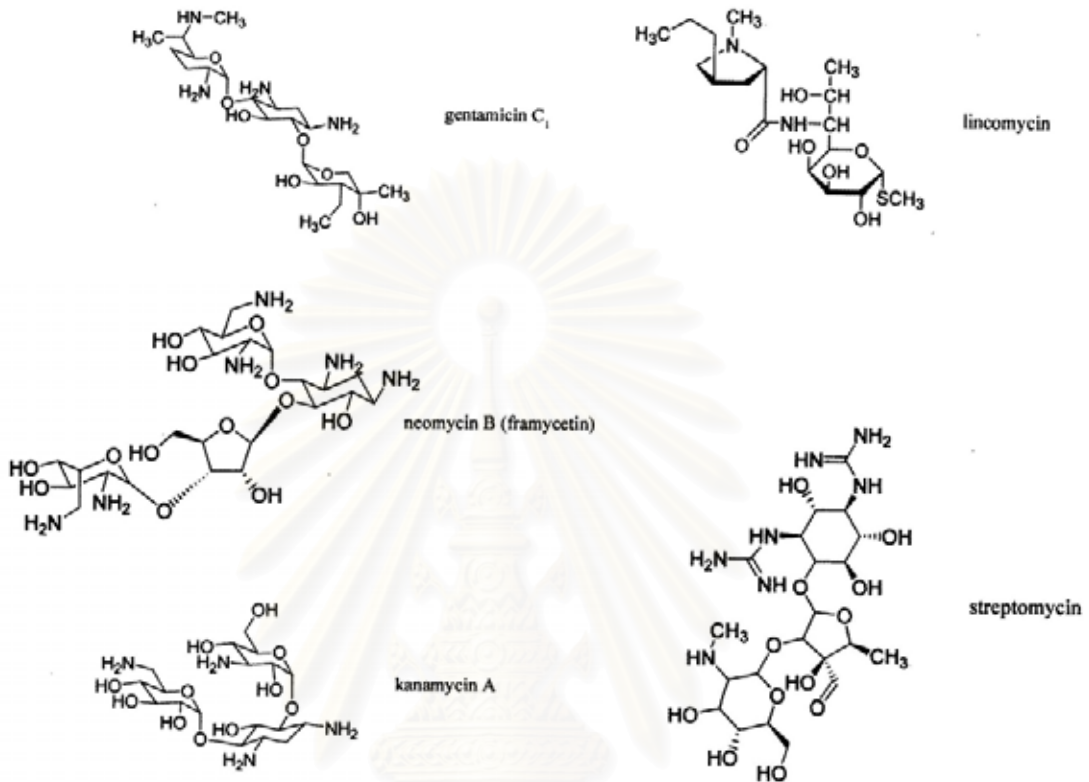
สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	อ้างอิง
<i>M. echinospora</i>	Hazimicins	Marquez และคณะ (1983)
สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ	อ้างอิง
<i>M. halophytica</i>	Halomicin	Kawamoto (1989)
<i>M. inositola</i>	XK-41	Kawamoto (1989)
<i>M. olivasterospora</i>	Fortimicin	Kawamoto (1989)
<i>Microtetraspora</i>	SCH 42282	Hegde และคณะ (1998)
<i>Saccharothrix</i> sp.	Formamicin	Igarashi และคณะ (1997)
<i>Spirillospora</i> sp.	HM17	Hacene และคณะ (1994)
<i>Spirillospora</i> sp.	H107	Hacene และคณะ (2000)
<i>Streptosporangium albidum</i>	Aculeximycin	Ikemoto และคณะ (1983)
<i>Streptosporangium roseum</i>	AH7	Hacene และคณะ (1998)
<i>Streptoverticillium album</i>	Quinaldopeptin	Toda และคณะ (1990)
<i>Streptoverticillium cinnamoneum</i>	HA-94	Paradkar และคณะ (1998)

## 2.7.2 กลุ่มของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีทีส

### 1. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides

สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย amino sugar ที่เชื่อมกันแบบ glycoside linkage มีกลไกการออกฤทธิ์แบบ bactericide ยับยั้งการแปลรหัส (translation) ของ mRNA โดยจับกับไร

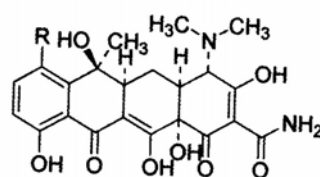
ไบโไซมของแบคทีเรียเป็นผลให้การสังเคราะห์โปรตีนถูกยับยั้ง ได้แก่ streptomycin, neomycin B, kanamycin A, gentamycin C<sub>1</sub>, lincomycin, amikacin, netilmicin, และ tobramycin ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides แสดงดังรูปที่ 2.8



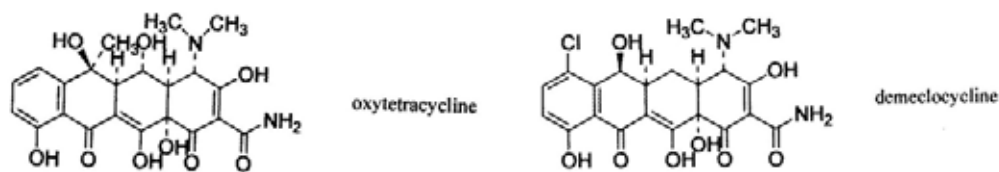
รูปที่ 2.8 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides (Sneader, 2005)

## 2. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline

สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย hydronaphthacene nucleus ที่มีวงต่อกัน 4 วง กลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriostatic กับจุลินทรีย์แบบ broad-spectrum ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึงเป็น bactericide ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยจับกับ 30S ไรโบไซมของแบคทีเรีย และรบกวนการเข้ามาจับของ tRNA ได้แก่ chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline และ demeclocycline ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline แสดงดังรูปที่ 2.9



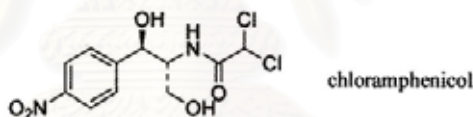
tetracycline, R = H  
chlortetracycline, R = Cl



รูปที่ 2.9 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline (Sneader, 2005)

### 3. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Chloramphenicol

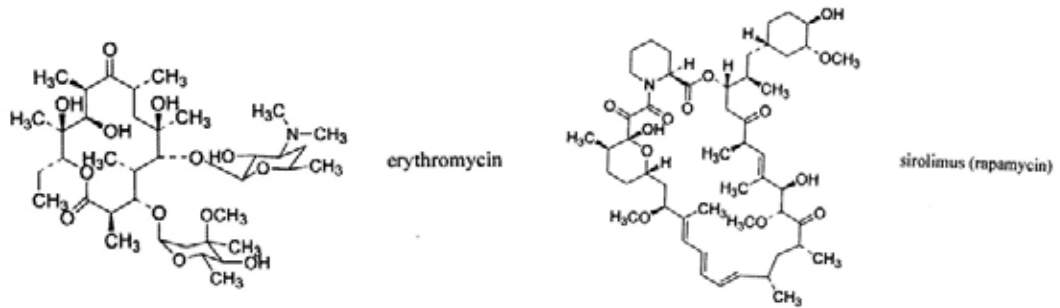
สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย วงอะโรมาติกอยู่ปลายด้านหนึ่งและปลายอีกด้านหนึ่งเป็น acyl side chain ส่วนตรงกลางสามารถขยายได้ กลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriostatic กับจุลินทรีย์แบบ broad-spectrum ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยจับกับ 50S ไรโบโซมของแบคทีเรีย และยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ peptidyl transferase ทำให้ไม่เกิดการต่อกันของสายเปปไทด์ ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม chloramphenicol แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม chloramphenicol(Sneader,2005)

### 4. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide

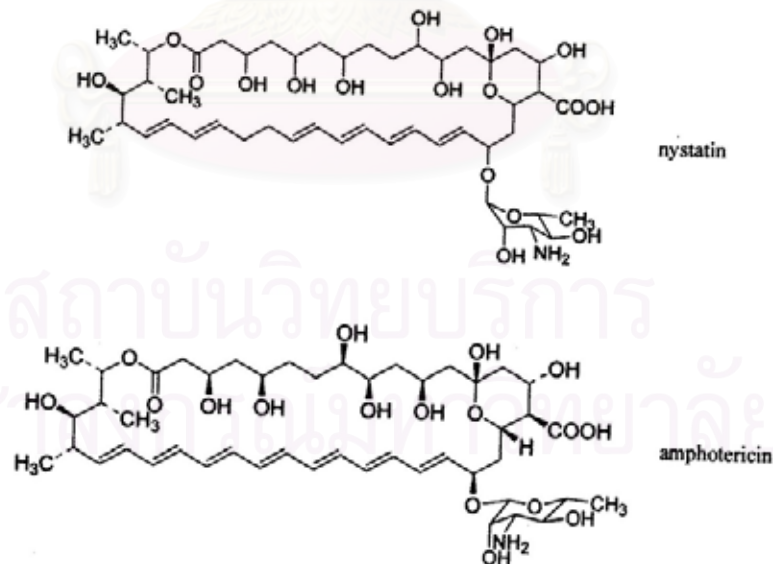
สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่ประกอบด้วย อะตอมมากกว่า 20 อะตอมขึ้นไปโดยมี macrocyclic lactone ring เป็นองค์ประกอบ กลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriostatic กับจุลินทรีย์ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยจับกับ 50S ไรโบโซมของแบคทีเรีย ได้แก่ erythromycin, rapamycin, tacrolimus และ abamectin ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide แสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide (Sneader, 2005)

### 5. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Polyene

สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ เป็นสารประกอบขนาดใหญ่ ประกอบด้วย ส่วนที่ชอบน้ำคือส่วน hydroxylate และส่วนที่เป็น lipophilic กลไกการออกฤทธิ์มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจับกับ ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย คุณสมบัติ selective permeability เสียไปทำให้เซลล์สูญเสียประจุ ได้แก่ nystatin และ amphotericin ทั้งสองชนิดมีขอบเขตการยับยั้งเหมือนกันคือยับยั้งการเจริญของยีสต์และราต่าง ๆ แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรีย ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene แสดงดังรูปที่ 2.12

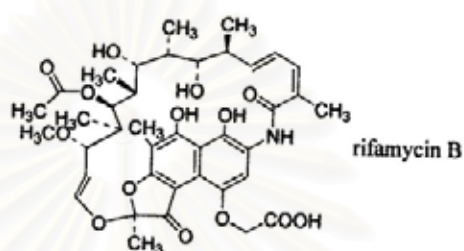


รูปที่ 2.12 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene (Sneader, 2005)



## 6. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Rifamycin

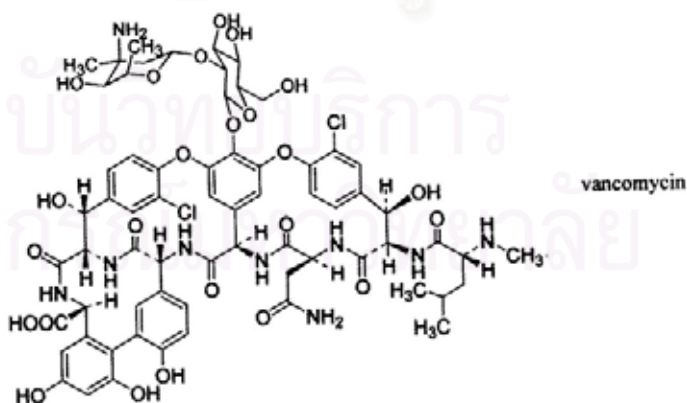
ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โดยจับกับเอ็นไซม์ DNA-dependent RNA polymerase เป็นเหตุให้สาย RNA ที่ระบรหัสโปรตีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนไม่ถูกสร้างขึ้น ทำให้สังเคราะห์โปรตีนไม่ได้ ได้แก่ rifamycin B และ rifamycin SV สารปฏิชีวนะทั้งสองชนิดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้ง *Mycobacterium tuberculosis*, *M leprae* และยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้บางชนิด ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin แสดงดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin (Sneader, 2005)

## 7. สารปฏิชีวนะกลุ่ม Vancomycin

ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยขัดขวางการจับกันของ muramyl pentapeptides ยับยั้งแกรมบวก และ Staphelococci ที่ดื้อยา ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะแสดงดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม vancomycin (Sneader, 2005)

### 2.7.3 กลุ่มของสารที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งแบ่งตามโครงสร้าง

(Georgopapadakou, 1995)

1. **Alkylating Agent** สารกลุ่มนี้ไปปล่อยประจุบวกเข้ารบกวน DNA ทำให้โครงรูป (conformation) ของ DNA เปลี่ยนไป (DNA adducts) ทำให้ DNA ของเซลล์มะเร็งทำงานผิดปกติ เช่น melphalan ใช้รักษา myeloma และ solid tumour และ cyclophosphamide ใช้รักษา breast cancer และมะเร็งชนิดอื่น

2. **Platinum Complexes** สารกลุ่มนี้จะจับกับเบสในสาย DNA และ RNA ด้วยพันธะโควาเลนต์ ทำให้เกิด platinum-DNA adducts ทำให้โครงรูปของสาย DNA เปลี่ยนไป เช่น cisplatin และ carboplatin ใช้รักษา testicular, lung, bladder, head และ neck cancer

3. **Antimetabolites** สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึง (structural analog) กับสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ DNA และ RNA เช่น methotrexate จับกับเอนไซม์ dihydrofolate reductase ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เบส purine และมีผลยับยั้งต่อการสังเคราะห์ DNA

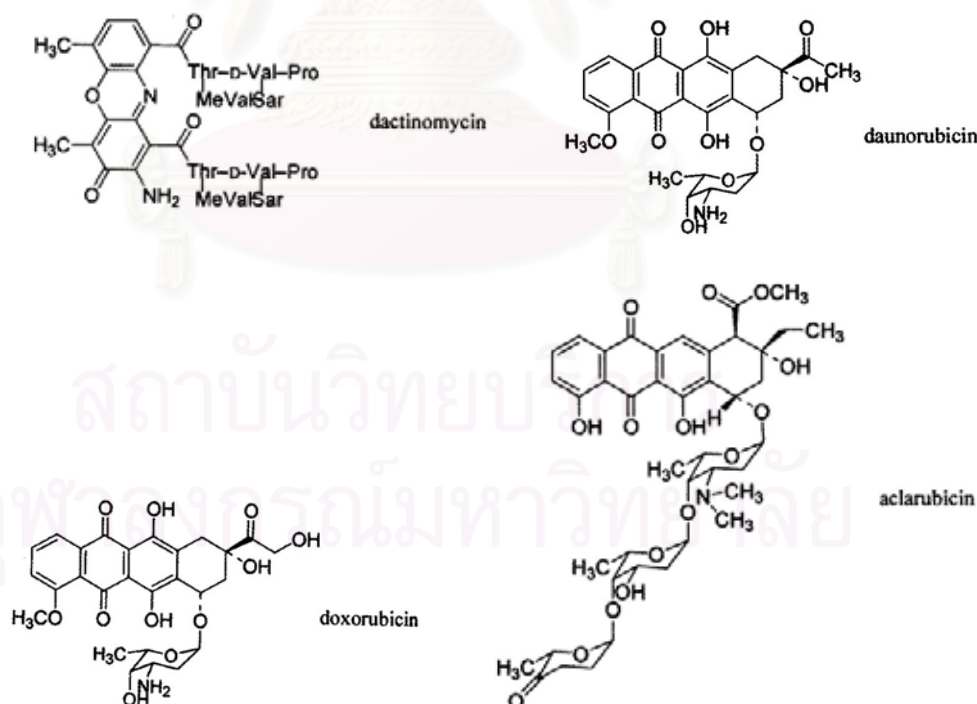
4. **Vinca Alkaloids and Taxol** สารกลุ่มนี้ยับยั้งการรวมตัวกันของ microtubule ในการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ในยูคาริโอต เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการรวมตัวกันของ microtubule ในการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็ง

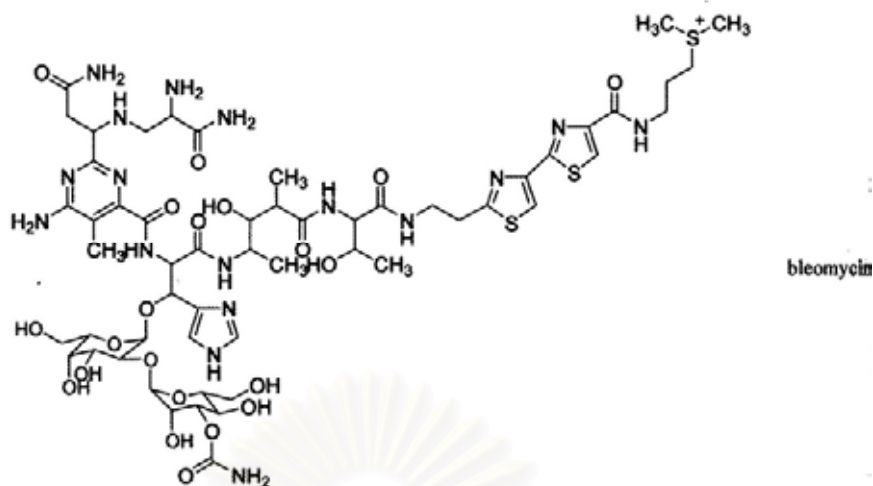
5. **Dactinomycin และ Anthracyclin** สารสองกลุ่มนี้ผลิตจาก *Streptomyces* เช่น dactinomycin หรือ actinomycin D ใช้รักษามะเร็งที่พบได้ยาก เช่น nephroblastoma (Wilms' tumour) และ Ewing's sarcoma ซึ่งมีกลไกโดยแทรกเข้าไปจับตรงตำแหน่งเฉพาะภายในเกลียวของ DNA สายคู่ เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA สารปฏิชีวนะกลุ่ม anthracyclin มีกลไกโดยแทรกเข้าไปตรงระหว่างคู่เบสในสาย DNA และจับกับเอนไซม์ topoisomerase II เป็นผลให้สาย DNA แตกหักออก ส่งผลให้เซลล์ตาย

6. **Epipodophyllotoxins และ Amsacrine** รบกวนการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase II ในปฏิกิริยา DNA-resealing และแทรกเข้าไปจับในสาย DNA ทำให้เกิดการแตกหักของ DNA ออกเป็นสายคู่ หรือสายเดี่ยว

Sneider (2005) ได้อธิบายไว้ว่า การค้นหาสารต้านเซลล์มะเร็งจากธรรมชาติเริ่มต้นขึ้นเมื่อปลาย ค.ศ. 1950 เริ่มค้นพบสารกลุ่ม actinomycin หรือ dactinomycin ใน ค.ศ. 1953 ผลิตโดย *Streptomyces parvullus* มีฤทธิ์ยับยั้ง muscle tumours, soft tissue sarcomas

tumours และ kidney tumour ค้นพบ daunorubicin ในปี ค.ศ. 1962 ผลิตโดย *S. peuetius* เป็นสารต้านเซลล์มะเร็งอยู่ในกลุ่ม anthracyclin ยับยั้ง solid tumors และ leukemias ได้ซังัด มีกลไกการยับยั้งโดยไปจับกับ DNA ทำให้เซลล์ไม่มี template สำหรับการสังเคราะห์ DNA พบ doxorubicin (14-hydroxy-analogue of daunorubicin) ในปี ค.ศ. 1967 ผลิตโดย *S. peuetius* ออกฤทธิ์ซังัดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น leukaemias, lymphomas และ solid tumors doxorubicin ถูกนำมาใช้เป็นหลักในการรักษาผู้ป่วยมากกว่า 25 ปี โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเอ็นไซม์ topoisomerase II ส่งผลให้สาย DNA แตกหัก aclarubicin ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1974 ผลิตโดย *S. galilaeus* ซึ่งเป็นสารกลุ่ม anthracyclin aclarubicin A มีหลายกลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เช่น ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ topoisomerase II ต่อ DNA (Strohl และคณะ, 1997) bleomycin เป็นสารกลุ่ม glycopeptides ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1962 ผลิตโดย *S. verticillus*. ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางกับ squamous cell carcinoma, testis tumors prostatic cancer, head และ neck tumour bleomycin เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดหนึ่งในน้อยชนิดที่ไม่ส่งผลกตการสร้างเม็ดเลือดขาวในไขกระดูกของผู้ป่วย และยังใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ทางเคมีของสารต้านเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิด ตัวอย่างโครงสร้างสารต้านเซลล์มะเร็งแสดงดังรูปที่ 2.15





รูปที่ 2.15 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Sneider, 2005)

#### 2.7.4 รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแอคติโนมัยซีทีส

แม้ว่าการค้นพบสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีทีสเกิดขึ้นตั้งแต่ปี 1940 โดย Waksman และ Woodruff ซึ่งค้นพบ actinomycin (Waksman และ Woodruff, 1940) แต่การค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ยังคงต้องดำเนินต่อไป ด้วยเหตุผลต่อไปนี้คือ จุลินทรีย์ก่อโรคมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะมากขึ้น เช่น การดื้อยา methicillin ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (MRSA) การดื้อยา vancomycin ของเชื้อ Enterococci (VRE) การดื้อต่อองค์ประกอบของยาในส่วนของ  $\beta$ -lactam ของเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* และ การดื้อยา isoniazid และ rifamycin ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*, เกิดวิวัฒนาการของโรคชนิดใหม่ เช่น AIDS, Hanta virus, Legionnaires disease, Lyme disease, Nile virus, และ foodborne *Escherichia coli* O157:H7 และการดำรงอยู่ของแบคทีเรียที่ดื้อยา เช่น *Pseudomonas aeruginosa* ในคนไข้ที่เป็น cystic fibrosis และ *Acinetobacter* spp. (Strohl, 1997) รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแอคติโนมัยซีทีสมีดังนี้

Boudjella และคณะ (2005) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม glycopeptide ที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่คือ *Streptosporangia* Sg10 โดยปกติจีโนม *Streptosporangia* ผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่ม glycopeptide คือ sibiromycin และ sinefungins แต่จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีพบว่าสารปฏิชีวนะที่ *Streptosporangia* Sg10 สร้างขึ้นมีคุณสมบัติไม่ตรงกับ sibiromycin และ sinefungins สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีแต่มีฤทธิ์น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา

Zitouni และคณะ (2005) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม nucleosides ที่ผลิตจาก *Saccharothrix* มีฤทธิ์ยับยั้งรา จากที่เคยมีรายงานสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Saccharothrix* ออกฤทธิ์ยับยั้งวัชพืชเท่านั้น

Fguira และคณะ (2004) พบแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่ คือ *Streptomyces* sp. US80 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียง (98%) กับ *Streptomyces reseoflavus* ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ กลุ่ม aminoglycoside คือ flavomycin แต่จากข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปีพบว่าสารปฏิชีวนะที่ *Streptomyces* sp. US80 สร้างขึ้นมีคุณสมบัติไม่ตรงกับ flavomycin ซึ่ง *Streptomyces* sp. US80 สร้างสารปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 ชนิด และจัดอยู่ในกลุ่ม macrolide สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และรา

Sujatha และคณะ (2004) ค้นพบ สารปฏิชีวนะกลุ่ม polyketide ที่ผลิตโดย *Streptomyces psammoticus* BT-408 ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา และยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา methicillin

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

Singh และคณะ (2000) พบ Mannopeptimycins เป็นสารปฏิชีวนะไกลโคเปปไทด์แบบวง ที่ผลิตโดย *Streptomyces hygrosopicus* ออกฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococci* ที่ดื้อยา methicillin และ *Enterococci* ที่ดื้อยา vancomycin

Hoppmann และคณะ (2002) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่คือ Vancoresmycin ที่ผลิตโดย *Amycolatopsis* sp. ST101170 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อยา Vancomycin แต่ไม่มีฤทธิ์กับแบคทีเรียแกรมลบและรา

Wink และคณะ (2002) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม glycopeptide ที่ผลิตจาก แอกติโนมัยซีตที่พบได้ยาก จีนัส *Amycolatopsis* สารปฏิชีวนะมีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococci* ที่ดื้อยา methicillin

Schumacher และคณะ (2001) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม nucleosides คือ kahakamides A และ B ที่ผลิตจาก *Nocardioopsis dassonvillei* สารปฏิชีวนะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### อุปกรณ์สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) Memmert รุ่น BE600 บริษัท Jebsen and Jebsen
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> incubator) Hepa Class 100 รุ่น 311 บริษัท Thermo electron corporation
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น H1 บริษัท Lab Service Ltd, Part
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) Memmert รุ่น D06063 บริษัท Jebsen and Jessen, Germany
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) Memmert รุ่น UE600 บริษัท Jebsen and Jessen, Germany
- ตู้อบแห้งภายใต้สุญญากาศ (vacuum oven) Hotpack รุ่น บริษัท Hotpact Corporation, USA.
- เครื่องชั่งน้ำหนัก (digital scale) บริษัท Mettler Toledo
- กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ไมโครสโคป (compound microscope) Olympus รุ่น BX51 บริษัท Olympus optical Co.,Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ60 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) Olympus รุ่น CK2 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) รุ่น JEM-T220 บริษัท Jeol, Japan
- กล้องถ่ายภาพ Olympus รุ่น C5050 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc.Edison, USA

- เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-100 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
- เครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) รุ่น 77520 บริษัท Labconco, U.S.A.
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) Mettler-Toledo รุ่น S20-k บริษัท Mettler Toledo
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima, Japan
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด 0.0025 mm<sup>2</sup> ยี่ห้อ Loptik Labor บริษัท Boeco
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler) รุ่น TP 600 บริษัท TaKaRa
- ชุดตรวจสอบดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า (Electrophoresis chamber set) รุ่น Mupid-ex บริษัท Avance
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-6010 บริษัท Hsingtai
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น stratagene บริษัท Profuge
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 บริษัท Bio-tek instrument
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80°C รุ่น ULT 1786 บริษัท FORMA Scientific, USA
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) Sharp อุณหภูมิ -20°C
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
- ไมโครปิเปต (automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2µl), P10 (0.5-10µl), P20 (2-20µl), P100 (20-100µl), P1000 (0.2-1ml) บริษัท Gilsson France
- ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 1-200 µl และ 1 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครทิวบ์ (microtubes) ขนาด 1.5 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 0.2 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร บริษัท Corning Incorporated, USA



- ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well) ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
- ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
- หัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ Pore size 0.22  $\mu\text{m}$  ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
- กระดาษกรอง (cellulose acetate membrane filter) Pore size 0.45  $\mu\text{m}$  บริษัท Sartorius, Germany
- ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) รุ่น 34 HC ยี่ห้อ Taylor-Wharton Cryogenics บริษัท Harsco Corporation, USA
- ปิเปตต์แก้ว (seropipatte) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- เครื่องดูดจากปิเปตต์ (Pipette aid) ยี่ห้อ Drummond
- หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) บริษัท Corning Incorporation, USA
- TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 บริษัท Merck, Germany

### 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 Laboratory.
- *D*-แมนโนส (*D*-mamnose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- *L*-แรมโนส (*L*-rhamnose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ซูโครส (sucrose) บริษัท Merck. Germany
- ทรีฮาโลส (threhalose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไซโลส (xylose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) บริษัท Merck. Germany
- โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) 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-ธีโอนีน (*L*-theonine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- L-วาลีน (*L*-valine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- L-กลูตามีน (*L*-glutamine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- B-อะลานีน (*B*-alanine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- อะดีนีน (adenine)
- ไทโรซีน (tyrosine)
- ไซแลน (xylan)
- แซนทีน (xanthine)
- เคซีน (casein)
- เจลาติน (gelatin)
- แป้ง (starch)
- Bacto peptone
- Bacto tryptone
- Bato soytone
- Beef extract
- Yeast extract
- Ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ )
- Magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ )
- Di-Potassium hydrogen phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- Potassium di-hydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Ammonium sulphate ( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Potassium nitrate ( $\text{KNO}_3$ )
- Ferrous sulphate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

- Zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Manganes chloride ( $\text{MnCl}_2$ )
- Copper sulphate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Sodium caseinate
- Glycerol
- Hydrochloric acid (HCL) บริษัท Merck. Germany
- Dimethylsulfoxide (DMSO) บริษัท Sigma, U.S.A.
- Fetal Bovine Serum (FBS) Hyclone บริษัท Hyclone
- อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 บริษัท Hyclone
- MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenylterazolium bromide)] บริษัท Bio Basic inc, Canada
- Trypsin-EDTA บริษัท Hyclone
- Trypan blue 0.5% w/v บริษัท Biochrom AG, Germany
- 2-Mecaptoethanol บริษัท Sigma, U.S.A.
- Cetyltrimethylammonum bromide (CTAB) บริษัท Serva
- Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) บริษัท Scharlau
- Taq DNA polymerase บริษัท Fermentas
- 10x Tris boric acid disodium ethylenediamine tetracetic acid (10x TBE buffer)
- Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express
- Isopropanol alcohol บริษัท Merck. Germany
- Isoamyl alcohol บริษัท Carbo erba
- Methanol
- Ethanol
- Ethylacetate
- Hexanes
- Cycloheximide
- Streptomycin
- Amicacin
- Nystatin
- Gentamycin

### 3.3 ตัวอย่างมูลสัตว์

เก็บตัวอย่างมูลสัตว์กินพืชตามแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดนครปฐม, กรุงเทพฯ, น่าน, ชลบุรี, กระบี่, อุบลราชธานี, สุราษฎร์ธานี, ตาก และ นครราชสีมา โดยเก็บตัวอย่างละประมาณ 20-30 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกซิปลง บันทึกรายชื่อของสัตว์ สถานที่เก็บ ลักษณะ และสีของมูลสัตว์ แล้วเก็บไว้ในกล่องโฟมที่มีก้อนทำความเย็นเพื่อรักษาตัวอย่างในมีอุณหภูมิประมาณ 4°C ในระหว่างที่ตัวอย่างถูกนำส่งห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้นทำการวัด pH (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) ตากให้แห้ง บดให้ละเอียด เก็บใส่ถุงพลาสติกซิปลงไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### 3.4 การแยกแอกติโนมัยซีตีสจากมูลสัตว์ตัวอย่าง

ทำการอบมูลสัตว์ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่แอกติโนมัยซีตีส และเซลล์ vegetative ของจุลินทรีย์ที่เจริญได้รวดเร็ว จากนั้นชั่งมูลสัตว์ 5 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 45 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ได้สารแขวนลอยมูลสัตว์ระดับการเจือจางที่  $10^{-1}$  จากนั้นลดระดับการเจือจางตั้งแต่  $10^{-2}$  ถึง  $10^{-6}$  นำสารแขวนลอยมูลสัตว์ที่ระดับความเจือจางตั้งแต่  $10^{-3}$  ถึง  $10^{-6}$  ไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 15 นาที และนำมาแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิประมาณ 4°C ทันทีเพื่อให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว เพื่อลดจำนวนเซลล์ vegetative ของจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่จากการอบด้วยความร้อน ปิเปตสารแขวนลอยดิน 0.1 มิลลิลิตร จากระดับความเจือจาง  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  เกลี่ย (spread) บนผิวหน้าอาหาร Sodium Caseinate Agar (SCA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยเติมยาปฏิชีวนะ cycloheximide 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ nystatin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน คัดเลือกแอกติโนมัยซีตีสที่โคโลนีมีลักษณะแตกต่างกัน ชีด (streak) ทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร SCA เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat Meal Agar (OMA) ผิวเอียง (ภาคผนวก ก หมายเลข 14) หรือ Mannitol Mungbean Agar (MBA) ผิวเอียง (ภาคผนวก ก หมายเลข 3)

### 3.5 การเก็บรักษาแอกติโนมัยซีตีส

ชีดแอกติโนมัยซีตีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat Meal Agar ผิวเอียง หรือ Mannitol Mungbean Agar ผิวเอียง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ประมาณ 7-14 วัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ

4°C ได้เป็นเวลา 1-2 เดือน สำหรับการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์บนอาหารมากพอ เติมสารละลาย 20% กลีเซอรอลปริมาตร 7 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร ใช้ลูป (loop) ขูดสปอร์ให้หลุดออก แล้วกรองสปอร์แขวนลอยด้วยสำลีปลอดเชื้อ ปิเปตต์สารแขวนลอยสปอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ (micro tube) เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C

### 3.6 การค้นหาแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ที่สร้างสารปฏิชีวนะ

#### 3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

นำแอกติโนมัยซีทีสจากอาหารผิวเลี้ยงในข้อ 3.5 ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat Meal Agar (OMA) หรือ Mannitol Mungbean Agar (MBA) บ่มงานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน

#### 3.6.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีที่เจริญอยู่บนอาหารแข็งในข้อ 3.6.1 ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยนำชิ้นวัณที่เจาะไว้ 3 ชิ้นถ่ายลงใน erlenmayer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Sodium Caseinate Yeast Extract Broth (SCYB) (ยวดี, 2546) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีขดลวดวงกลม (spring coil) เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับเซลล์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบโรตารี (rotary shaker) 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะและนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายต่อไป

#### 3.6.3 การสกัดสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยด้วยตัวทำละลาย

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.6.2 มาปั่นแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน ด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที สกัดส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทิลแอซิเตต (ethyl acetate) โดยใช้กรวยแยก โดยใช้ปริมาตรเอทิลแอซิเตตต่อปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1:1 เก็บสารสกัดของชั้นเอทิลแอซิเตตไว้ นำส่วนของเส้นใยที่ได้จากการปั่นแยกออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาบดด้วยโกร่งบดยาเพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นสกัดเส้นใยด้วยเอทิลแอซิเตตปริมาตร 30 มิลลิลิตร เก็บชั้นของเอทิลแอซิเตตไว้ เเทรวมสารสกัดส่วนที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนที่ได้จากเส้นใย ระเหยเอทิลแอซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 °C จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายคราบสารสกัดด้วยสารละลาย 20%DMSO ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ในหลอด

ไมโครทิวป์ ที่อุณหภูมิ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  เพื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบและยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ต่อไป

### 3.6.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar well

(Murray และ Baron, 1999)

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ (test organism)

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Bacillus cereus* ATCC 6633

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Candida albicans* ATCC 10231

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 5169

*Aspergillus niger* ATCC 6275

#### 3.6.4.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบชนิด (steak) บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA)(ภาคผนวก ก หมายเลข 5) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เขี่ยโคโลนีเดี่ยว 4-5 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  จนสังเกตเห็นว่าหลอดเชื้อขุ่น ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ซึ่งเทียบเท่ากับการอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ  $10^8$  CFU/ml

#### 3.6.4.2 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบชนิด (steak) บนอาหาร Sabouraud Agar (SBA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เขี่ยโคโลนีเดี่ยว 2-3 โคโลนี ละลายใน 0.85% NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความขุ่นของยีสต์ทดสอบด้วยด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard ซึ่งเทียบเท่ากับการอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ  $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6$  CFU/ml

### 3.6.4.3 การเตรียมราเส้นใยสำหรับทดสอบ

เลี้ยงราในอาหารผิวเลี้ยง PDA (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) 3-5 วัน หรือ จนมีการสร้างสปอร์ เติมสารละลาย 0.85% NaCl ใช้ลูป (loop) ชูดสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย กรองสปอร์ด้วยสำลีปลอดเชื้อ จากนั้นเจือจางสปอร์ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ  $1 \times 10^6$  -  $3 \times 10^6$  CFU/ml โดยนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemocytometer)

### 3.6.4.4 การทดสอบโดยวิธี Agar well

นำจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.6.4.1 - 3.6.4.3 มา นับจำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธีนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate count) ได้จำนวนของจุลินทรีย์ทดสอบแสดงดังตารางที่ 3.1 จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในหลอดสารแขวนลอยเชื้อ ปิดสำลีกับข้างหลอดพอหมาด ๆ ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Agar สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นยีสต์ และรา โดยป้ายให้ทั่วในลักษณะสามทิศทาง ทั้งจานอาหารไว้ไม่เกิน 15 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนอาหารแข็ง แล้วนำชิ้นวุ้นที่เจาะออกโดยใช้เข็มเย็บเชื้อ (needle) (ควบคุมให้หลุมที่เจาะมีปริมาตรเท่ากันโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว) ปิเปิดสารสกัดจากข้อ 3.6.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารแพร่เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบ, บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับราเส้นใย หลังจากนั้นวัดบริเวณที่เกิดวงใส (clear zone) โดยชูดควบคุมบวกสำหรับเชื้อแบคทีเรีย คือ streptomycin, ยีสต์ คือ nystatin และราเส้นใย คือ cycloheximide และชูดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี การเติมหัวเชื้อ

**ตารางที่ 3.1** แสดงจำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml) ที่มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard

จุลินทรีย์ทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)	จำนวนจุลินทรีย์ทดสอบ (CFU/ml)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.108	$3.32 \times 10^8$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.096	$3.13 \times 10^8$
<i>B. cereus</i> ATCC 6633	0.101	$6.30 \times 10^7$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.099	$6.70 \times 10^7$
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.094	$2.85 \times 10^6$
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	0.102	$3.73 \times 10^6$

**3.6.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ ทดสอบโดยวิธี MTT assay**

(Palaga และคณะ, 1996)

เซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ (Human tumour cell lines) ที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

A375	(Human malignant melanoma)	ATCC No.CRL-1619
SW620	(Human colorectal adenocarcinoma)	ATCC No.CCL-227
KatoIII	(Human gastric carcinoma)	ATCC No.HTB-103
HepG2	(Human liver hepatoblastoma)	ATCC No.HB-8065
BT474	(Human ductal carcinoma)	ATCC No.HTB-20
Jurkat	(Human acute T cell leukemia)	ATCC No.CRL-2063

**3.6.5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์**

นำเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิด ที่ถูกเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยง โดยแช่หลอดเก็บเซลล์ในอ่างน้ำอุ่น 37°C ทันที แกว่งหลอดไปมาให้ น้ำแข็งละลายอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นใช้ปิเปตแก้วดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ PRMI-1640 ที่ปราศจากซีรัม (serum free medium) (ภาคผนวก ก หมายเลข 26) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ PRMI-1640 ที่มี fetal bovine



serum (FBS) ความเข้มข้น 10%v/v และ gentamycin ความเข้มข้น 1 mg/ml (complete media) (ภาคผนวก ก หมายเลข 27) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ปิเปตอาหารขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจาย เป็นเซลล์เดี่ยวไม่จับกันเป็นก้อน จากนั้นปิเปตถ่ายเซลล์แขวนลอยทั้งหมดใส่ลงในภาชนะเลี้ยง เซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสอบดูสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) 5% ตรวจสอบดูสัณฐาน วิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับทุกวัน และเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน จนกว่าเซลล์จะเจริญหนาแน่น ในกรณีที่เซลล์มีแรงเป็นชนิดเซลล์เกาะผิว (A375, SW620, Kato III, HepG2 และ BT474) การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทำโดยดูดอาหารเก่าทั้งหมดออกแล้วเติม อาหารใหม่ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เข้าไปแทน ในกรณีที่เซลล์มีแรงเป็นชนิดเซลล์แขวนลอย (Jurkat) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยการดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม complete media ใช้ปิเปต ดูดขึ้นลงเบา ๆ ดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ รอจนเซลล์เจริญหนาแน่นจึงถ่ายเซลล์ สู่อานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมต่อไป

### 3.6.5.2 การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.6.5.1 ที่อยู่ในระยะ exponential phase ถ่ายลงในจานเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม ในกรณีที่เซลล์มีแรงเป็นเซลล์แขวนลอย (Jurkat) ถ่ายเชื้อโดยดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งได้ตะกอนของเซลล์ กรณีที่เซลล์มีแรงเป็นเซลล์เกาะผิว ถ่ายเซลล์โดยการดูดอาหารในภาชนะเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วยการเติมสารละลาย 1XPBS (ปลอด Ca<sup>2+</sup> และ Mg<sup>2+</sup>) (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เอียงภาชนะไปมา 5-6 ครั้ง แล้วดูดสารละลายออก เติม trypsin-EDTA ความเข้มข้น 0.25% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลาประมาณ 2 นาที สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์เริ่มหดตัวให้ดูด trypsin-EDTA ออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ปราศจากซีรัม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดูดอาหารขึ้นลงเซลล์ให้หลุดออกจากผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ ดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งได้ตะกอนของเซลล์ หลังจากนั้นละลายตะกอนของเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ complete media ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต หลังจากนั้นเจือจางเซลล์ให้มีจำนวน 5x10<sup>5</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร และดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ลงในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ในปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่ง

จะมีจำนวนเซลล์  $5 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  บรรยากาศ  $\text{CO}_2$  5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี MTT ต่อไป

### 3.6.5.3 การนับจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ที่มีชีวิตโดยย้อมด้วยสี trypan blue

ปิเปตต์สารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.6.5.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ย้อมด้วยสี trypan blue ความเข้มข้น 0.5% w/v ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับโดยนับเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ 4 มุม ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมไม่ติดสีของ trypan blue

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้} \times 10^4 \times 2}{4}$$

4

### 3.6.5.4 การทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT assay

หลังจากบ่มเซลล์ในข้อ 3.6.5.2. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารสกัดจากแอกติโนมายซินที่สกัดได้จากข้อ 3.6.3 ลงไปในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ โดยหยดปริมาตรหลุมละ 1 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  บรรยากาศ  $\text{CO}_2$  5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ โดยหยดสารละลาย MTT (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย MTT เท่ากับ 0.5 mg/ml สารละลาย MTT จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้สารละลาย MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็นผลึกสีม่วงไม่ละลายน้ำ เรียกว่าผลึก formazan ซึ่งปริมาณ dehydrogenase ในเซลล์หนึ่ง ๆ จะคงที่ ดังนั้น ปริมาณผลึก formazan ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต โดยมีชุดควบคุมคือหลุมที่หยดด้วยสารละลาย 20% DMSO โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% และ Blank คือหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง เมื่อหยดสารละลาย MTT แล้วบ่มเซลล์ที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดของเหลวออกจากหลุมจนหมด เติม 0.04 N HCl ใน isopropanol (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และ ปิเปตของเหลวขึ้นลงหลายครั้งด้วย multi channel pipette เพื่อละลายผลึกสีม่วง หลังจากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ (%viability) โดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{test average}} - \text{OD}_{\text{blank average}}) \times 100}{\text{OD}_{\text{negative control average}} - \text{OD}_{\text{blank average}}}$$

OD<sub>test average</sub> = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจาก  
แอกติโนมัยซิทีส

OD<sub>control negative control average</sub> = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบด้วย  
DMSO

OD<sub>blank average</sub> = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

### 3.6.5.5 การเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว

ทำให้เซลล์ที่เกาะอยู่กับภาชนะเลี้ยงเซลล์หลุดออกโดยใช้ 0.25% trypsin-EDTA ดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 1000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเพื่อเก็บตะกอนของเซลล์ หลังจากนั้นละลายตะกอนของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 + 1%DMSO (ภาคผนวก ก หมายเลข 28) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดเก็บเซลล์ (cryotube) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ทันที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหลอดเก็บเซลล์ไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งสามารถเก็บเซลล์ไว้ได้เป็นเวลานาน

### 3.6.6 ศึกษาผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซิทีสต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์โดยวิธีย้อมด้วย DNA dry Hoechst 33342

#### 3.6.6.1 เซลล์แขวนลอย (Jurkat)

เตรียมเซลล์ Jurkat แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ complete media ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม จำนวน 3 หลุม หลังจากนั้นหลุมแรกหยดด้วยสารสกัดจากแอกติโนมัยซิทีสปริมาตร 10 ไมโครลิตร, หลุมที่สองหยดด้วยสารละลาย 20%DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และหลุมที่สามใช้เป็นชุดควบคุมคือมีเพียงเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงเซลล์ในตู้ปัมที่อุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเซลล์ Jurkat ที่เติม etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเซลล์ในตู้ปัมที่อุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เป็นชุดควบคุมบวก หลังจากเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาแล้วถ่ายเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้าง

เซลล์ด้วย 1xPBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นที่สภาวะเดิมเทส่วนใส่ทิ้ง เติม 1% glutaraldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปิด 1% glutaraldehyde ที่ปั่นล้างเซลล์ด้วย 1xPBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เทส่วนใส่ทิ้ง เติม 1xPBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มีดเป็นเวลา 5 นาที ปิดสารแขวนลอยเซลล์ไว้บนกระจกสไลด์ ปิดด้วย cover slip ใช้น้ำยาทาเล็บเคลือบรอบ ๆ ด้านข้างของ cover slip ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เกิด apoptotic nuclei ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

### 3.6.6.2 เซลล์เกาะผิว (BT474)

เตรียมเซลล์ BT474 แขนงลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ complete media ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  เซลล์/มิลลิลิตร ปิดสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm x 10 mm ที่มีแผ่น cover slip วางอยู่ จำนวน 3 จาน หลังจากนั้นในจานแรกหยดด้วยสารสกัดจากเอกติโนมัยซีทีส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, จานที่สองหยดด้วยสารละลาย 20% DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และจานที่สามใช้เป็นชุดควบคุมคือมีเพียงเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเซลล์ BT474 ที่เติม etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศ CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เป็นชุดควบคุมบวก หลังจากเลี้ยงเซลล์ครบตามเวลาแล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 1xPBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดของเหลวทิ้ง เติม 1% glutaraldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด 1% glutaraldehyde ที่ล้างเซลล์ด้วย 1xPBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดูดของเหลวทิ้ง หยด 1xPBS 20 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ เติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้คีมคีบแผ่น cover slip โดยหันด้านที่มีเซลล์เกาะอยู่คว่ำลงบนกระจกสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มีดเป็นเวลา 5 นาที ใช้น้ำยาทาเล็บเคลือบรอบ ๆ ด้านข้างของ cover slip ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เกิด apoptotic nuclei ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

## 3.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (Growth) กับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

### 3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

ขีดเอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Yeast Extract Agar (ISP1) (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนอาหารแข็งตรงที่มีโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสเจริญอยู่ ใช้เข็มเย็บเย็บนำขึ้นจำนวน 3 ชิ้นใส่ลงใน erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Sodium Caseinate Yeast Extract Broth (SCYB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

### 3.7.2 ศึกษาการเจริญ (Growth) และการสร้างสารปฏิชีวนะโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

เตรียมอาหารเหลว Sodium Caseinate Yeast Extract Broth (SCYB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน erlenmayer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิเปตหัวเชื้อจากข้อ 3.7.1 ใส่ในฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 และ 15 ตามลำดับ กรองเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 65°C จนมีน้ำหนักคงที่ นำเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65°C จนมีน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักของเส้นใยในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 35°C จนแห้ง ละลายสารออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar well ตามข้อ 3.6.4.1 – 3.6.4.4 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและน้ำหนักแห้งของเซลล์และความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและปริมาณสารปฏิชีวนะ

### 3.8 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารปฏิชีวนะผลิตจากสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

ผลิตสารปฏิชีวนะโดยเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac16-1 และ Ac1-4 เป็นเวลา 6 และ 8 วัน ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SCYB (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ปริมาตร 2 ลิตร จากนั้นปั่นแยกส่วนของเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยตัวทำละลายโดยทำการแปรผันตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน (hexane), เอทิลแอซิเตต (ethyl acetate) และ เมทานอล (methanol) ในกรณีที่ตัวทำละลายคือ เฮกเซน และ เอทิลแอซิเตต ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการใช้กรวยแยก โดยใช้ปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อตัวทำละลายในอัตราส่วนเท่ากับ 100:100 มล. ในกรณีที่

ตัวทำละลายคือ เมทานอล ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มล. โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) จนน้ำเลี้ยงเชื้อแห้งและมีลักษณะเป็นผง จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 100 มล. ลงไปเพื่อสกัดสาร เก็บส่วนที่เป็นชั้นของตัวทำละลายนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 °C จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายสารออกมาด้วย 20% DMSO ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar well เมื่อได้ตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนที่เหลือด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์เบื้องต้น

### 3.9 การแยกและทำให้สารปฏิชีวนะบริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

เป็นการเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะออกจากสิ่งเจือปน โดยใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 และใช้ตัวทำละลาย เช่น เมทานอล, เอทิลแอลกอฮอล์, คลอโรฟอร์ม และ เฮกเซน เป็นตัวชะในอัตราส่วนที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ การตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC หลังจาก develop โดยอบแผ่น TLC ในภาชนะที่อ้อมตัวด้วยไอของไอโอดีน หรือส่องภายใต้รังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือพ่นด้วยสาร anisaldehyde ในกรดซัลฟิวริก หรือจุ่มด้วยสารละลายวานิลลิน (vanillin) หลังจากพ่นลมร้อนกับแผ่น TLC สีของสารจะปรากฏ จากนั้นทำการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารและคำนวณหาค่า retention factor (Rf)

### 3.10 การศึกษาตำแหน่งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบบนแผ่น TLC โดยวิธีไบออออโตกราฟี (Bioautography) (Zitouni และคณะ, 2005)

หลังจากที่ develop แผ่น TLC ด้วยระบบของตัวชะที่เหมาะสมแล้ว นำแผ่น TLC ออกมาจากภาชนะที่อ้อมตัวด้วยไอของตัวชะ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวชะระเหยออกไปจนหมด หลังจากนั้นนำแผ่น TLC มาตั้งบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอยู่ด้านล่าง นำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.6.4.1-3.6.4.2 มาทดสอบการยับยั้งบนแผ่น TLC โดยปัดเชื้อทดสอบในปริมาตร 1% v/v ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่มีวุ้น 7% (semi solid) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อยังเป็นของเหลวมีอุณหภูมิ 42-45 °C เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายอย่างสม่ำเสมอในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นทำการเทอาหารที่บดบนแผ่น TLC ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว ดังนั้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่

แขวนลอยด้วยเชื้อทดสอบอยู่ชั้นบน ตรงกลางเป็นแผ่น TLC และชั้นล่างเป็นอาหารแข็ง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแบคทีเรียทดสอบ คือ Mueller-Hinton Agar และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับยีสต์และราเส้นใยคือ Sabouraud Agar หลังจากอาหารแข็งตัวแล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย, บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 48 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นราเส้นใย ตรวจสอบบริเวณไฮบนแผ่น TLC และวัดหาค่า Rf ของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิด ในการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบมีชุดควบคุมคือแผ่น TLC ที่ไม่ได้ spot สารสกัดจากแอคติโนมัยซีต

### 3.11 การจำแนกสายพันธุ์แอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

ศึกษาการจำแนกแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างรงควัตถุเมลานิน การทดสอบทางชีวเคมี การย่อยสลายสาร ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความสามารถในการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ตามวิธีที่รายงานโดย (Williams และคณะ, 1989)

#### 3.11.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ใช้เทคนิค slide culture (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Malt Extract Agar (GYM) (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) และ Sodium Caseinate Yeast Extract Agar (SCYA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหาร และจำนวนวันที่มีการสร้างสปอร์ จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด บันทึกลักษณะการแตกออกของเส้นใยอาหาร ลักษณะของสายสปอร์ การเรียงตัวของสปอร์ จำนวนสปอร์ ลักษณะพื้นผิวของสปอร์ และโครงสร้างอื่น เช่น sclerotia

3.11.2 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP (International Streptomyces Project) (ภาคผนวก ก หมายเลข 12-17) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่

ISP1-TYEA	Trypton-Yeast Extract Agar
ISP2-YMEA	Yeast-Malt Extract Agar
ISP3-OAA	Oat Meal Agar
ISP4-ISSA	Inorganic Salts Starch Agar
ISP5-GAA	Glycerol Asparagines Agar
ISP6-PYEA	Peptone Yeast Extract Iron Agar

ซิดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 1-6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน บันทึกการเจริญ สีและลักษณะของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำและการสร้างสปอร์

### 3.11.3 ทดสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน

เลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 บนอาหาร Peptone Yeast Extract Iron Agar (ISP6) (ภาคผนวก ก หมายเลข 17) และ Tyrosine Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 18) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 โดยจะเกิดสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 3.11.4 ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท

แทง (stab) แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 19) ในหลอดอาหารขนาด 16x150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ โดยหยดสารละลายเอ (ละลาย sulfanilic acid 0.8 กรัม ใน 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร) และสารละลายบี (ละลาย alphanaphthylamine 0.5 กรัม ใน 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลอง ซึ่งจะเกิดสีแดง แต่ถ้าการทดสอบไม่เกิดสีแดงอันเนื่องมาจากไนไตรท์ถูกสลายต่อไปเป็นแอมโมเนีย และก๊าซไนโตรเจน ต้องทดสอบขั้นที่สองโดยเติมผงสังกะสีลงไป ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ (Shirling และ Gottlieb, 1966)



### 3.11.5 ทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

ซีด (streak) แอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 บนผิวหน้าอาหารวุ้นเคียง Peptone Yeast Extract Iron Agar (ISP6) (ภาคผนวก ก หมายเลข 17) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง สังเกตอาหารจะมีสีน้ำเงินดำ (bluish-black color) ควรสังเกตสีของอาหารก่อนที่จะสร้างรวงควัตถุที่ละลายน้ำได้ลงไปในการอาหาร (Tresner และ Danga, 1958)

### 3.11.6 การศึกษาสมบัติการย่อยสลายสาร (degradation activity)

ซีดแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ลงบนอาหารเคียงเคื้อ Modified Bennett Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 20) ที่แปรผัน 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) ตรวจสอบการย่อยสลายโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงความใสบริเวณรอบหรือใต้โคโลนีในอาหารวุ้น ยกเว้นการย่อยสลายเจลาตินและแป้ง ตรวจสอบโดยสังเกตจากวงใสหลังจากเททับด้วยสารละลาย acidified HgCl<sub>2</sub> และ Iodine ตามลำดับ

### 3.11.7 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ซีดแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ลงบนอาหารเคียงเคื้อ Modified Bennett Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 20) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 45 °C และ 55 °C สังเกตการเจริญหลังจากวันที่ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 10 °C สังเกตการเจริญหลังจาก 2 สัปดาห์

### 3.11.8 การตรวจสอบการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ

ซีดแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ลงบนอาหารเคียงเคื้อ Modified Bennett Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 20) ที่มีพีเอช เท่ากับ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 8.5, และ 9 ตามลำดับ และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C สังเกตการเจริญหลังจาก 14 วัน

### 3.11.9 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

ซีดแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ลงบนอาหารเคียงเคื้อ Basal Medium Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 21) ที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ 0.1%L-arginine 0.1%L-histidine 0.1%L-methionine 0.1%potassium nitrate 0.1%L-serine 0.1%L-theonine 0.1%L-valine 0.1%L-glutamine และ 0.1%B-alanine บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนโดยเทียบการเจริญกับชุดควบคุมคือ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมบวกคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่ประกอบด้วย 0.1% L-Asparagine หรือ 0.1%L-proline

### 3.11.10 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

ซัดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 22) ที่แปรผันสารประกอบคาร์บอน ได้แก่ 1.0%L-arabinose 1.0%dextran 1.0%D-fructose 1.0%D-galactose 1.0%meso-inositol 1.0%D-lactose 1.0%D-mannitol 1.0%D-manose 1.0%L-rhamnose 1.0%sucrose 1.0%threhalose 1.0%xylose 1.0%sodium acetate และ 1.0%sodium citrate ตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนโดยเปรียบเทียบการเจริญกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน และอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่ประกอบด้วย 1.0%glucose บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน

### 3.12 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

#### 3.12.1 การสกัดแยกโครโมโซมดีเอ็นเอจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีสด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou และคณะ (1999) โดยเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYMB (ภาคผนวก ก หมายเลข 25) เป็นเวลา 3 วัน ปั่นเหวี่ยงเก็บเส้นใยด้วยความเร็ว 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเส้นใยด้วย 0.85% NaCl ปั่นเหวี่ยงเก็บเส้นใยที่สภาวะเดิม จากนั้นนำเส้นใยประมาณ 30 กรัม ไปบดด้วยโกร่งจนละเอียดเติมสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ถ่ายส่วนผสมลงในหลอดไมโครเซนติพิวส์ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรและปั่นเหวี่ยงซ้ำเพื่อดำรงตัวอย่างจนของเหลวส่วนบนใส เติมสารละลาย 2X CTAB (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายผสมของ chloroform/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนติพิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลายผสม

ของ chloroform/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนติพิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน ล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม 70 %เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNase (ความเข้มข้น 10 mg/ml) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เติมสารละลาย 20% PEG (Polyethylene glycol) (ภาคผนวก ข หมายเลข 9 ) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือตะกอนของดีเอ็นเอ ล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม 70%เอทานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

### 3.12.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR)

ออกแบบไพรเมอร์ (primer) อ้างอิงข้อมูลจาก Rintala และคณะ (2001) และ Lanoot และคณะ (2005) เพื่อใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1541 base pairs ไพรเมอร์ดังกล่าวคือ

Forward primer PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ตำแหน่งที่จับ 8-27

Reward primer PH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')ตำแหน่งที่จับ 1541-1522

Reward primer StrepF (5'-ACGTGTGCAGCCCAAGACA-3') ตำแหน่งที่จับ 1194-1212

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้โครโมโซมมอลดีเอ็นเอของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ซึ่งสกัดตามวิธีในข้อ

3.12.1 เป็นแม่แบบ (template) ในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ประกอบด้วยสารผสม dNTP, forward primer reward primer เอ็นไซม์ Tag DNA polymerase PCR บัฟเฟอร์ แมกนีเซียม คลอไรด์ และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่าง ๆ ในสารละลาย PCR 10 ไมโครลิตร ในปฏิบัติการยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ

รีเอเจนต์	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR บัฟเฟอร์	1x
2mM dNTP mixture	0.2 mM
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Primer I (forward)	0.5 μM
Primer II (reverse)	0.5 μM
Tag DNA polymerase	0.5 U
แม่แบบ (DNA template)	1 ไมโครลิตร

ปฏิบัติการยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

Initial denaturation	95 °C	5 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	95 °C	1 นาที	
Annealing	53 °C	1 นาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Final Extension	72 °C	15 นาที	
Hold	4 °C		

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมผลิตภัณฑ์ซีอาร์ (PCR product) กับสีติดตาม (tracking dye) ในอัตราส่วน 5:2 หยดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลแอมเบอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transilluminator) และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

### 3.12.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

นำผลิตภัณฑ์ซีอาร์ที่ได้จากการใช้ primer 2 คู่ ได้แก่ PA (forward primer) กับ PH (Reward primer) และ PA (forward primer) กับ StrepF (Reward primer) ส่งตรวจเพื่อ

วิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ณ สำนักงานวิจัยคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้จากผลิตภัณฑ์ซีอาร์แต่ละคู่มาต่อกันโดยตรวจหาลำดับเบสที่ซ้อนทับกัน (over lab) และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับเบสใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์

[0http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/beta/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/beta/).



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ลักษณะของตัวอย่างมูลสัตว์

ทำการเก็บตัวอย่างมูลสัตว์กินพืชจาก 9 จังหวัด ในประเทศไทย จำนวน 39 ตัวอย่าง มาจากสัตว์กินพืช 16 ชนิด โดยตัวอย่างมูลสัตว์ที่เก็บรวบรวมได้มี เนื้อ สี และ pH แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

#### 4.2 การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากตัวอย่างมูลสัตว์

จากการแยกแอกติโนมัยซีทีสจากตัวอย่างมูลสัตว์กินพืช 39 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sodium Caseinate Agar ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.4 พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้จำนวน 127 สายพันธุ์ เรียงตามลำดับตัวอย่างมูลสัตว์ที่นำมาแยก ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มา พีเอช (อัตราส่วนมูลสัตว์ต่อน้ำเท่ากับ 1:2) และลักษณะของตัวอย่างมูลสัตว์

ตัวอย่างมูลสัตว์	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของมูลสัตว์	ค่า pH
1	ควาย (Water buffalo)	<i>Bubalus bubalis</i>	อ.เมือง จ.นครปฐม	เนื้อร่วน สีน้ำตาลดำ	7.35
2	ช้าง (Asian elephant)	<i>Elephas maximus</i>	สวนสัตว์ดุสิต จ.กรุงเทพฯ	ก้อนเส้นใย สีเหลือง	7.39
3	วัวแดง (Banteng)	<i>Bos javanicus</i>	สวนสัตว์ดุสิต จ.กรุงเทพฯ	เนื้อร่วนมีเส้นใย สีเหลืองน้ำตาล	7.42
4	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	อ.เมือง จ.น่าน	เนื้อร่วน สีน้ำตาลดำ	7.55
5	ควาย (Water buffalo)	<i>Bubalus bubalis</i>	อ.เมือง จ.น่าน	เนื้อร่วน สีน้ำตาลดำ	7.68
6	แก้ง (Barking deer)	<i>Muntiacus muntjak</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	ก้อนแข็ง สีน้ำตาลดำ	7.62
7	วัว (Domestic cow )	<i>Bos taurus</i>	อ.คลองยาง จ.กระบี่	เนื้อร่วน สีเขียวน้ำตาล	7.45
8	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	อ.วารินชำราบ จ.อุบลฯ	เนื้อร่วน สีเขียวน้ำตาล	7.53
9	วัว (Domestic cow )	<i>Bos taurus</i>	อ.วารินชำราบ จ.อุบลฯ	ก้อนแข็ง สีน้ำตาลดำ	7.59
10	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	โรงฆ่าสัตว์ จ.อุบลฯ	เนื้อร่วน สีเหลือง	7.60
11	ช้าง (Asian elephant)	<i>Elephas maximus</i>	บ้านสระเกศ จ.สุราษฎร์ธานี	ก้อนเส้นใย สีเหลืองน้ำตาล	7.38
12	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	บ้านนาเดิม จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลดำ	7.85
13	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	บ้านบาง จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.40
14	ควาย (Water buffalo)	<i>Bubalus bubalis</i>	บ้านสระเกศ จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาล	7.67

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงแหล่งที่มา พีเอช (อัตราส่วนมูลสัตว์ต่อน้ำเท่ากับ 1:2) และลักษณะของตัวอย่างมูลสัตว์

ตัวอย่างมูลสัตว์	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของมูลสัตว์	ค่า pH
15	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	ต.ลีน้อย จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.58
16	ควาย (Water buffalo)	<i>Bubalus bubalis</i>	บ้านทองโตนด จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลดำ	7.29
17	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	บ้านละไม จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.97
18	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	บ้านลิปาใหญ่ จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.53
19	ควาย (Water buffalo)	<i>Bubalus bubalis</i>	บ้านसान จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	8.00
20	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	บ้านสระเกศ จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาล	8.11
21	ควาย (Water buffalo)	<i>Bubalus bubalis</i>	ต.ตลิ่งงาม จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.12
22	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	บ้านเกาะแตน จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลดำ	7.21
23	ควาย (Water buffalo)	<i>Bubalus bubalis</i>	บ้านทองกูด จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.36
24	ควาย (Water buffalo)	<i>Bubalus bubalis</i>	ต.หน้าเมือง จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลดำ	7.20
25	ควาย (Water buffalo)	<i>Bubalus bubalis</i>	อ.เกาะสมุย จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.10
26	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.54
27	วัว (Domestic cow)	<i>Bos taurus</i>	อ.เมือง จ.ตาก	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.75
28	กระต่ายป่า (Siamese hare)	<i>Lepus peguensis</i>	อ.เวียงสา จ.น่าน	ก้อนกลมร่วน สีเขียว	6.71



ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงแหล่งที่มา พีเอช (อัตราส่วนมูลสัตว์ต่อน้ำเท่ากับ 1:2) และลักษณะของตัวอย่างมูลสัตว์

ตัวอย่างมูลสัตว์	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของมูลสัตว์	ค่า pH
29	กวางแดง (Red deer)	<i>Cervus elaphus</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	ก้อนกลมร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.66
30	กวางรูซ่า (Rusa deer)	<i>Cervus timorensis</i>	อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.นครราชสีมา	ก้อนกลมร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.58
31	ม้า (Horse)	<i>Equus caballus</i>	อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.นครราชสีมา	เนื้อร่วน สีน้ำตาล	7.85
32	ละมั่ง (Eld's deer)	<i>Cervus eldi</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	เนื้อร่วน สีเขียว	7.67
33	กวางแดง (Red deer)	<i>Cervus elaphus</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	ก้อนเนื้อร่วน สีเขียว	7.68
34	ยีราฟ (Giraffe)	<i>Giraffa camelopardalis</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.88
35	นกกระจาตเทศ (Ostrich)	<i>Struthio camelus</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	เนื้อร่วน สีน้ำตาล	7.91
36	แรดขาว (White rhinoceros)	<i>Ceratotherium simum</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	ก้อนเส้นใย สีเขียวเหลือง	7.74
37	นกอีมู (Emu)	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.85
38	ผสมเสริจ (Malayan Tapir)	<i>Tapirus indicus</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	ก้อนเส้นใย สีน้ำตาลเหลือง	7.43
39	กระทิง (Gaur)	<i>Bos gaurus</i>	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี	เนื้อร่วน สีน้ำตาลเหลือง	7.61

ตารางที่ 4.2 แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างมูลสัตว์ 39 ตัวอย่าง

ลำดับตัวอย่าง มูลสัตว์	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้	รวม
1	Ac1-1, Ac1-2, Ac1-3, Ac1-4, Ac1-5, Ac1-6, Ac1-7, Ac1-8, Ac1-9	9
2	Ac2-1, Ac2-2, Ac2-3, Ac2-4	4
3	Ac3-1, Ac3-2, Ac3-3,	3
4	Ac4-1, Ac4-2, Ac4-3	3
5	Ac5-1, Ac5-2, Ac5-3	3
6	Ac6-1, Ac6-2	2
7	Ac7-1, Ac7-2, Ac7-3, Ac7-4, Ac7-5, Ac7-6	6
8	Ac8-1	1
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	13
10	Ac10-1, Ac10-2, Ac10-3	3
11	Ac11-1	1
12	Ac12-1, Ac12-2	2
13	Ac13-1, Ac13-2, Ac13-3	3
14	Ac14-1	1
15	Ac15-1, Ac15-2	2
16	Ac16-1, Ac16-2	2
17	Ac17-1	1
18	Ac18-1, Ac18-2	2
19	Ac19-1	1
20	Ac20-1	1
21	Ac21-1	1
22	ไม่พบแอกติโนมัยซีทีส	0
23	Ac23-1, Ac23-2	2
24	Ac24-1, Ac24-2, Ac24-3, Ac24-4, Ac24-5	5
25	Ac25-1, Ac25-2, Ac25-3, Ac25-4, Ac25-5, Ac25-6	6

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างมูลสัตว์ 39 ตัวอย่าง

ลำดับตัวอย่าง มูลสัตว์	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้	รวม
26	Ac26-1	1
27	Ac27-1, Ac27-2	2
28	Ac28-1, Ac28-2, Ac28-3, Ac28-4, Ac28-5	5
29	Ac29-1, Ac29-2, Ac29-3, Ac29-4, Ac29-5, Ac29-6, Ac29-7	7
30	Ac30-1, Ac30-2, Ac30-3, Ac30-4, Ac30-5, Ac30-6	6
31	Ac31-1, Ac31-2, Ac31-3, Ac31-4, Ac31-5	5
32	Ac32-1, Ac32-2, Ac32-3, Ac32-4, Ac32-5, Ac32-6	6
33	Ac33-1, Ac33-2, Ac33-3	3
34	Ac34-1	1
35	Ac35-1, Ac35-2, Ac35-3, Ac35-4	4
36	Ac36-1, Ac36-2, Ac36-3, Ac36-4	4
37	Ac37-1, Ac37-2	2
38	Ac38-1, Ac38-2	2
39	Ac39-1, Ac39-2	2

#### 4.3 การทดสอบเพื่อค้นหาแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์

นำแอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้จากมูลสัตว์ทั้งหมด 127 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเหลว Sodium Caseinate Yeast Extract Broth (SCYB) เป็นเวลา 14 วัน สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ออก และละลายสารสกัดด้วย 20%DMSO ได้สารสกัดทั้งหมด 127 ชนิด นำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well กับจุลินทรีย์ทดสอบ 7 ชนิดดังนี้

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Bacillus cereus* ATCC 6633

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Candida albicans* ATCC 10231

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 5169

*Aspergillus niger* ATCC 6275

พบว่าแอคติโนมัยซิทีสแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.3

**ตารางที่ 4.3** ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของแอคติโนมัยซิทีส

สายพันธุ์ แอคติโนมัยซิทีส	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	<i>A. niger</i> ATCC 6275
Ac1-1	-	-	+	++	++	++	+++
Ac1-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac1-3	-	-	+	++	+	+	+
Ac1-4	-	-	+	+	++	+++	++
Ac1-5	-	-	+	-	+	-	+
Ac1-6	-	-	+	+	+	+	+
Ac1-7	-	-	-	-	-	-	-
Ac1-8	-	-	+	+	+	+	+

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำ  
เลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีทีส	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	<i>A. niger</i> ATCC 6275
Ac1-9	-	-	-	-	-	-	-
Ac2-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac2-2	-	-	+	-	+++	+++	+
Ac2-3	-	-	-	-	-	-	-
Ac2-4	-	-	-	-	-	-	-
Ac3-1	-	-	-	-	-	+	-
Ac3-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac3-3	-	-	+	-	-	-	-
Ac4-1	-	-	++++	+++	++	+++	++
Ac4-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac4-3	-	+	+++	+	+	-	+
Ac5-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac5-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac5-3	-	-	+	-	+	+	++
Ac6-1	-	-	+	+	+	+	+
Ac6-2	-	-	+++	+++	-	-	-
Ac7-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac7-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac7-3	-	-	+	-	-	-	-
Ac7-4	-	-	-	-	-	-	-
Ac7-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac7-6	-	-	+	-	-	-	-
Ac8-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-1	-	-	+	+	+	+	+++
Ac9-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-3	-	-	+	-	-	++	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำ  
เลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีทีส	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	<i>A. niger</i> ATCC 6275
Ac9-4	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-6	-	-	+	-	+	+	-
Ac9-7	-	-	-	-	-	-	+
Ac9-8	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-9	-	-	+++	-	-	-	-
Ac9-10	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-11	-	-	+	-	-	+	-
Ac9-12	-	-	+	+	-	-	-
Ac9-13	-	-	-	-	-	-	-
Ac10-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac10-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac10-3	-	-	+	-	-	+	-
Ac11-1	-	-	+	-	-	-	-
Ac12-1	-	-	+	-	-	-	-
Ac12-2	-	-	+	-	+	+	+
Ac13-1	-	-	+	-	-	-	-
Ac13-2	-	-	+	-	-	+	-
Ac13-3	-	-	+	-	+	+	+
Ac14-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac15-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac15-2	-	-	+	-	-	-	-
Ac16-1	+	+	+++	++++	-	+	+
Ac16-2	-	-	+++	+	-	-	-
Ac17-1	-	-	+	-	-	+	-
Ac18-1	-	-	-	-	-	-	+
Ac18-2	-	-	+	+	-	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำ  
เลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีทีส	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	<i>A. niger</i> ATCC 6275
Ac19-1	-	-	+	-	-	+	+
Ac20-1	-	-	-	-	-	+	-
Ac21-1	-	-	+	+	-	-	-
Ac23-1	-	-	+	-	-	++++	-
Ac23-2	-	-	+	-	-	+	-
Ac24-1	-	-	+	-	-	-	-
Ac24-2	-	-	+	-	-	+	-
Ac24-3	-	-	+++	+	-	-	-
Ac24-4	-	-	+	-	+	+	+
Ac24-5	-	-	+	-	+	-	-
Ac25-1	-	-	+	-	-	+	-
Ac25-2	-	-	+	-	-	-	-
Ac25-3	-	-	-	-	-	-	-
Ac25-4	-	-	-	-	+	+	-
Ac25-5	-	-	+	-	+	-	+
Ac25-6	-	-	+	-	-	-	-
Ac26-1	-	-	+	-	-	+	-
Ac27-1	-	-	+	+	-	+	+
Ac27-2	+	+	+++	+	-	-	-
Ac28-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac28-2	-	+	+++	+	-	+	-
Ac28-3	-	-	++++	++++	-	-	-
Ac28-4	-	-	-	-	-	-	-
Ac28-5	-	-	+	+	-	-	-
Ac29-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac29-2	-	-	+	-	-	-	-
Ac29-3	-	-	+	-	-	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำ  
เลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีทีส	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	<i>A. niger</i> ATCC 6275
Ac29-4	-	-	-	-	-	-	+
Ac29-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac29-6	-	-	+	-	-	-	-
Ac29-7	-	-	++	+	-	-	-
Ac30-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac30-2	-	-	+	-	+	+	-
Ac30-3	-	-	+	-	-	-	-
Ac30-4	-	-	+	-	-	-	-
Ac30-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac30-6	-	-	-	-	-	-	-
Ac31-1	-	-	+	-	+	++	-
Ac31-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac31-3	-	-	+	-	-	-	-
Ac31-4	-	-	+	-	-	+	-
Ac31-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac32-1	-	-	-	-	+	++	-
Ac32-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac32-3	-	-	+	-	-	-	-
Ac32-4	-	-	-	-	-	-	-
Ac32-5	-	-	++	+	-	-	-
Ac32-6	-	-	-	-	-	-	-
Ac33-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac33-2	-	-	+	-	-	-	-
Ac33-3	-	-	-	-	-	-	-
Ac34-1	-	-	+++	++	-	-	-
Ac35-1	-	-	+	-	-	-	-
Ac35-2	-	-	++	-	-	-	-



ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีทีส	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ						
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	<i>A. niger</i> ATCC 6275
Ac35-3	-	-	++++	+++	-	-	-
Ac35-4	-	-	++++	++	-	-	-
Ac36-1	-	-	+	-	-	-	-
Ac36-2	-	-	+	-	-	-	-
Ac36-3	-	-	-	+	+	+	-
Ac36-4	-	-	+	-	-	-	-
Ac37-1	-	-	+	-	-	-	-
Ac37-2	-	-	+	-	-	-	-
Ac38-1	-	-	+	-	-	-	-
Ac38-2	-	-	+	-	-	-	-
Ac39-1	-	-	+	-	-	-	-
Ac39-2	-	-	-	-	-	-	-

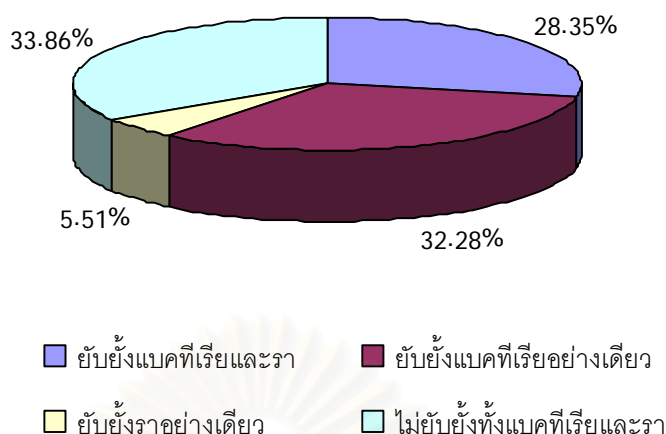
หมายเหตุ      +++++ = ความกว้างของ Inhibition zone 25 - 30 มิลลิเมตรขึ้นไป  
 +++ = ความกว้างของ Inhibition zone 19 - 24 มิลลิเมตร  
 ++ = ความกว้างของ Inhibition zone 14 - 18 มิลลิเมตร  
 + = ความกว้างของ Inhibition zone 9 - 13 มิลลิเมตร  
 - = ไม่แสดงการยับยั้ง

#### 4.4 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

จากการทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบจากแอกติโนมัยซีทีสจำนวน 127 สายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ยับยั้งแบคทีเรียและรา กลุ่มที่ 2 ยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดียว กลุ่มที่ 3 ยับยั้งราอย่างเดียว และกลุ่มที่ 4 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แสดงดังตารางที่ 4.4 จำนวนสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ และแสดงเป็นแผนภูมิวงกลมดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.4 จำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละกลุ่ม

ขอบเขตการยับยั้งกลุ่ม จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีส	รวม	%
ยับยั้งแบคทีเรีย และรา	Ac1-1, Ac1-3, Ac1-4, Ac1-5, Ac1-6, Ac1-8, Ac2-2, Ac3-3, Ac4-1, Ac4-3, Ac5-3, Ac9-1, Ac9-3, Ac9-6, Ac9-11, Ac10-3, Ac12-2, Ac13-2, Ac13-3, Ac16-1, Ac17-1, Ac19-1, Ac23-1, Ac23-2, Ac24-2, Ac24-4, Ac24-5, Ac25-1, Ac25-5, Ac26-1, Ac27-1, Ac28-2, Ac30-2, Ac31-1, Ac31-4, Ac36-3	36	28.35
ยับยั้งแบคทีเรีย อย่างเดียว	Ac7-3, Ac7-6, Ac9-9, Ac9-12, Ac11-1, Ac12-1, Ac13-1, Ac15-2, Ac16-2, Ac18-2, Ac21-1, Ac24-1, Ac24-3, Ac25-2, Ac25-6, Ac27-2, Ac28-3, Ac28-5, Ac29-2, Ac29-3, Ac29-6, Ac29-7, Ac30-3, Ac30-4, Ac31-3, Ac32-3, Ac32-5, Ac33-2, Ac34-1, Ac35-1, Ac35-2, Ac35-3, Ac35-4, Ac36-1, Ac36-2, Ac36-4, Ac37-1, Ac37-2, Ac38-1, Ac38-2, Ac39-1	41	32.28
ยับยั้งราอย่างเดียว	Ac3-1, Ac9-7, Ac18-1, Ac20-1, Ac25-4, Ac29-4, Ac32-1	7	5.51
ไม่ยับยั้งทั้งแบคทีเรีย และรา	Ac1-2, Ac1-7, Ac1-9, Ac2-1, Ac2-3, Ac2-4, Ac3-2, Ac4-2, Ac5-1, Ac5-2, Ac6-1, Ac6-2, Ac7-1, Ac7-2, Ac7-4, Ac7-5, Ac8-1, Ac9-2, Ac9-4, Ac9-5, Ac9-8, Ac9-10, Ac9-13, Ac10-1, Ac10-2, Ac14-1, Ac15-1, Ac25-3, Ac28-1, Ac28-4, Ac29-1, Ac29-5, Ac30-1, Ac30-5, Ac30-6, Ac31-2, Ac31-5, Ac32-2, Ac32-4, Ac32-6, Ac33-1, Ac33-3, Ac39-2	43	33.86



รูปที่ 4.1 แผนภูมิวงกลมแสดงการจัดกลุ่มการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าจำนวนของแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้มีจำนวน 66.14% ส่วนจำนวนของแอกติโนมัยซีทีสที่ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้มีจำนวน 33.86% นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างเดียวมีจำนวน 32.28% และในจำนวนนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้อย่างเดียวมีมากถึง 97.56% ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบเพปติโดไกลแคนไว้ เมมเบรนนี้มีไขมันมากถึง 11-12% ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นสารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์

#### 4.5 การทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

นำแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากมูลสัตว์ทั้งหมด 127 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเหลว Sodium Caseinate Yeast Extract Broth (SCYB) เป็นเวลา 14 วัน สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ระเหยตัวทำละลายออกและละลายสารสกัดด้วย 20%DMSO ได้สารสกัดทั้งหมด 127 ชนิด นำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT method กับเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ (Human tumor cell lines) 6 ชนิด ดังนี้

A375	(Human malignant melanoma)	ATCCNo.CRL-1619
SW620	(Human colorectal adenocarcinoma)	ATCCNo.CCL-227
KatoIII	(Human gastric carcinoma)	ATCCNo.HTB-103

HepG2	(Human liver hepatoblastoma)	ATCCNo.HB-8065
BT474	(Human ductal carcinoma)	ATCCNo.HTB-20
Jurkat	(Human acute T cell leukemia)	ATCCNo.CRL-2063

พบว่าแอกติโนมัยซิทีสแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แตกต่างกัน  
ดังแสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** ความสามารถในการยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำ  
เลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซิทีส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซิทีส	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์					
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat
Ac1-1	-	-	-	-	+++++	+
Ac1-2	-	-	-	-	-	-
Ac1-3	-	-	-	-	+++++	+
Ac1-4	-	-	-	-	+++++	-
Ac1-5	-	-	-	-	+++	-
Ac1-6	-	++++	++	+	-	-
Ac1-7	-	-	-	-	-	-
Ac1-8	-	++++	+++	-	-	-
Ac1-9	-	-	-	-	-	-
Ac2-1	-	-	-	-	-	-
Ac2-2	-	+++	+++	+	-	-
Ac2-3	-	-	-	-	-	-
Ac2-4	-	-	-	-	-	-
Ac3-1	-	-	-	-	-	-
Ac3-2	-	-	-	-	-	-
Ac3-3	-	-	-	-	-	-
Ac4-1	-	+++	++	++	-	-
Ac4-2	-	-	-	-	-	-
Ac4-3	+	+++	++	-	-	-
Ac5-1	-	-	-	-	-	-
Ac5-2	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียในมัยซีทีส

สายพันธุ์ แบคทีเรีย มัยซีทีส	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์					
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat
Ac5-3	-	+++	++	-	-	-
Ac6-1	+++++	++	+	+	-	-
Ac6-2	-	-	-	-	++++	+
Ac7-1	+	++	-	-	-	-
Ac7-2	-	-	-	-	-	-
Ac7-3	-	-	-	-	-	-
Ac7-4	-	-	-	-	-	-
Ac7-5	-	-	-	-	-	-
Ac7-6	-	-	-	-	-	-
Ac8-1	-	-	-	-	-	-
Ac9-1	++	++	+++	-	-	-
Ac9-2	-	+	+	-	-	-
Ac9-3	+	++	-	-	-	+
Ac9-4	-	-	-	-	-	-
Ac9-4	-	-	-	-	-	-
Ac9-6	-	-	-	-	-	-
Ac9-7	-	+++	++	-	+	-
Ac9-8	-	-	-	-	-	-
Ac9-9	-	-	-	-	-	-
Ac9-10	-	-	-	-	-	-
Ac9-11	-	-	-	-	-	+
Ac9-12	-	-	-	-	-	-
Ac9-13	-	-	-	-	-	-
Ac10-1	-	-	-	-	-	-
Ac10-2	-	-	-	-	-	-
Ac10-3	-	-	-	-	-	-
Ac11-1	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีทีส	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์					
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat
Ac12-1	-	-	-	-	-	-
Ac12-2	-	-	-	-	-	-
Ac13-1	-	-	-	-	-	-
Ac13-2	-	-	-	-	-	-
Ac13-3	-	-	-	-	++	-
Ac14-1	-	-	-	-	-	-
Ac15-1	-	-	-	-	-	-
Ac15-2	-	-	-	-	-	-
Ac16-1	-	-	-	-	++++	+++
Ac16-2	-	-	-	-	-	-
Ac17-1	-	-	-	-	-	-
Ac18-1	-	+++	+++	+++	+	-
Ac18-2	-	-	-	-	-	-
Ac19-1	+	+++	++	-	++	-
Ac20-1	-	-	-	-	-	-
Ac21-1	-	-	-	-	-	-
Ac23-1	-	-	-	-	-	-
Ac23-2	-	+++	++	+++	+	-
Ac24-1	-	-	-	-	-	-
Ac24-2	-	+++	+++	+	+	-
Ac24-3	-	-	-	-	-	-
Ac24-4	-	++	-	-	++	-
Ac24-5	-	-	-	-	-	-
Ac25-1	-	+	-	+	+	-
Ac25-2	-	-	-	-	-	-
Ac25-3	-	-	-	-	-	-
Ac25-4	-	++	+	-	-	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีทีส	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์					
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat
Ac25-5	-	++++	+++	-	+	-
Ac25-6	-	-	-	-	-	+
Ac26-1	-	-	-	-	-	-
Ac27-1	-	-	-	-	+	-
Ac27-2	-	-	-	-	-	-
Ac28-1	-	++++	+	-	+	-
Ac28-2	-	-	-	-	-	-
Ac28-3	-	-	-	-	+	-
Ac28-4	-	-	-	-	-	-
Ac28-5	-	-	-	-	-	-
Ac29-1	-	-	-	-	-	-
Ac29-2	-	-	-	-	-	-
Ac29-3	-	-	-	-	-	-
Ac29-4	-	-	-	-	-	-
Ac29-5	-	-	-	-	-	-
Ac29-6	-	-	-	-	-	-
Ac29-7	-	-	-	-	-	-
Ac30-1	-	-	-	-	-	-
Ac30-2	++++	+++	+++	-	+	-
Ac30-3	-	-	-	-	-	-
Ac30-4	-	-	-	-	-	-
Ac30-5	-	-	-	-	-	-
Ac30-6	-	-	-	-	-	-
Ac31-1	+++++	+++	++++	++	+	-
Ac31-2	-	-	-	-	-	-
Ac31-3	-	-	-	-	-	-
Ac31-4	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ของสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีส

สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีทีส	ระดับการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์					
	A375	SW620	KatoIII	HepG2	BT474	Jurkat
Ac31-5	-	-	-	-	-	-
Ac32-1	+++	++++	++++	+	+	-
Ac32-2	-	-	-	-	-	-
Ac32-3	-	-	-	-	-	-
Ac32-4	-	-	-	-	-	-
Ac32-5	-	-	-	-	-	-
Ac32-6	-	-	-	-	-	-
Ac33-1	-	-	-	-	-	-
Ac33-2	-	-	-	-	-	-
Ac33-3	-	-	-	-	-	-
Ac34-1	-	-	-	-	-	-
Ac35-1	-	-	-	-	-	-
Ac35-2	-	-	-	-	-	-
Ac35-3	-	-	-	-	-	-
Ac35-4	-	-	-	-	-	-
Ac36-1	-	-	-	-	-	-
Ac36-2	+++++	++	++	+	-	-
Ac36-3	-	-	-	-	-	-
Ac36-4	-	-	-	-	-	-
Ac37-1	-	-	-	-	-	-
Ac37-2	-	-	-	-	-	-
Ac38-1	-	-	-	-	-	-
Ac38-2	-	-	-	-	-	-
Ac39-1	-	-	-	-	-	-
Ac39-2	-	-	-	-	-	-



หมายเหตุ	+++++	= การมีชีวิต (viability) ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์มีค่าเท่ากับ 0 – 10%
	++++	= การมีชีวิต (viability) ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์มีค่าเท่ากับ 11 – 20%
	+++	= การมีชีวิต (viability) ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์มีค่าเท่ากับ 21 – 30%
	++	= การมีชีวิต (viability) ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์มีค่าเท่ากับ 31 – 40%
	+	= การมีชีวิต (viability) ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์มีค่าเท่ากับ 41 – 50%
	-	= การมีชีวิต (viability) ของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์มีค่า > 50% ขึ้นไป

#### 4.6 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

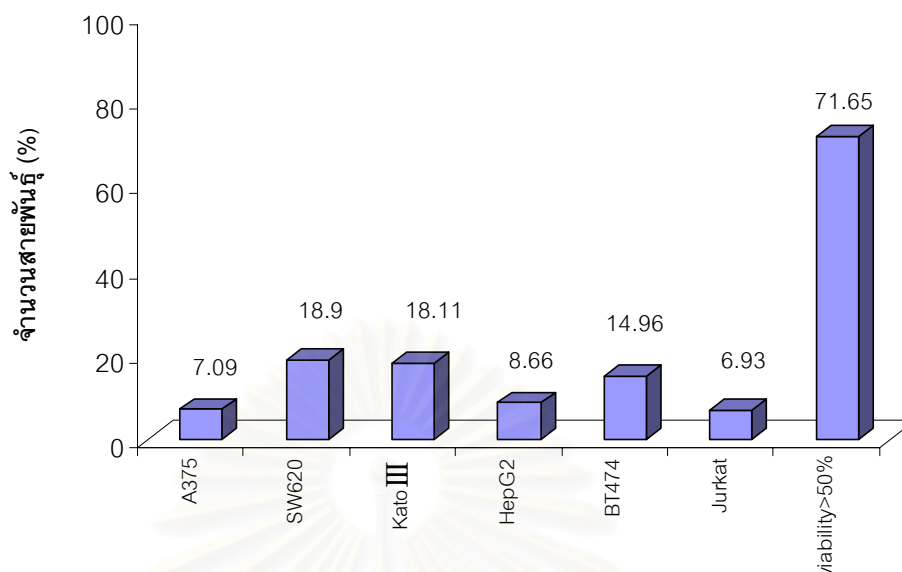
จากการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ของแอกติโนมัยซีทีที่สทั้งหมด 127 สายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยซีทีสตามความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก คือ สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% กลุ่มที่สอง คือ สายพันธุ์ที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 50% สมาชิกในกลุ่มแรกสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม ตามชนิดของเซลล์มะเร็งที่สามารถยับยั้งได้ คือ กลุ่มที่ 1 มีผลทำให้เซลล์มะเร็งผิวหนัง (Malignant melanoma) มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% กลุ่มที่ 2 มีผลทำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ (Colorectal adenocarcinoma) มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% กลุ่มที่ 3 มีผลทำให้เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (Gastric carcinoma) มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% กลุ่มที่ 4 มีผลทำให้เซลล์มะเร็งตับ (Liver hepatoblastoma) มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% กลุ่มที่ 5 มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเต้านม (ductal carcinoma) มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% และ กลุ่มที่ 6 มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (T cell leukemia) มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% แสดงดังตารางที่ 4.6 แสดงจำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสในแต่ละกลุ่มและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ การเปรียบเทียบจำนวนสายพันธุ์ที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% และจำนวนสายพันธุ์ที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 50% แสดงดังแผนภูมิแท่งรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.6 แสดงจำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็ง  
มนุษย์แต่ละชนิด

ขอบเขตการยับยั้ง เซลล์มะเร็งทดสอบ	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีส	รวม	%
ยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนัง (A375)	Ac4-3, Ac7-1, Ac9-1, Ac9-3, Ac19-1, Ac30-2, Ac31-1, Ac32-1, Ac36-2	9	7.09
ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)	Ac1-6, Ac1-8, Ac2-2, Ac4-1, Ac4-3, Ac5-3, Ac6-1, Ac9-1, Ac9-2, Ac9-3, Ac9-7, Ac18-1, Ac19-1, Ac23-2, Ac24-2, Ac24-4, Ac25-1, Ac25-4, Ac25-5, Ac28-1, Ac30-2, Ac31-1, Ac31-1, Ac36-2	24	18.90
ยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะ อาหาร (KatoIII)	Ac1-6, Ac1-8, Ac2-2, Ac4-1, Ac4-3, Ac5-3, Ac6-1, Ac7-1, Ac9-1, Ac9-2, Ac9-7, Ac14-1, Ac18-1, Ac19-1, Ac23-2, Ac24-2, Ac25-4, Ac25-5, Ac28-1, Ac30-2, Ac31-1, Ac31-1, Ac36-2	23	18.11
ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)	Ac1-6, Ac2-2, Ac4-1, Ac6-1, Ac18-1, Ac23-2, Ac24-2, Ac25-1, Ac31-1, Ac31-1, Ac36-2	11	8.66
ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474)	Ac1-1, Ac1-3, Ac1-4, Ac1-5, Ac6-2, Ac9-7, Ac16-1, Ac18-1, Ac19-1, Ac23-2, Ac24-2, Ac24-4, Ac25-1, Ac25-4, Ac25-5, Ac28-1, Ac30-2, Ac31-1, Ac31-1	19	14.96
ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด ขาว (Jurkat)	Ac1-1, Ac1-3, Ac6-2, Ac9-3, Ac9-11, Ac16-1, Ac25-6, Ac27-1	8	6.30

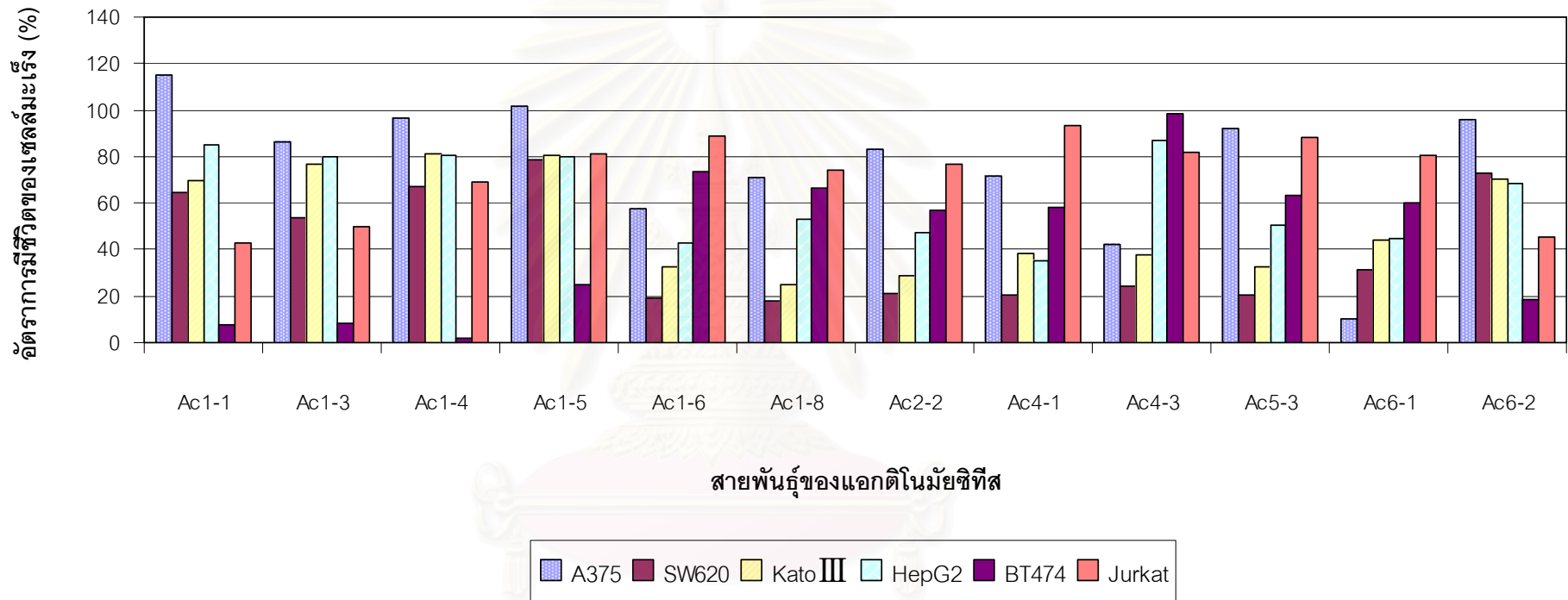
ตารางที่ 4.6 (ต่อ) แสดงจำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง  
มนุษย์แต่ละชนิด

การยับยั้ง เซลล์มะเร็งทดสอบ	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีส	รวม	%
เซลล์มะเร็งทุกชนิดมี เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต มากกว่า 50%	Ac1-2, Ac1-7, Ac1-9, Ac2-1, Ac2-3, Ac2-4, Ac3-1, Ac3-2, Ac3-3, Ac 4-2, Ac5-1, Ac5-2, Ac7-2, Ac7-3, Ac7-4, Ac7-5, Ac7-6, Ac8-1, Ac9-4, Ac9-5, Ac9-6, Ac9-8, Ac9-9, Ac9-10, Ac9-12, Ac9-13, Ac10-1, Ac10-2, Ac10-3, Ac11-1, Ac12-1, Ac12-2, Ac13-1, Ac13-2, Ac13-3, Ac15-1, Ac15-2, Ac16-2, Ac17-1, Ac18-2, Ac20-1, Ac21-1, Ac23-1, Ac24-1, Ac24-3, Ac25-2, Ac25-3, Ac26-1, Ac27-2, Ac28-2, Ac28-4, Ac28-5, Ac29-1, Ac29-2, Ac29-3, Ac29-4, Ac29-5, Ac29-6, Ac29-7, Ac30-1, Ac30-3, Ac30-4, Ac30-5 Ac30-6, Ac31-2, Ac31-3, Ac31-4, Ac31-5, Ac32-2, Ac32-3, Ac32-4, Ac32-5, Ac32-6, Ac33-1, Ac33-2, Ac33-3, Ac34-1, Ac35-1 Ac35-2, Ac35-3, Ac35-4, Ac36-1, Ac36-3, Ac36-4, Ac37-1, Ac37-2, Ac38-1, Ac38-2, Ac39-1, Ac39-2	91	71.65

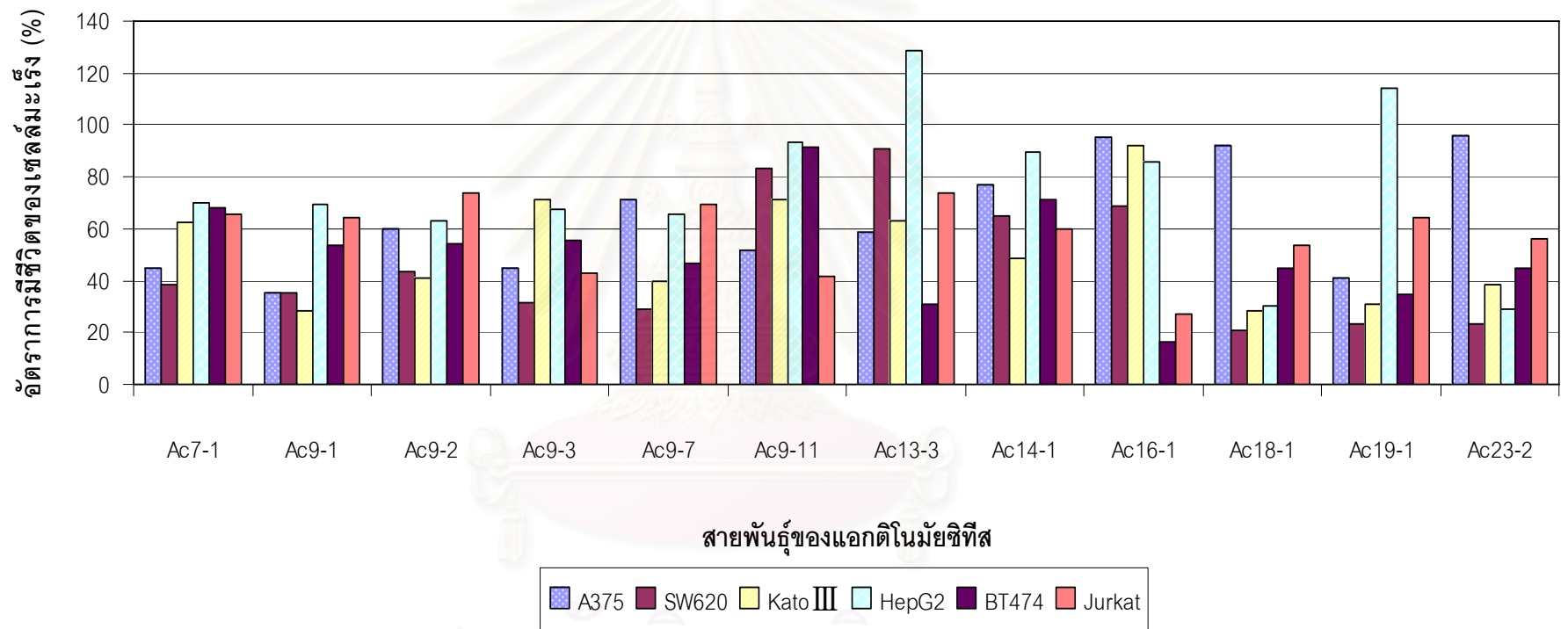


**รูปที่ 4.2** แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนแอกติโนมัยซิติสสายพันธุ์ที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% และจำนวนสายพันธุ์ที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งทุกชนิดมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 50%

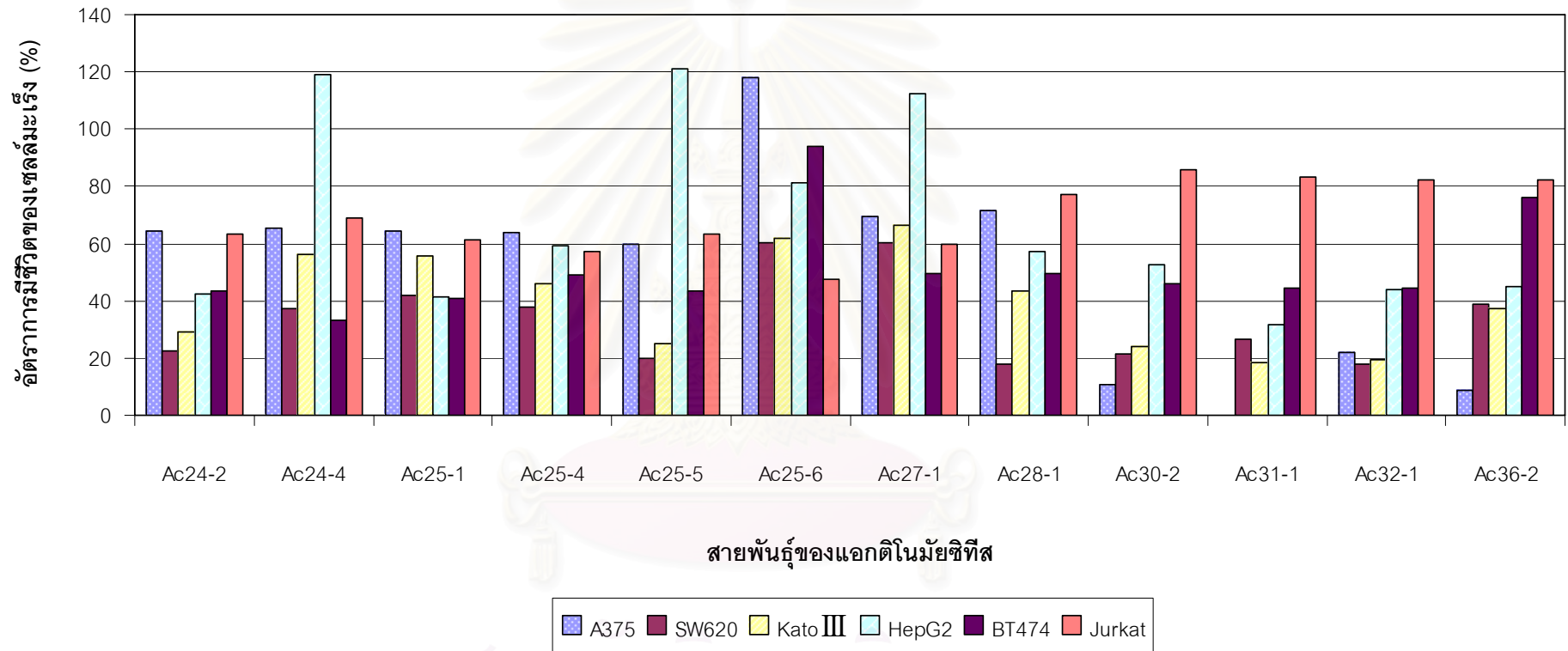
จากรูปที่ 4.2 แอกติโนมัยซิติสในกลุ่มแรกสามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ โดยทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% มีจำนวน 28.35% ได้แก่ แอกติโนมัยซิติสสายพันธุ์ที่ทำให้เซลล์มะเร็งผิวหนัง เซลล์มะเร็งลำไส้ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร เซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% มีจำนวน 7.09, 18.90, 18.11, 8.66, 14.96 และ 6.30 % ตามลำดับ ส่วนแอกติโนมัยซิติสกลุ่มที่สองที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 50% มีจำนวน 71.65% ดังนั้นในการคัดเลือกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซิติสจึงให้ความสนใจเฉพาะแอกติโนมัยซิติสที่มีความสามารถทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% เท่านั้น การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากแอกติโนมัยซิติสขึ้นอยู่กับกลไกของสารที่มีปฏิกริยากับตัวรับ (receptor) ของเซลล์ และสารบางชนิดอาจชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis แอกติโนมัยซิติสที่มีความสามารถทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% แต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ต่างชนิดกัน ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้มากกว่า 1 ชนิด มีเพียง 2 สายพันธุ์แสดงการยับยั้งอย่างจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านม แสดงดังรูปที่ 4.3 แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซิติสที่สารสกัดมีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% อย่างน้อยหนึ่งเซลล์ไลน์



รูปที่ 4.3 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากแอคติโนมายซีทีส โดยแสดงสายพันธุ์ที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% อย่างน้อยหนึ่งเซลล์ไลน์



รูปที่ 4.3 (ต่อ) แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากแอกติโนมัซซิทิส โดยแสดงสายพันธุ์ที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% อย่างน้อยหนึ่งเซลล์ไลน์



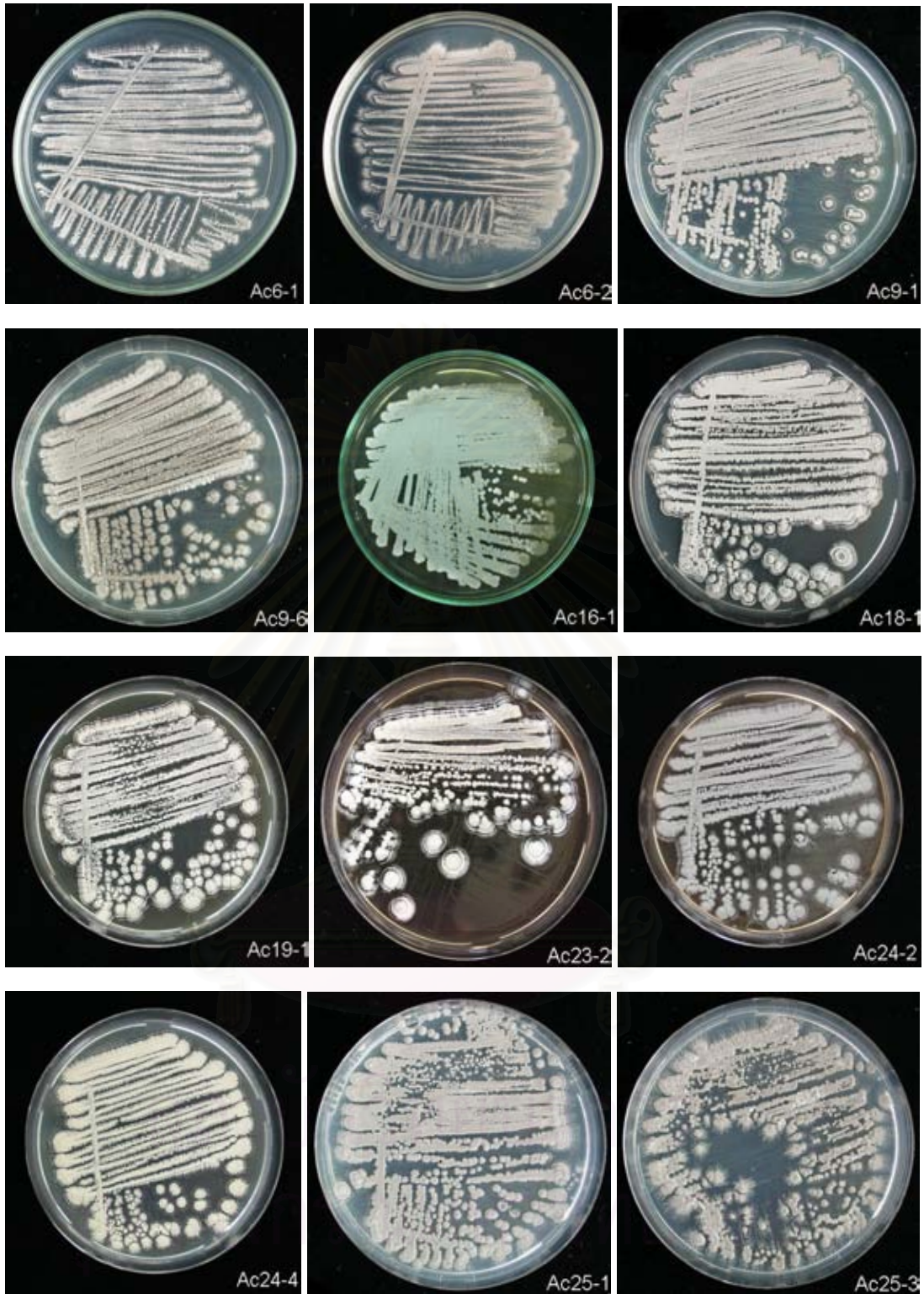
รูปที่ 4.3 (ต่อ) แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากแอกติโนมายซีทีส โดยแสดงสายพันธุ์ที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% อย่างน้อยหนึ่งเซลล์ไลน์

แอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากมูลสัตว์กินพืชจำนวน 127 สายพันธุ์ มีจำนวน 33 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งจุลินทรีย์สอปและเซลล์มะเร็ง โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็งได้สูงแสดงดังรูปที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งจุลินทรีย์สอปและเซลล์มะเร็ง

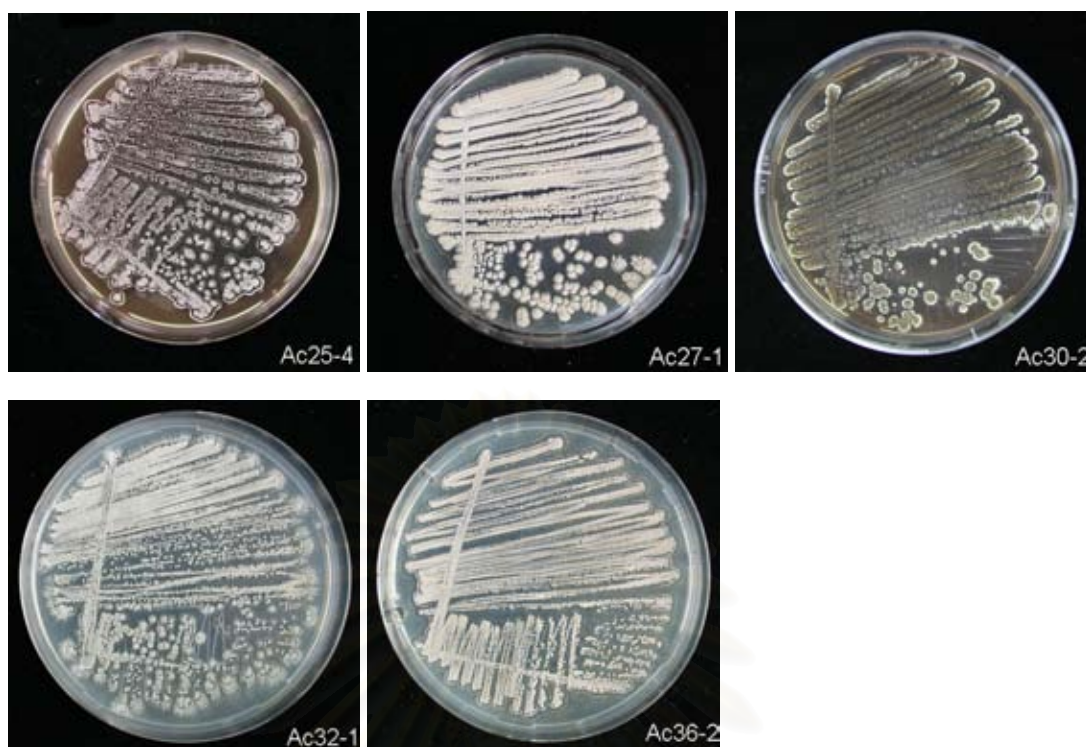


รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งจุลินทรีย์สอปและเซลล์มะเร็งมนุษย์





รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สลายพืชรูปร่างที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง จุลินทรีย์ทดสอบและเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

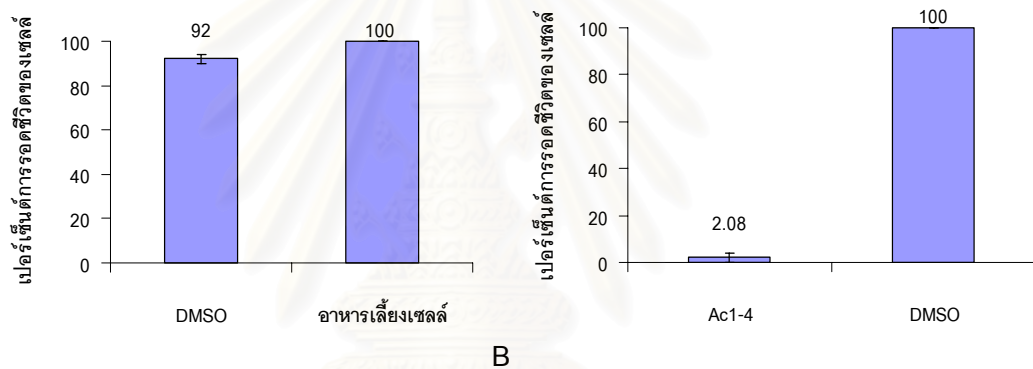


**รูปที่ 4.4** แสดงลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง จุลินทรีย์ทดสอบและเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

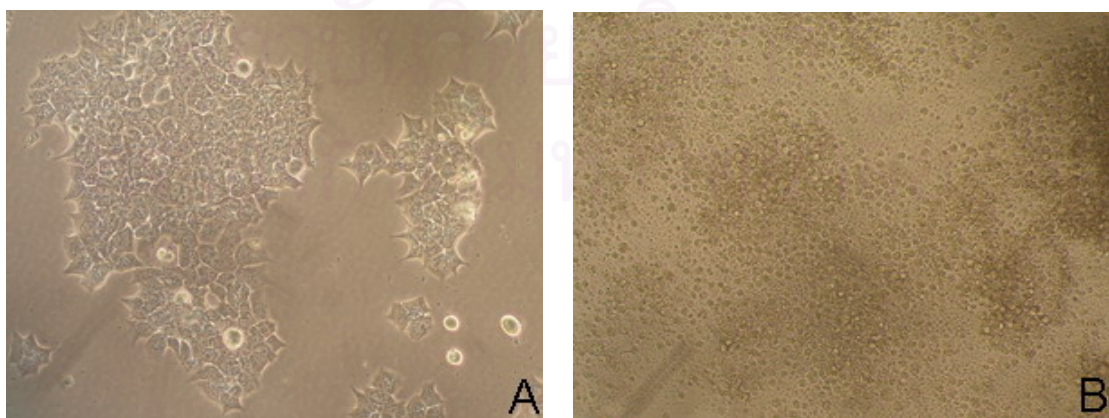
จากแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้ 127 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิดมีจำนวน 84 สายพันธุ์ คิดเป็น 66.14% ของจำนวนสายพันธุ์ที่แยก ได้ทั้งหมด และสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์โดยทำให้เซลล์มะเร็งมี เปรอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% อย่างน้อยหนึ่งเซลล์ไลน์ มีจำนวน 36 สายพันธุ์ คิดเป็น 28.35% ของจำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้ทั้งหมด จากการเปรียบเทียบความสามารถในการ สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบและสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์พบว่ามี จำนวน 33 สายพันธุ์ คิดเป็น 25.98% ของจำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้ทั้งหมดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งทั้ง จุลินทรีย์ทดสอบอย่างน้อยหนึ่งชนิดและยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์โดยทำให้เซลล์มะเร็งมี เปรอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% อย่างน้อยหนึ่งเซลล์ไลน์ เป็นส่วนใหญ่สายพันธุ์ที่ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้จะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ด้วย

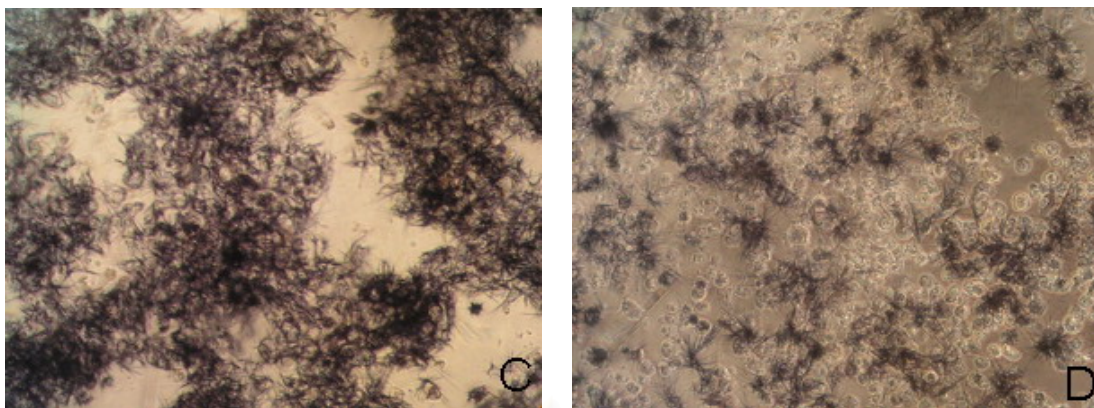
#### 4.7 ผลทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งและการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของ แอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

จากการทดสอบหาแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ ทดสอบโดยวิธี Agar well และยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์โดยวิธี MTT method พบว่าแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดและจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง เต้านม (BT474) โดยทำให้เซลล์มะเร็งเต้านมมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 2.08% ดังรูปที่ 4.5 และ 4.6 และนอกจากนี้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างสูงต่อ ยีสต์และรา ได้แก่ *C. albicans*, *S. cerevisiae* และ *A. niger* แสดงดังรูปที่ 4.7 และออกฤทธิ์ ยับยั้งอย่างอ่อนต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus* และ *S. aureus*



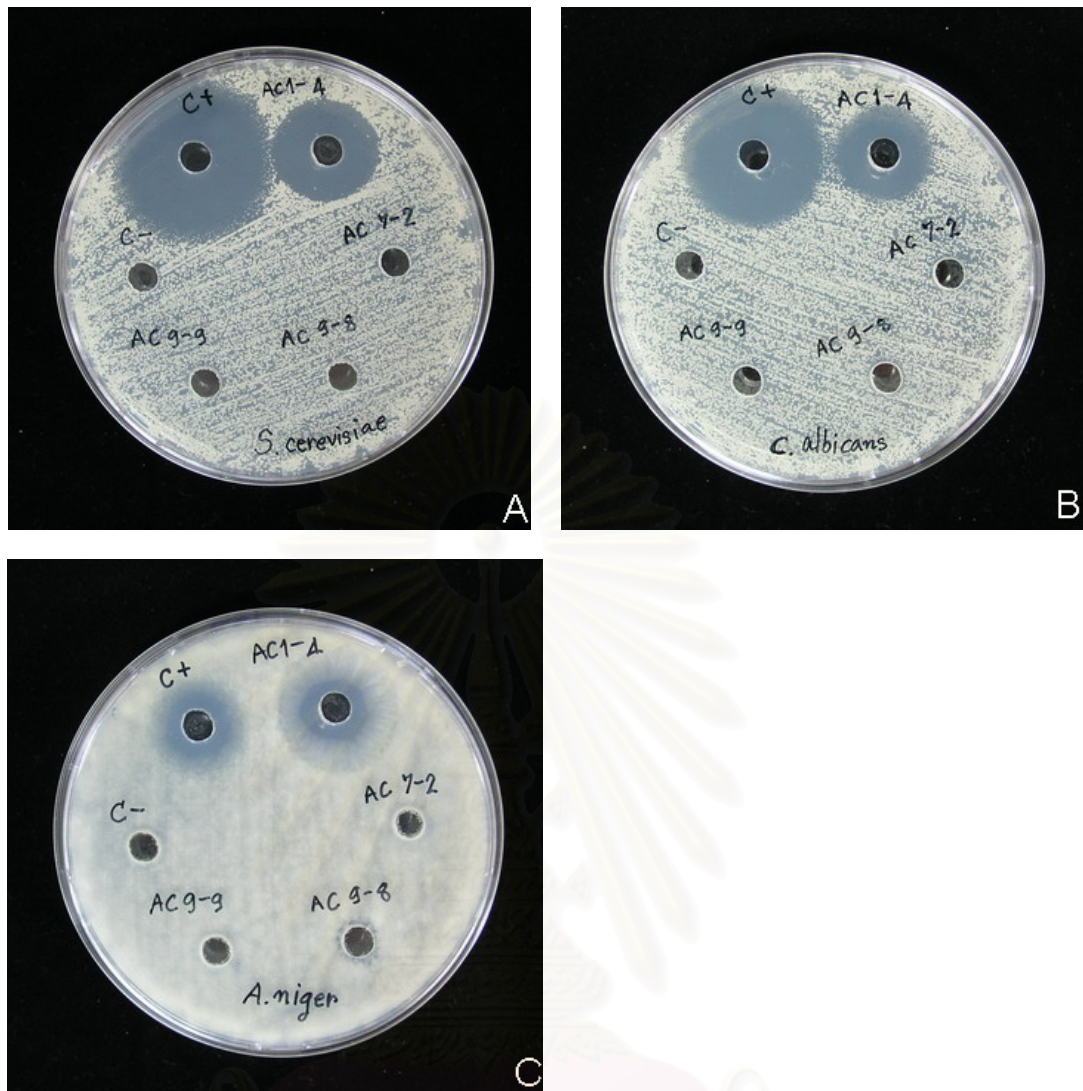
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) A) ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2% เท่ากับ 92% B) ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac1-4 ปริมาตร 1% v/v มีค่าเท่ากับ 2.08%





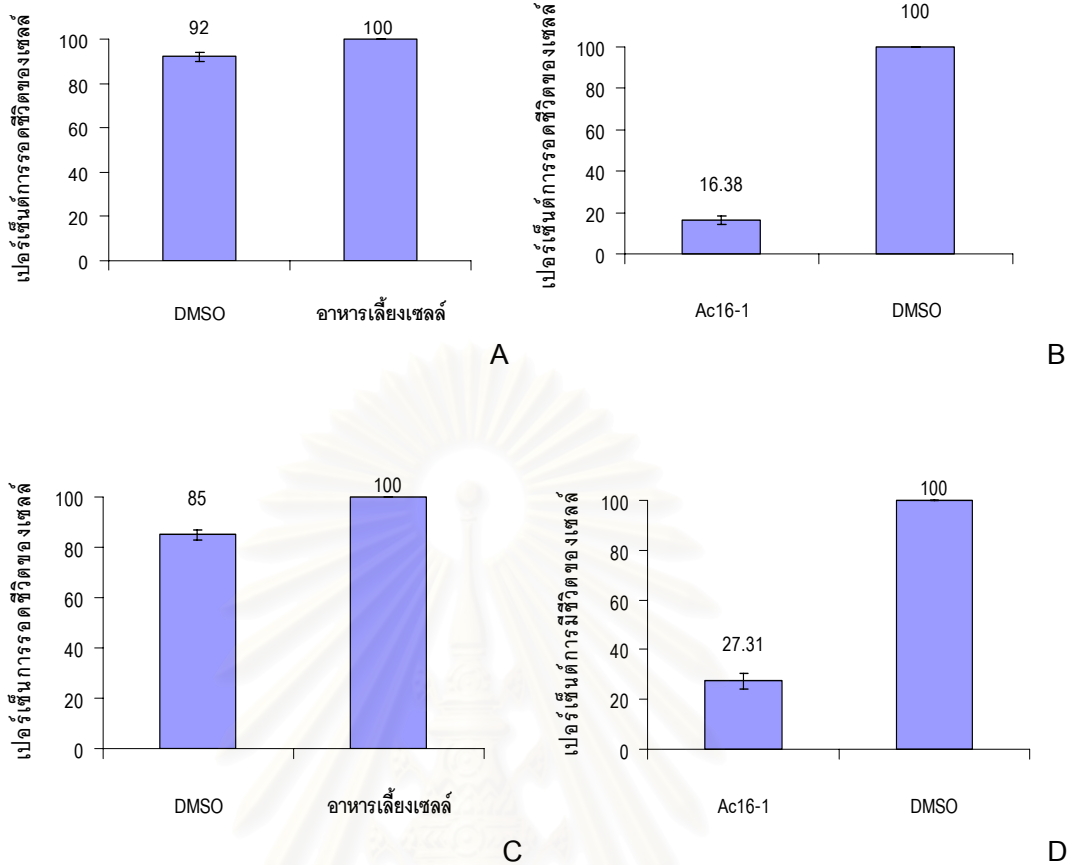
**รูปที่ 4.6** แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac1-4

- A) ชุดควบคุมควบ เซลล์มะเร็งเจริญขยายขนาดเป็นปกติมีขอบเซลล์สว่างใสสะท้อนแสง
- B) เซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac1-4 ส่งผลให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนไปจากเดิม และตาย
- C) ชุดควบคุมควบเมื่อเติมสารละลาย MTT ซึ่งสารละลาย MTT จะทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้สารละลาย MTT เปลี่ยนเป็นผลึกสีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ เรียกว่าผลึก formazan ซึ่งปริมาณ dehydrogenase ในเซลล์หนึ่ง ๆ จะคงที่ดังนั้น ปริมาณผลึก formazan ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์มีชีวิตจึงทำให้ชุดควบคุมเกิดผลึก formazan เป็นจำนวนมาก
- D) เซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac1-4 ซึ่งเป็นผลให้เซลล์ตายทำให้เอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase มีปริมาณน้อยเมื่อเติมสารละลาย MTT ทำให้เกิดผลึก formazan จำนวนน้อย



รูปที่ 4.7 แสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ A) *C. albicans*, B) *S. cerevisiae* และ C) *A. niger* ของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีที่สายพันธุ์ Ac1-4

แอกติโนมัยซีที่สายพันธุ์ Ac16-1 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) โดยทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยที่สุดเท่ากับ 27.31% และเซลล์มะเร็งเต้านมมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 16.38% แสดงดังรูปที่ 4.8 และ 4.9 นอกจากนี้สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างสูงกับแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *B. cereus* และ *S. aureus* ดังรูปที่ 4.10 และออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อนกับแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa* และ *E. coli*), ยีสต์ (*S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*)

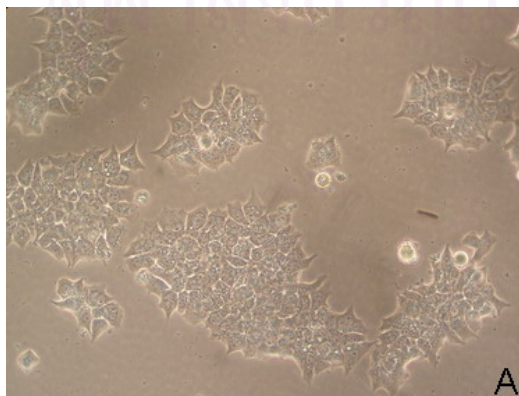


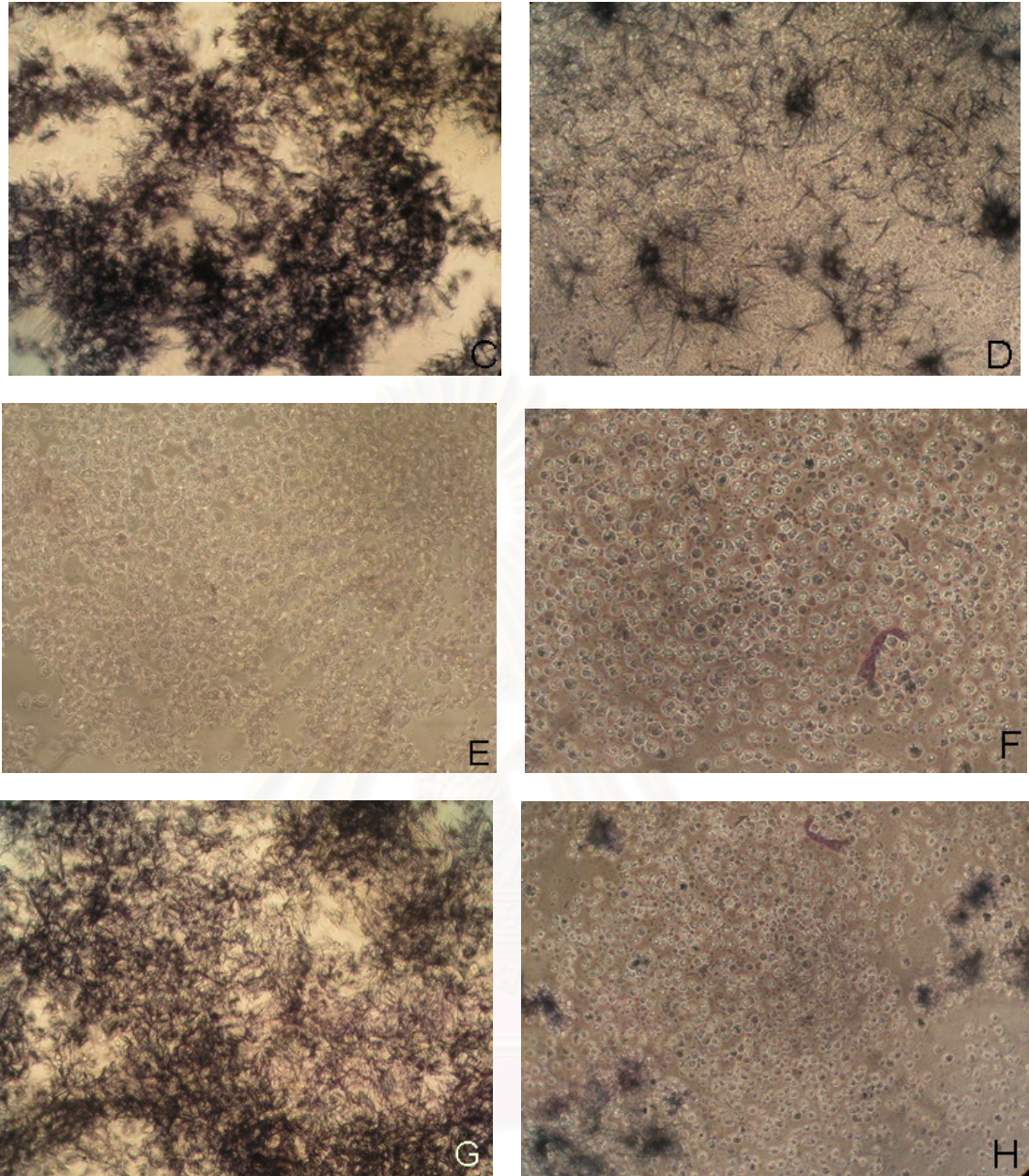
**รูปที่ 4.8** กราฟแสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

(Jurkat) ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1

A และ C) ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ BT474 และ Jurkat ที่ได้รับ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% เท่ากับ 92% และ 85% ตามลำดับ

B และ D) ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ BT474 และ Jurkat ที่ได้รับสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1 ปริมาตร 1% v/v มีค่าเท่ากับ 16.38 % และ 27.31% ตามลำดับ





รูปที่ 4.9 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (รูป A,B,C และ D) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

(รูป E,F,G และ H) ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1

A และ E) ชุดควบคุมของเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

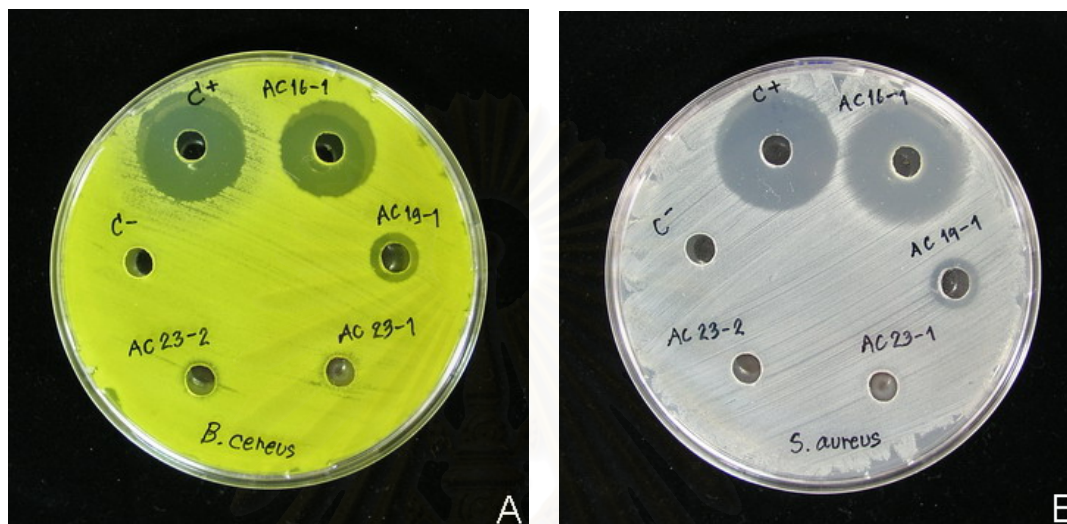
ตามลำดับ เซลล์มะเร็งเจริญเป็นปกติและมีขอบเซลล์สว่างใสสะท้อนแสง

B และ F) เซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1 ส่งผลให้เซลล์มีรูปร่างผิดปกติและตาย

C และ G) ชุดควบคุมเมื่อเติมสารละลาย MTT ซึ่งสารละลาย MTT จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ซึ่งปริมาณผลิตภัณฑ์ formazan ที่เกิดขึ้น

เป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิตจึงทำให้ชุดควบคุมเกิดผลึก formazan เป็นจำนวนมาก

D และ H) เซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1 ซึ่งเป็นผลให้เซลล์มีรูปร่าง ผิดปกติและตายทำให้เอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase มีปริมาณ น้อยเมื่อเติมสารละลาย MTT ทำให้เกิดผลึก formazan ปริมาณน้อย



รูปที่ 4.10 แสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ A) *B. cereus* และ B) *S. aureus* ของสารสกัด จากแอคติโนมัยซีที่สายพันธุ์ Ac16-1

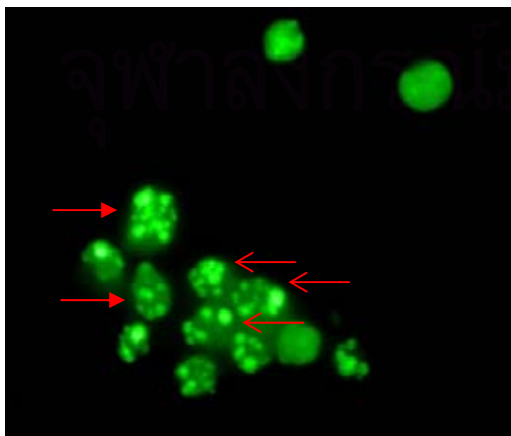
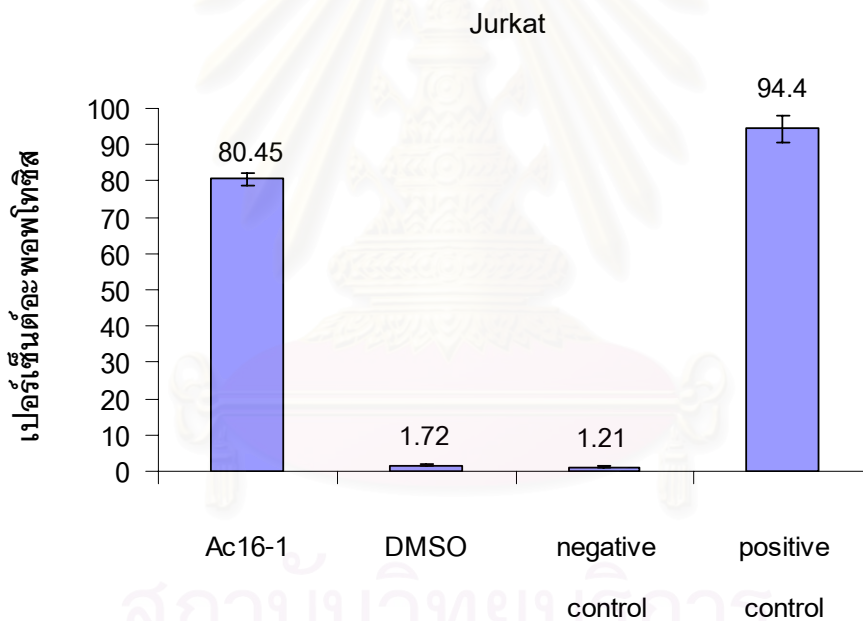
จากผลการทดลองข้างต้นสามารถคัดเลือกแอคติโนมัยซีที่สกัดได้ 2 สายพันธุ์ คือ Ac1-4 และ Ac16-1 เนื่องจากสายพันธุ์ Ac1-4 แสดงผลการยับยั้งสูงสุดและจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างสูงต่อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ ยีสต์ (*C. albicans*, *S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*) สายพันธุ์ Ac16-1 แสดงผลการยับยั้งสูงสุดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) และยับยั้งได้ในระดับสูงต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างสูงต่อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *B. cereus* และ *S. aureus* ได้คัดเลือกแอคติโนมัยซีทั้งสองสายพันธุ์เพื่อนำไปศึกษาต่อถึงการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis, การสร้างสารปฏิชีวนะและทำให้สารบริสุทธิ์เบื้องต้น และศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา ชีวเคมี และสัณฐานวิทยาต่อไป



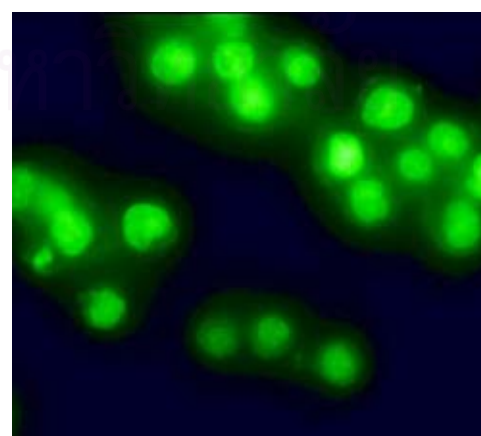
#### 4.8 ผลของสารสกัดจากแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342

เพื่อศึกษาว่าสารสกัดจากแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ทำลายเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิสหรือไม่ จึงทำการศึกษาผลของสารสกัดต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ BT474 และ Jurkat เมื่อเติมสารสกัดจากแอกติโนมายซีทีส 1 %v/v เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้อมเซลล์ด้วย Hoechst 33342 พบว่าสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1 สามารถชักนำให้เซลล์มะเร็ง Jurkat และ BT474 เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิสได้สูง แสดงผลดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 ส่วนสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac1-4 ไม่มีผลชักนำให้เซลล์มะเร็ง BT474 เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิส แสดงผลดังรูปที่ 4.13

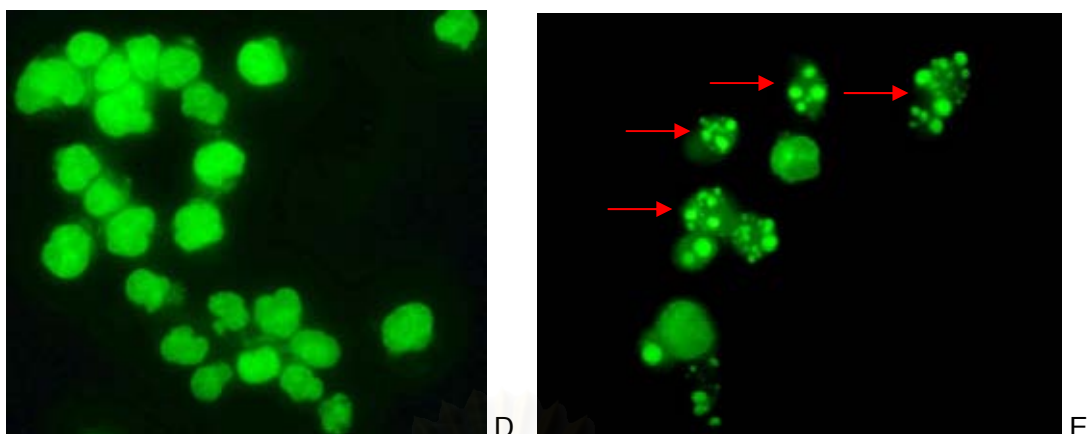
A



B



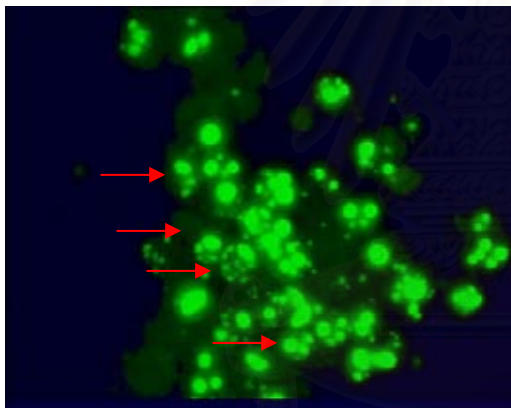
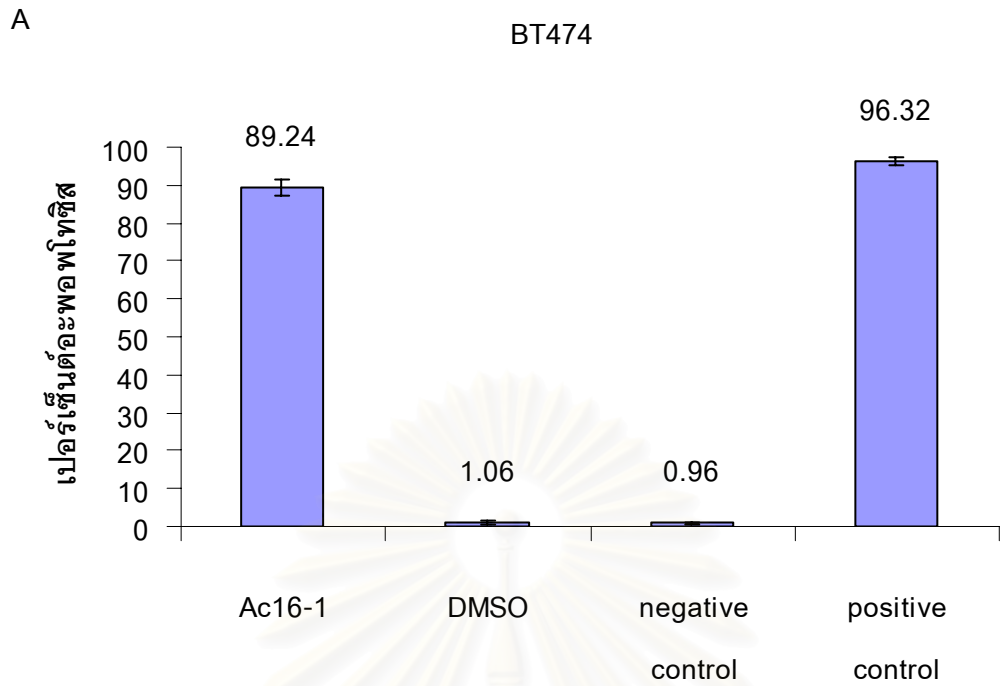
C



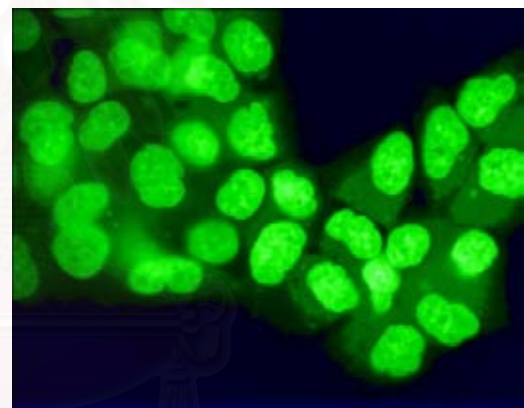
**รูปที่ 4.11** ผลของสารสกัดจากแอนติโนมัยซีสสายพันธุ์ Ac16-1 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ Jurkat ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 200 เท่า

- A. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ Jurkat เมื่อเติมสารสกัดจากแอนติโนมัยซีสสายพันธุ์ Ac16-1 ปริมาตร 1% v/v
- B. เติมสารสกัดจากแอนติโนมัยซีสสายพันธุ์ Ac16-1 ปริมาตร 1% v/v เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- C. เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- D. เซลล์ผลลบควบคุม
- E. เซลล์ผลบวกควบคุม เติม Etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

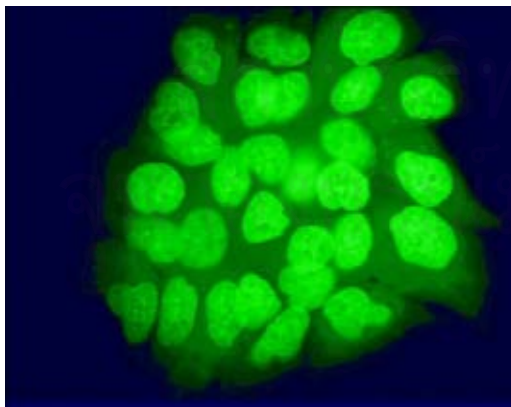
[เครื่องหมายลูกศรชี้ (→) คือเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส]



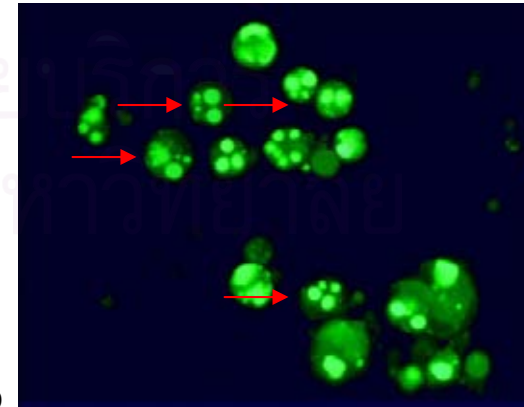
B



C



D

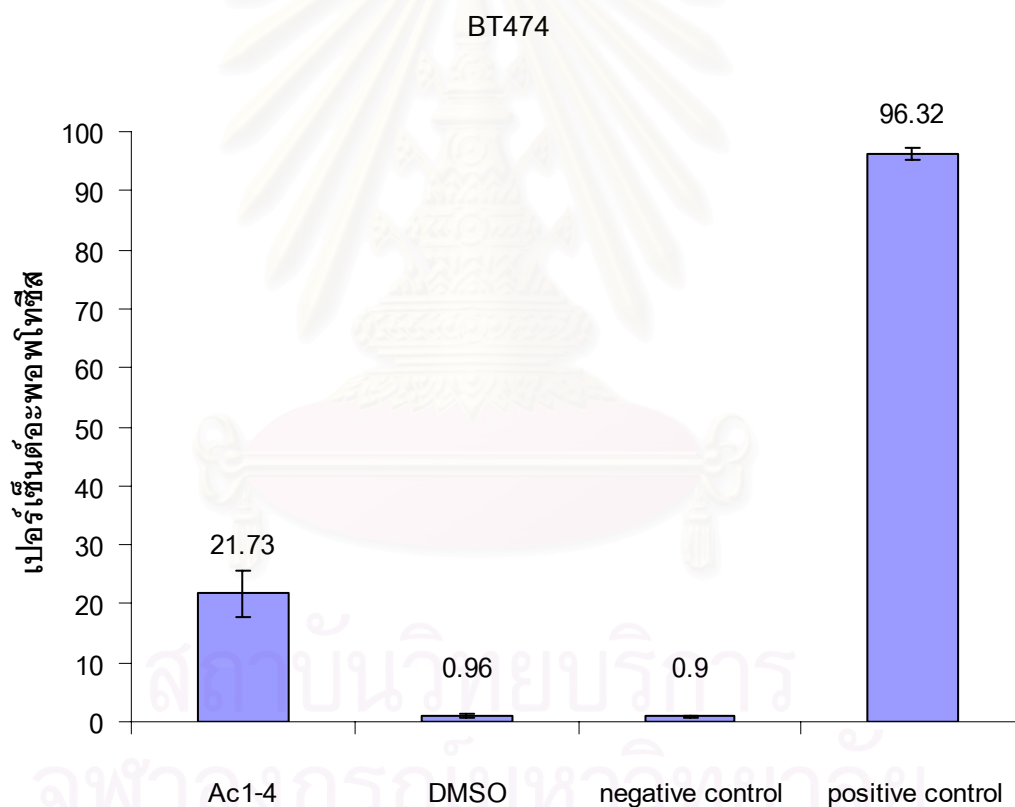


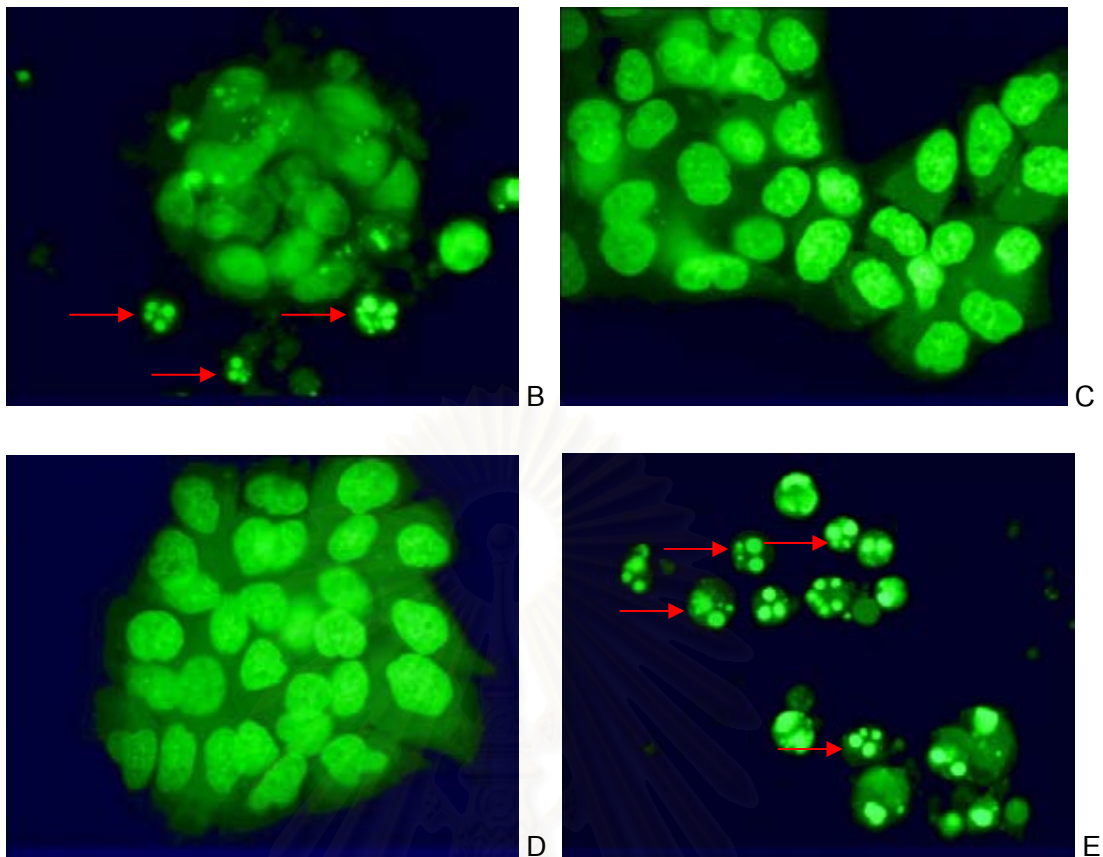
E

รูปที่ 4.12 ผลของสารสกัดจากแอนติโนไม์ซีสสายพันธุ์ Ac16-1 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ BT474 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 200 เท่า

- A. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ BT474 เมื่อเติมสารสกัดจากแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac16-1 ปริมาตร 1% v/v
- B. เติมสารสกัดจากแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac16-1 ปริมาตร 1% v/v เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- C. เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- D. เซลล์ผลลบควบคุม
- E. เซลล์ผลบวกควบคุม เติม Etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง
- [เครื่องหมายลูกศรชี้ (→) คือเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส]

A





**รูปที่ 4.13** ผลของสารสกัดจากแอคติโนไมซีตสายพันธุ์ Ac1-4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ BT474 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 200 เท่า

- A. กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ BT474 เมื่อเติมสารสกัดจากแอคติโนไมซีตสายพันธุ์ Ac1-4 ปริมาตร 1% v/v
- B. เติมสารสกัดจากแอคติโนไมซีตสายพันธุ์ Ac1-4 ปริมาตร 1% v/v เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- C. เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- D. เซลล์ผลลบควบคุม
- E. เซลล์ผลบวกควบคุม เติม Etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

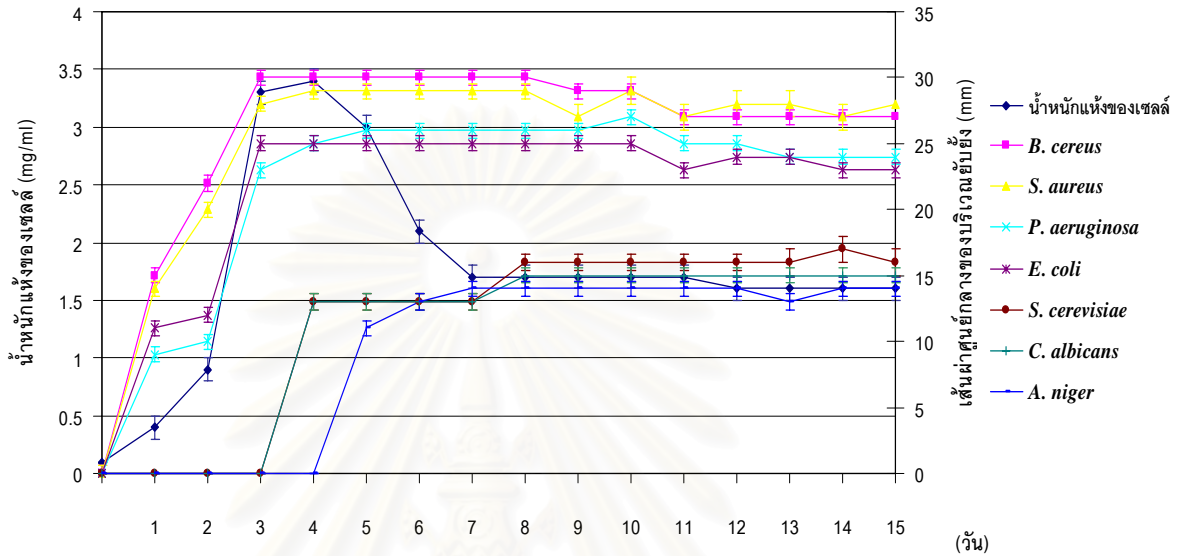
[เครื่องหมายลูกศรชี้ (→) คือเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส]

#### 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (Growth) และการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง จุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

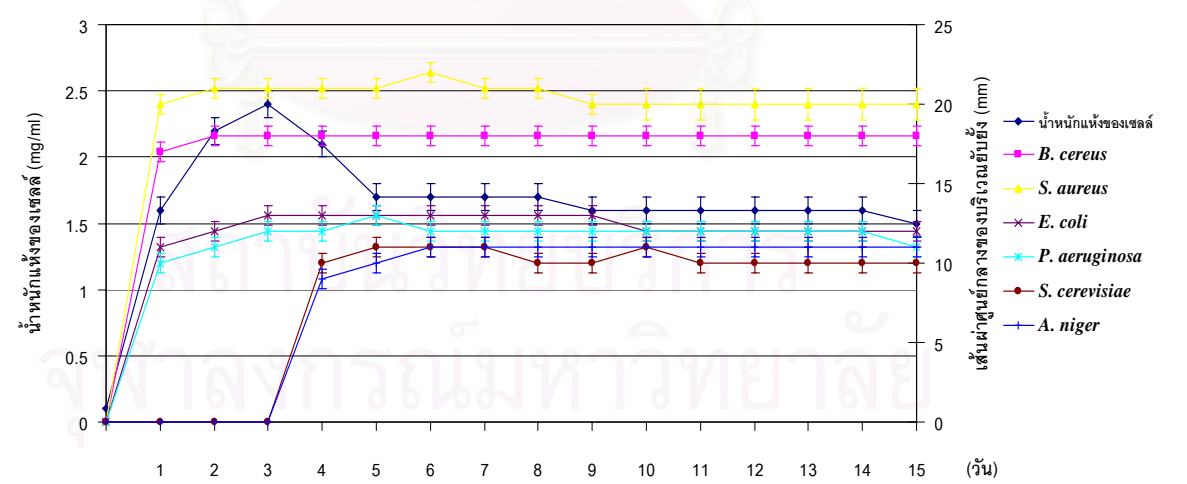
ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac 1-4 และ Ac16-1 ในอาหารเหลว Sodium Caseinate Yeast Extract Broth (SCYB) โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 และ 15 ตามลำดับ กรองแยกส่วนของเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ และหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย นำน้ำเลี้ยงเชื้อไประเหยน้ำออกให้เข้มข้นขึ้นแล้วนำมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar well พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ Ac1-4 ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) ยีสต์ (*S. cerevisiae* และ *C. albicans*) และรา (*A. niger*) ซึ่งปริมาณสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างออกมาขึ้นอยู่กับเวลาในการเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 จากกราฟพบว่าการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ log phase ในวันที่ 2 เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 3 และเข้าสู่ระยะ death phase หลังจากวันที่ 4 การสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 1 และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 3 มีปริมาณสูงสุดและจะคงที่เรื่อยไป สายพันธุ์ Ac1-4 เริ่มสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์และราหลังจากวันที่ 3 และ 4 ตามลำดับ และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 8 หลังจากนั้นจะมีปริมาณคงที่เรื่อยไป ดังนั้นในการเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะควรใช้เวลาอย่างน้อย 8 วัน

น้ำเลี้ยงเชื้อจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac16-1 ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) ยีสต์ (*S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*) การสร้างสารปฏิชีวนะขึ้นอยู่กับเวลาในการเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac16-1 จากกราฟพบว่าการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ log phase ในเวลาก่อน 24 ชั่วโมง เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังวันที่ 2 และเข้าสู่ระยะ death phase หลังวันที่ 3 การสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 1 และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 2 มีปริมาณสูงสุดและจะคงที่เรื่อยไป สารออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์และราเริ่มสร้างหลังจากวันที่ 3 และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 6 หลังจากนั้นจะมีปริมาณคงที่เรื่อยไป ดังนั้นในการเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac16-1 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะควรใช้เวลาอย่างน้อย 6 วัน จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่ายังมีสารปฏิชีวนะบางชนิดที่ไม่สามารถสกัดได้ด้วยเอทิลเอซีเตตโดยเฉพาะในสายพันธุ์ Ac1-4 ในส่วนของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง

แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบซึ่งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้สูงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย แต่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้น้อยกับแบคทีเรียแกรมบวกและไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ถูกสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงศึกษาการแปรผันตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารปฏิชีวนะในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ต่อไป



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1

#### 4.10 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารปฏิชีวนะจากสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

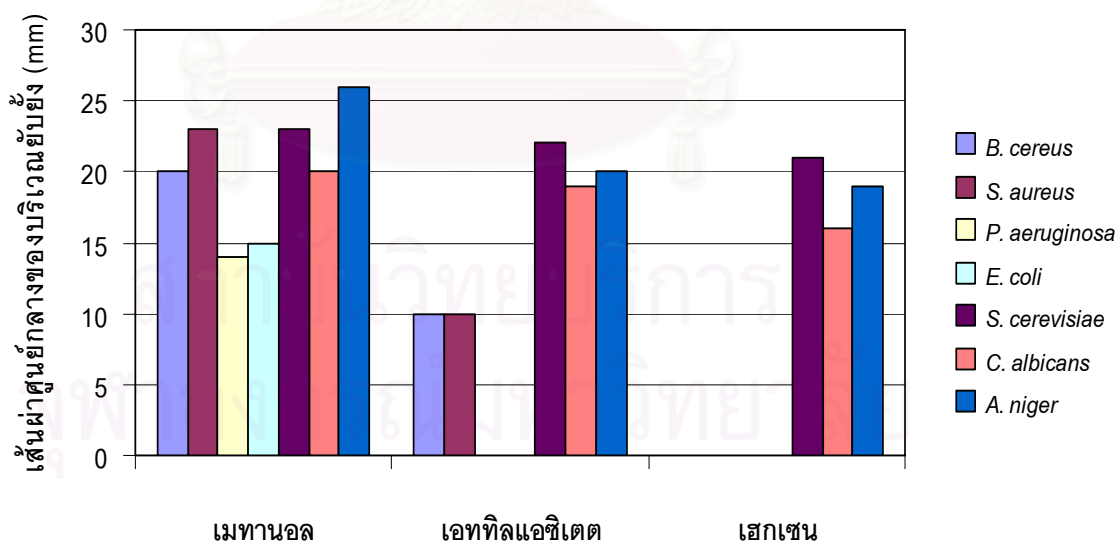
ศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบจากน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 โดยการแปรผันตัวทำละลาย คือ เมทานอล เอทิลแอลกอฮอล์ และเฮกเซน หลังจากสกัดและระเหยตัวทำละลายออกจนแห้งแล้ว ละลายสารที่สกัดได้ในสารละลาย 20% DMSO และทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ Ac1-4 คือ เมทานอลเพราะสารสกัดจากเมทานอลออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*), แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*), ยีสต์ (*S. cerevisiae* และ *C. albicans*) และ รา (*A. niger*) ในขณะที่เอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายสารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus*) ยีสต์และรา แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ หรือเฮกเซนเป็นตัวทำละลายสารสกัดจะออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์และราเท่านั้น ดังตารางที่ 4.7 และกราฟรูปที่ 4.16 แสดงบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันในสายพันธุ์ Ac1-4 ในการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ Ac16-1 พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ เอทิลแอลกอฮอล์ เพราะสารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*), แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*), ยีสต์ (*S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*) ในขณะที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายสารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งเพียงแบคทีเรียแกรมบวกและรา หรือใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายสารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งเพียงแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus*) ดังตารางที่ 4.8 และกราฟรูปที่ 4.17 แสดงบริเวณยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันในสายพันธุ์ Ac16-1



ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 ที่สกัดด้วย เมทานอล เอทิลแอลกอฮอล์ และเฮกเซน

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)			
	control* (น้ำเลี้ยงเชื้อ)	สารสกัดจาก เมทานอล	สารสกัดจาก เอทิลแอลกอฮอล์	สารสกัดจาก เฮกเซน
<i>B. cereus</i>	28.66 <sup>a</sup>	20.00 <sup>b</sup>	10.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>
<i>S. aureus</i>	26.33 <sup>a</sup>	23.33 <sup>b</sup>	10.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	24.33 <sup>b</sup>	14.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>
<i>E. coli</i>	24.31 <sup>b</sup>	15.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	17.33 <sup>d</sup>	23.00 <sup>a</sup>	22.00 <sup>c</sup>	21.00 <sup>d</sup>
<i>C. albicans</i>	15.00 <sup>d</sup>	20.00 <sup>b</sup>	18.00 <sup>c</sup>	15.66 <sup>d</sup>
<i>A. niger</i>	14.00 <sup>d</sup>	25.33 <sup>a</sup>	20.00 <sup>b</sup>	19.00 <sup>c</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลขในแนวนอน เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 a = ค่าเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมาคือ b,c และ d ตามลำดับ \*control คือน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้สกัดด้วยตัวทำละลาย

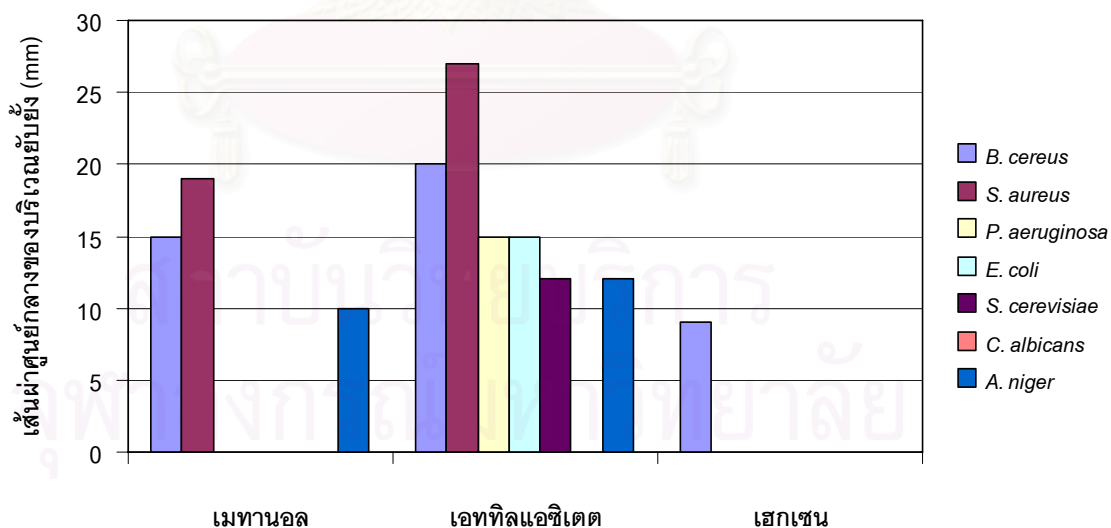


รูปที่ 4.16 แสดงบริเวณยับยั้งที่ได้จากการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันในสายพันธุ์ Ac 1-4

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 ที่สกัดด้วย เมทานอล เอทิลแอลกอฮอล์ และเฮกเซน

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)			
	control* (น้ำเลี้ยงเชื้อ)	สารสกัดจาก เมทานอล	สารสกัดจาก เอทิลแอลกอฮอล์	สารสกัดจาก เฮกเซน
<i>B. cereus</i>	17.33 <sup>b</sup>	15.00 <sup>c</sup>	20.00 <sup>a</sup>	9.33 <sup>d</sup>
<i>S. aureus</i>	21.33 <sup>b</sup>	19.00 <sup>c</sup>	26.33 <sup>a</sup>	0.00 <sup>d</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	13.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	15.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>
<i>E. coli</i>	13.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	15.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	10.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	13.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>
<i>C. albicans</i>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>
<i>A. niger</i>	13.00 <sup>c</sup>	10.00 <sup>c</sup>	13.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>

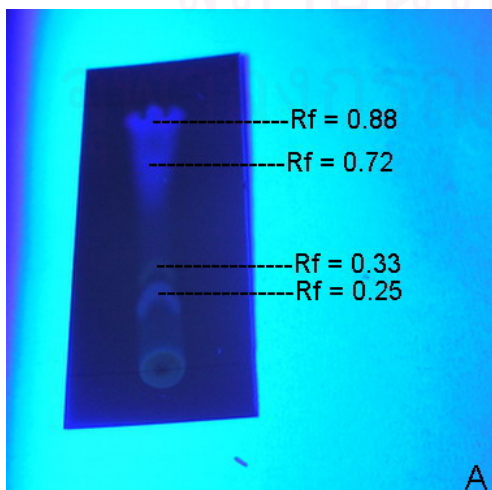
หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลขในแนวนอน เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 a = ค่าเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมาคือ b,c และ d ตามลำดับ \*control คือ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้สกัดด้วยตัวทำละลาย

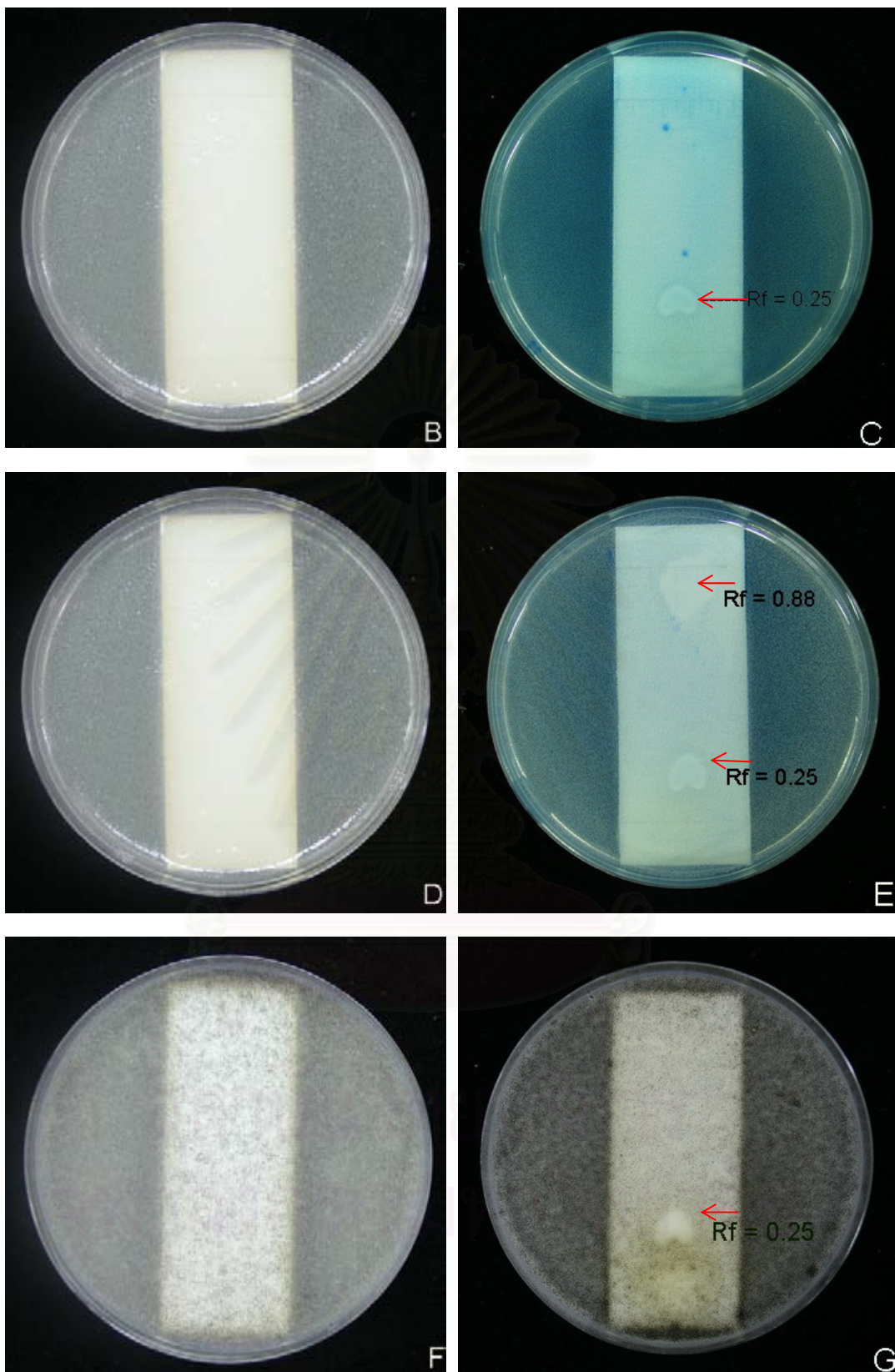


รูปที่ 4.17 แสดงบริเวณยับยั้งที่ได้จากการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันในสายพันธุ์ Ac 16-1

#### 4.11 การแยกและทำให้สารปฏิชีวนะบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

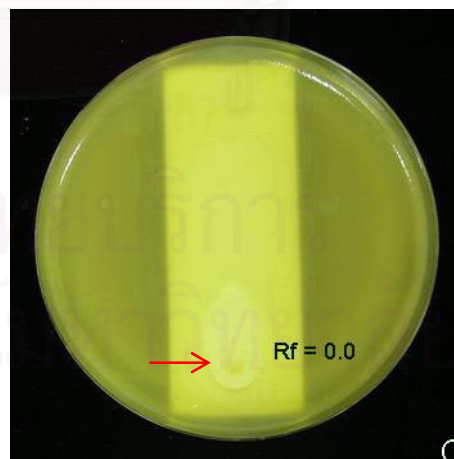
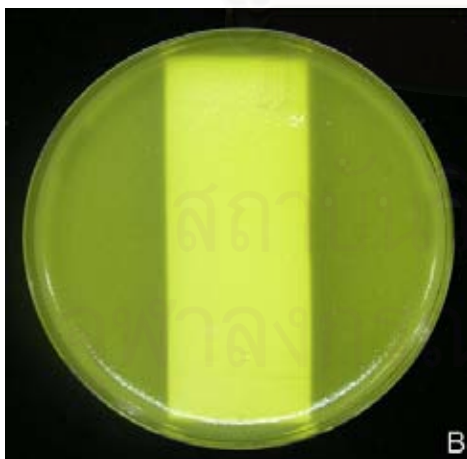
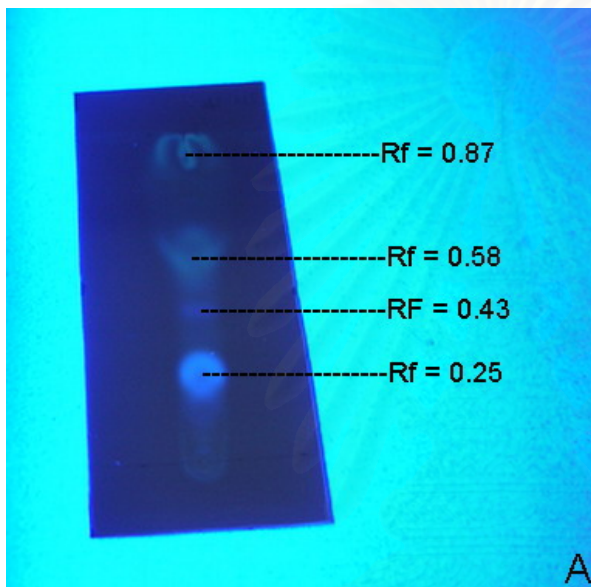
เลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ในอาหารเหลว SCYB นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ Ac1-4 สกัดด้วยเมทานอล และน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ Ac16-1 สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ หลังจากกระเหยตัวทำละลายออกแล้ว ละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายเดิมในปริมาตร 5 มิลลิลิตร แยกสารสกัดให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 โดยหยดสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC แล้วนำไป develop ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลในอัตราส่วน 9:1 ในกรณีที่สารสกัดมาจากสายพันธุ์ Ac1-4 และ develop ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์และเฮกเซนในอัตราส่วน 7:3 ในกรณีที่สารสกัดมาจากสายพันธุ์ Ac16-1 หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้รังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร สารสกัดจากสายพันธุ์ Ac1-4 ปรากฏแถบของสารแยกออกมา 4 ตำแหน่ง มีค่า Rf เท่ากับ 0.25, 0.33, 0.72 และ 0.88 หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ไปทดสอบหาตำแหน่งของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่าแถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.25 ออกฤทธิ์ยับยั้ง ยีสต์ (*C. albicans* และ *S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*) และแถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.88 ออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. Cerevisiae* ดังแสดงในรูปที่ 4.18 สารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1 ปรากฏแถบของสารแยกออกมาจำนวน 4 ตำแหน่ง ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.25, 0.43, 0.58 และ 0.87 หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ไปทดสอบหาตำแหน่งของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่า ณ ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.00 ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*), แบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa* และ *E. coli*), ยีสต์ (*C. albicans* และ *S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*) และแถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.87 ออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. Cerevisiae* ดังแสดงในรูปที่ 4.19

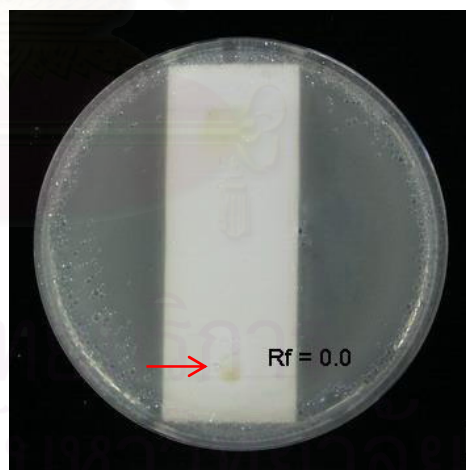
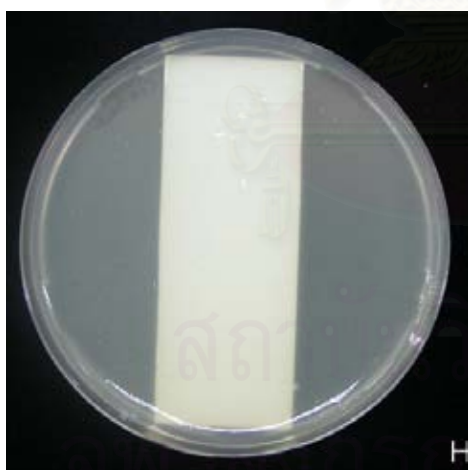
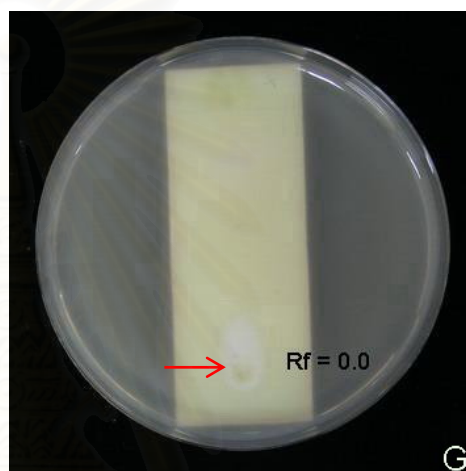
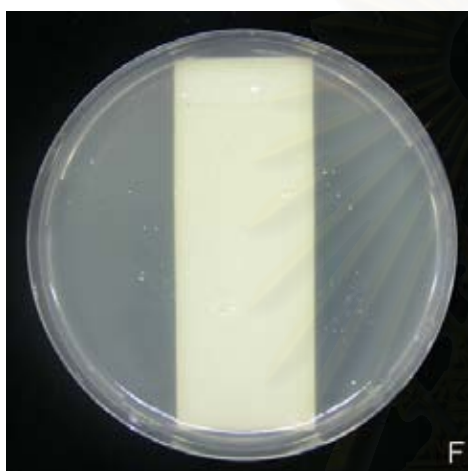
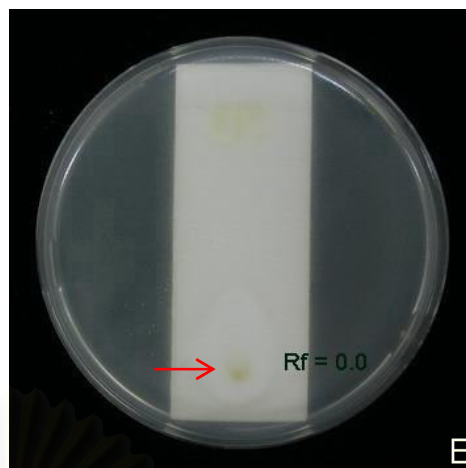
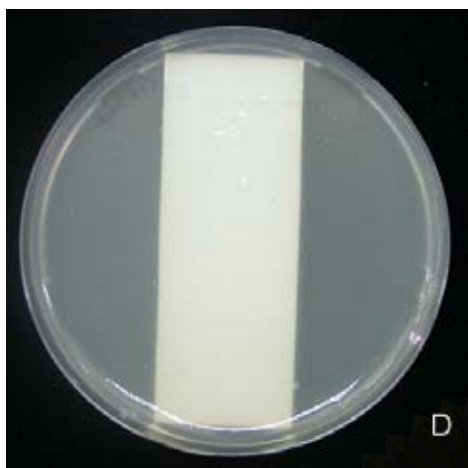


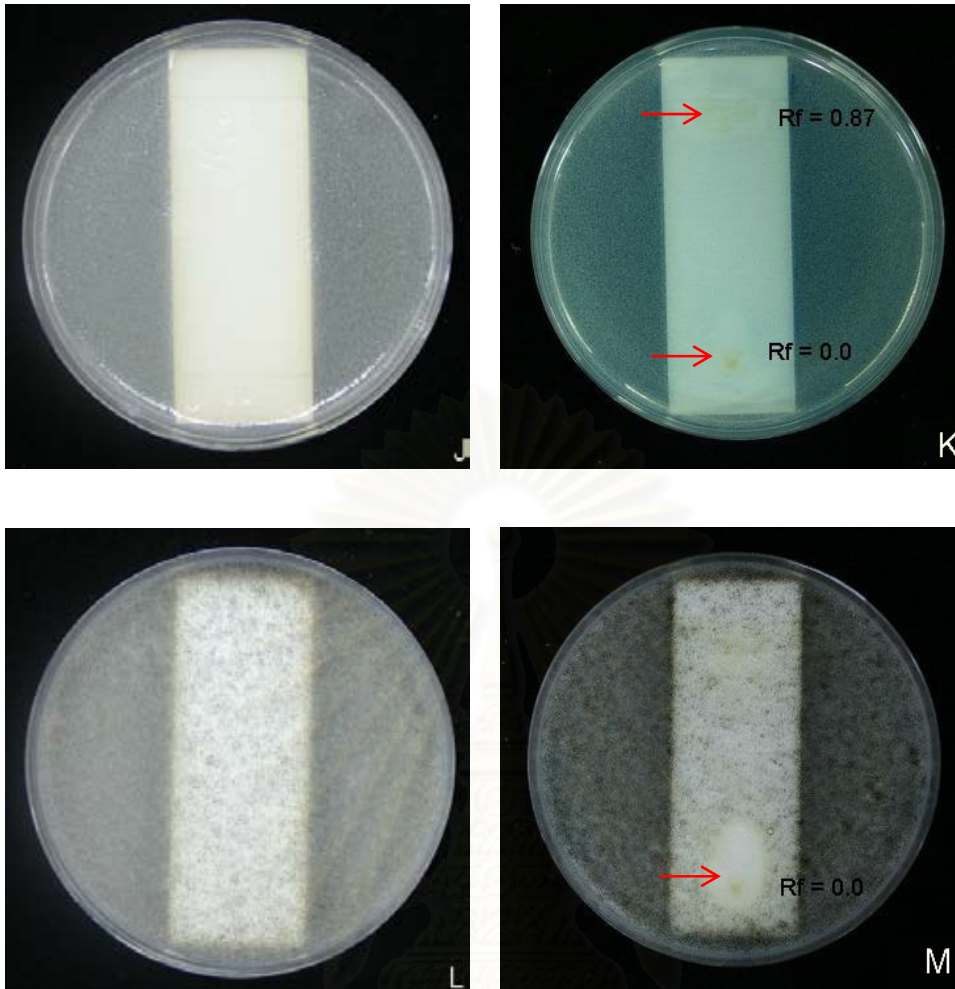


รูปที่ 4.18 แสดงการแยกและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac1-4

- A) ค่า Rf ของแต่ละองค์ประกอบของสารปฏิชีวนะสองภายใต้รังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 nm
- B) ผลควบคุมลบ *C. albicans*,      C) การยับยั้ง *C. albicans* ณ Rf ที่ 0.25
- D) ผลควบคุมลบ *S. cerevisiae*,      E) การยับยั้ง *S. cerevisiae* ณ Rf ที่ 0.25 และ 0.88
- F) ผลควบคุมลบ *A. niger*      G) การยับยั้ง *A. niger* ณ Rf ที่ 0.25
- [เครื่องหมายลูกศรชี้ (→) คือ จุดที่เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ]







รูปที่ 4.19 แสดงการแยกและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1

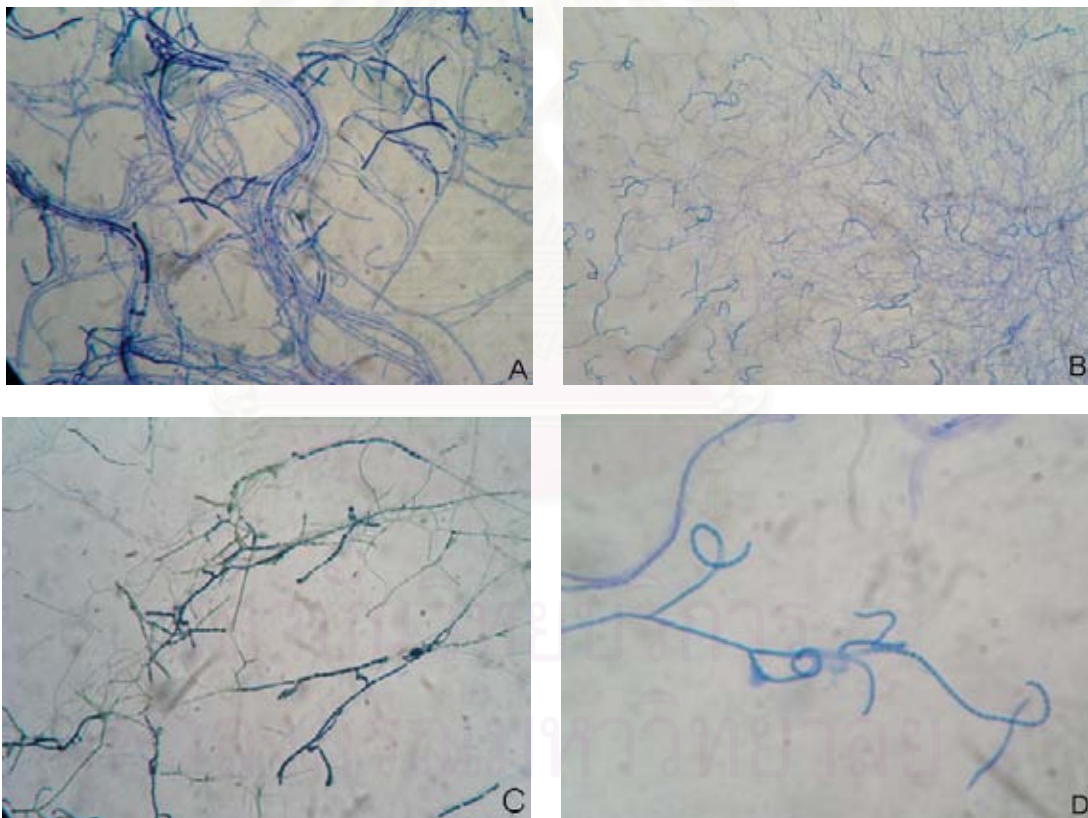
- A) ค่า Rf ของแต่ละองค์ประกอบของสารปฏิชีวนะสองภายใต้รังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 nm
- B) ผลควบคุมลบ *B. cereus*                      C) การยับยั้ง *B. cereus* ณ Rf ที่ 0.00
- D) ผลควบคุมลบ *S. aureus*                      E) การยับยั้ง *S. aureus* ณ Rf ที่ 0.00
- F) ผลควบคุมลบ *P. aeruginosa*                  G) การยับยั้ง *P. aeruginosa* ณ Rf ที่ 0.00
- H) ผลควบคุมลบ *E. coli*                      I) การยับยั้ง *E. coli* ณ Rf ที่ 0.00
- J) ผลควบคุมลบ *S. cerevisiae*,              K) การยับยั้ง *S. cerevisiae* ณ Rf ที่ 0.25 และ 0.87
- L) ผลควบคุมลบ *A. niger*                      M) การยับยั้ง *A. niger* ณ Rf ที่ 0.25
- [เครื่องหมายลูกศรชี้ (→) คือ จุดที่เกิดบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ]

#### 4.12 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

ศึกษาตามวิธีรายงานโดย Williams และคณะ Bergey's Manual of systematic Bacteriology Volume 9 (Williams และคณะ, 1994)

4.12.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope, กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 มาทำ slide culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCYA และ Glucose Yeast Malt Extract Agar (GYM) ตามลำดับ พบว่าสายพันธุ์ Ac1-4 มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศเหมือนเส้นด้ายที่มีลักษณะค่อนข้างเป็นเส้นตรงปลายโค้งงอ มีการสร้างสปอร์สายสั้น ๆ บนเส้นใยอาหาร สร้างสปอร์สายยาวบนเส้นใยอากาศ สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สายสปอร์เจริญเต็มที่ในวันที่ 11 ดังรูปที่ 4.20

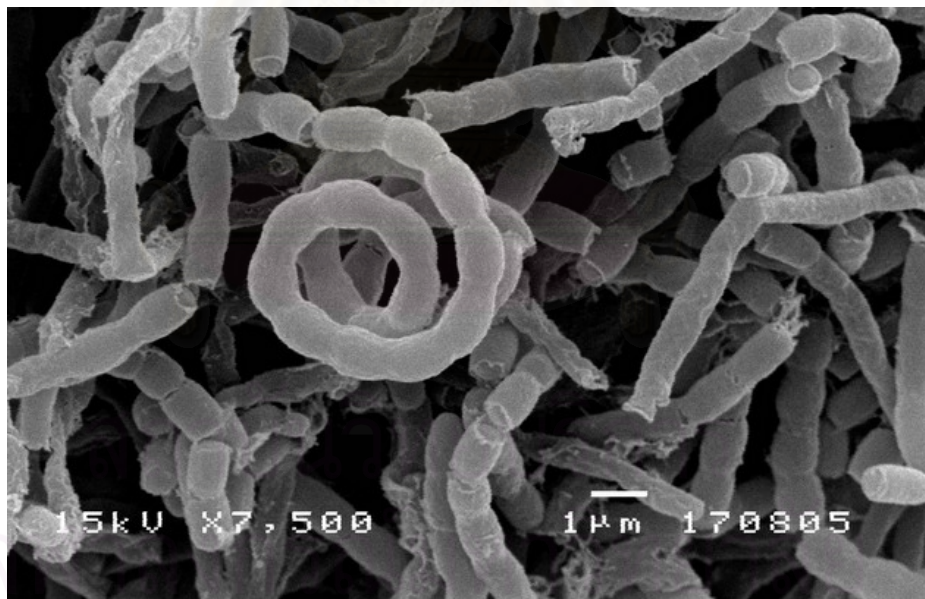


รูปที่ 4.20 แสดงภาพการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 บนอาหารแข็ง SCYA เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (A,C และ D) และ กำลังขยาย 40 เท่า (B)

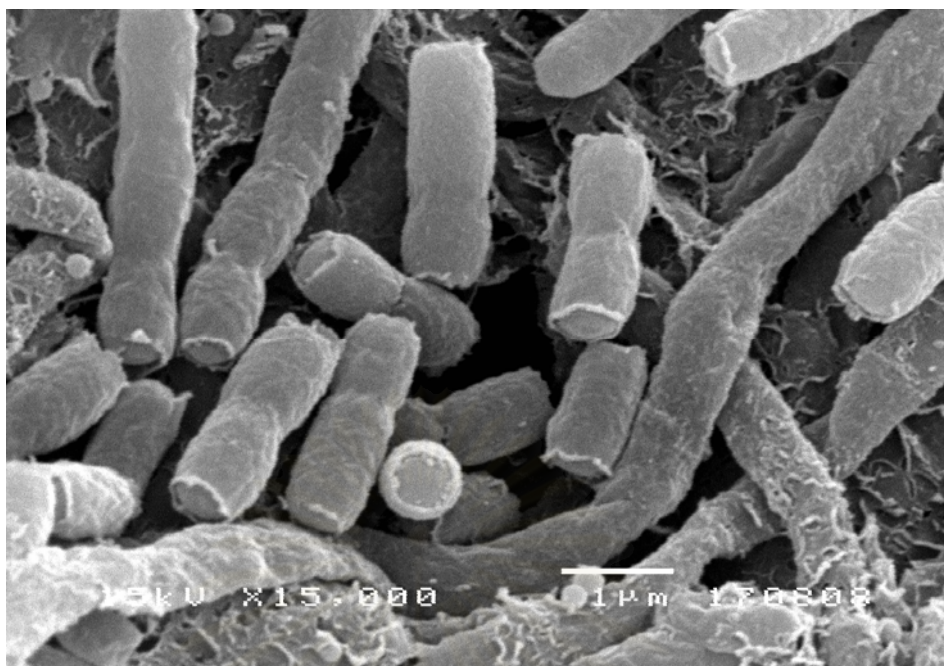


- A) เส้นใยอาหารอายุ 5 วัน มีลักษณะเป็นเส้นหนา มีการแตกแขนงเล็กน้อยบางส่วนย้อมติดสีเข้มของ methylene blue
- B) เส้นใยอากาศอายุ 5 วัน มีเส้นใยไม่หนาแน่นปลายของเส้นใยกำลังพัฒนาไปเป็นสายสปอร์จึงทำให้มีผนังเซลล์หนาขึ้นย้อมติดสีเข้มกว่าส่วนของเส้นใยส่วนอื่น
- C) เส้นใยอาหารในวันที่ 7 มีการแตกแขนงสั้น ๆ ภายในเส้นใยมีการสร้างผนังกัน (septum) แบ่งเซลล์เป็นส่วน ๆ และพัฒนาไปเป็นสปอร์ย้อมติดสีเข้ม
- D) สปอร์สายยาวบนเส้นใยอากาศอายุ 11 วัน ลักษณะโคโคไนด์ที่เจริญเต็มที่ (mature) มีเส้นใยอาหารสีเหลือง เส้นใยอากาศสีขาวและสปอร์สีน้ำตาล

จากการศึกษาลักษณะสปอร์และสายสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าสปอร์มีลักษณะเรียงต่อกันเป็นสายยาวความยาวของสายสปอร์ประมาณ 50 สปอร์ขึ้นไป สายสปอร์มีลักษณะค่อนข้างตรง ปลายสายสปอร์มีลักษณะคล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิด หรือเป็นเกลียวหนึ่งถึงสองชั้น ดังรูปที่ 4.21 สปอร์มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก (cylindrical) มีผิวเรียบ แสดงดังรูปที่ 4.22

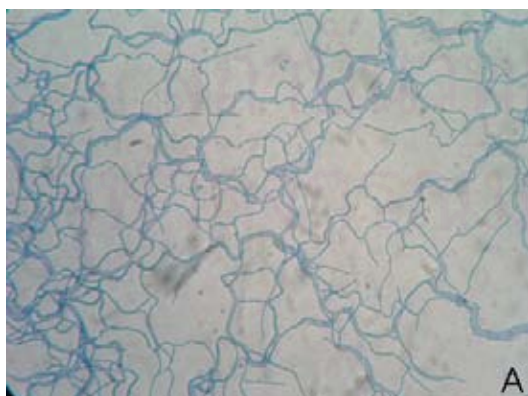


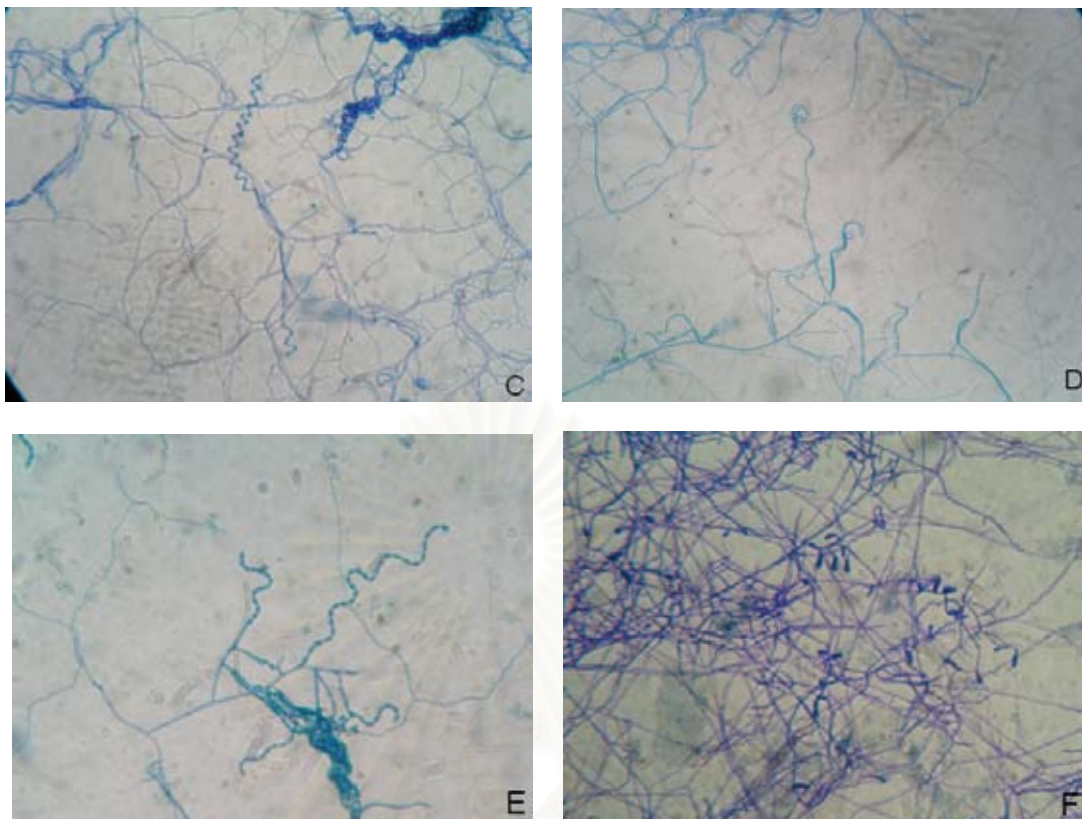
รูปที่ 4.21 แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 ปลายสายสปอร์มีลักษณะม้วนเป็นเกลียวหนึ่งถึงสองชั้นเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของรูป 7,500 X



รูปที่ 4.22 แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 สปอร์เป็นรูปทรงกระบอก มีผิวสปอร์เรียบเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของรูป 20,000 X

สายพันธุ์ Ac16-1 มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศจำนวนมาก เส้นใยอาหารมีลักษณะคล้ายเส้นด้ายโค้งไปมา เส้นใยอากาศมีการแตกแขนงจำนวนมาก สร้างสปอร์สายยาวบนเส้นใยอากาศ สร้างโครงสร้างคล้ายอับสปอร์รูปรี (oval) บนเส้นใยอาหาร สายสปอร์มีลักษณะม้วนเป็นเกลียว (spiral) สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สายสปอร์เจริญเต็มที่เมื่อมีอายุ 5 วัน แสดงดังรูปที่ 4.23



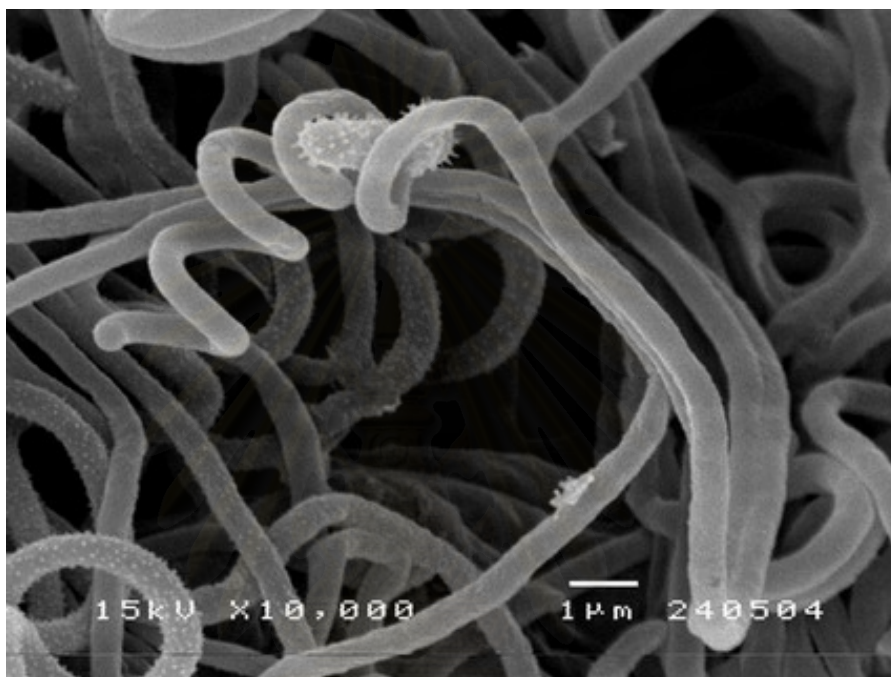


**รูปที่ 4.23** แสดงภาพการพัฒนาของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศของแอสเพอริลลัสสายพันธุ์

Ac16-1 บนอาหาร GYM เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

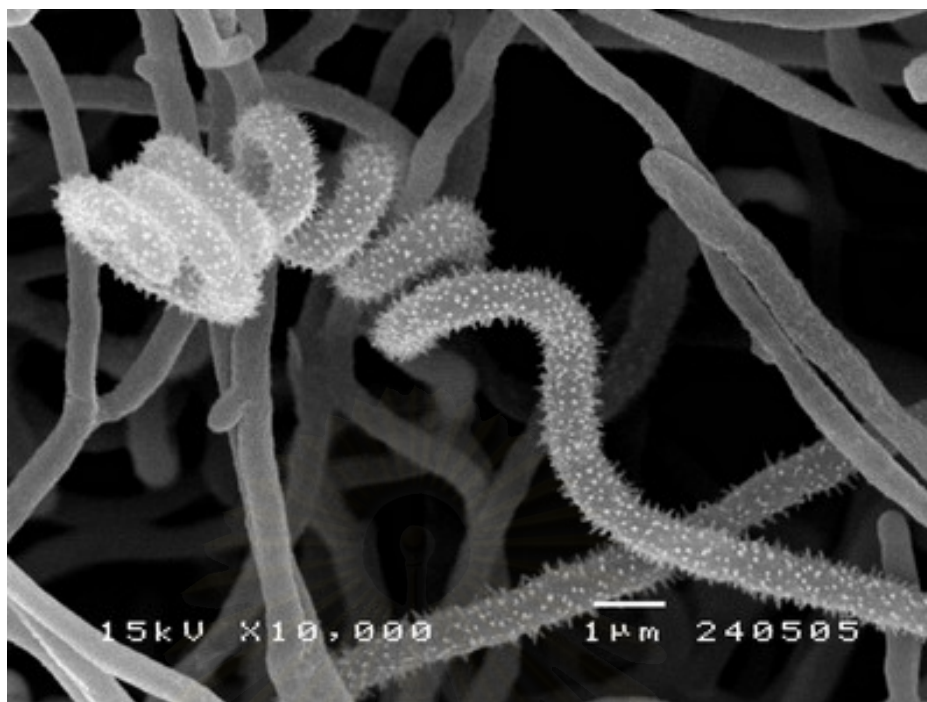
- A) เส้นใยอาหารอายุ 2 วัน มีลักษณะหนาเส้นใยยาวโค้งไปมา แตกแขนงเล็กน้อย
- B) เส้นใยอากาศอายุ 2 วัน ส่วนปลายของเส้นใยมีการพัฒนาไปเป็นสปอร์ โดยมีการสร้างผนังหนาขึ้น (ย้อมติดสีเข้ม) และม้วนเป็นเกลียว
- C) เส้นใยอากาศอายุ 3 วัน ปลายเส้นใยที่พัฒนาไปเป็นสายสปอร์มีการพันเป็นเกลียวหลายชั้น
- D) สายสปอร์อายุ 4 วัน ภายในเส้นใยมีการแบ่งเป็นส่วน ๆ โดยสร้างผนัง (septum) กันเห็นเป็นสปอร์ชัดเจน
- E) สายสปอร์เจริญเต็มที่เมื่อมีอายุ 5 วัน มีการคลายเกลียวของสายสปอร์ออกเป็นเส้นโค้งไปมา และสปอร์เริ่มหลุดออกจากสายสปอร์
- F) เส้นใยอาหารอายุ 5 วัน สร้างโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายอับสปอร์รูปร่างบริเวณปลายเส้นใยที่มีการแตกแขนง โคลินี่ที่เจริญเต็มที่ในวันที่ 5 จะสร้างเส้นใยอาหารสีเหลือง, เส้นใยอากาศสีขาวและสปอร์สีเขียว

จากการศึกษาลักษณะสปอร์และสายสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า สายสปอร์ในระยะแรก ๆ มีลักษณะม้วนเป็นเกลียว ดังรูปที่ 4.24 และ 4.25 สปอร์เรียงต่อกันเป็นสายยาวความยาวของสายสปอร์ประมาณ 30 สปอร์ขึ้นไป และมีการคลายเกลียวของสายสปอร์ในระยะหลัง ดังรูปที่ 4.26 สปอร์มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก (cylindrical) ปลายมน มีผิวเป็นหนาม แสดงดังรูปที่ 4.27

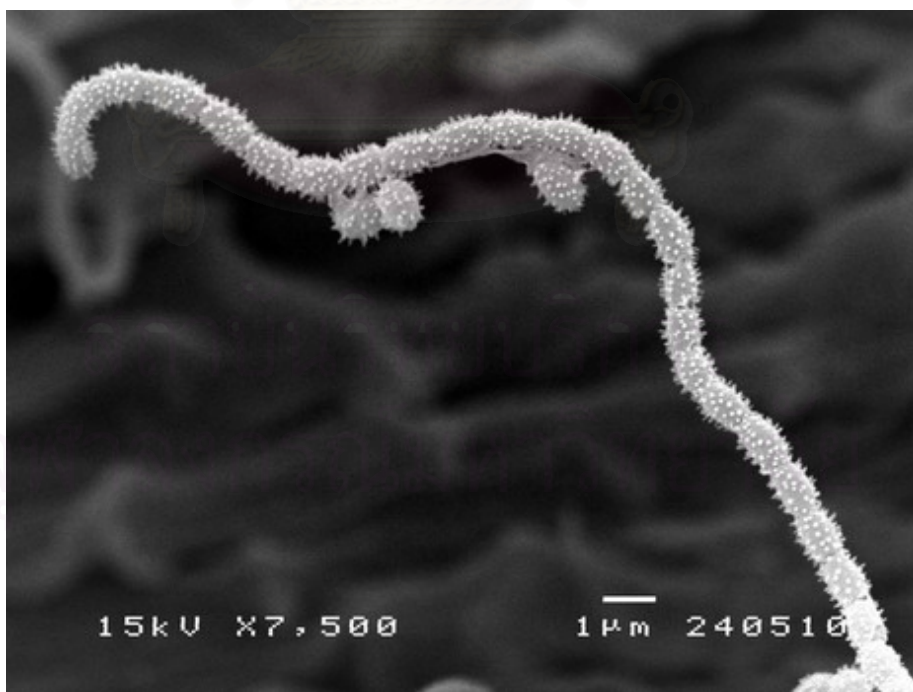


รูปที่ 4.24 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงเส้นใยอากาศอายุ 2 วัน กำลังพัฒนาไปเป็นสายสปอร์ ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 ปลายเส้นใยมีลักษณะขดม้วนเป็นเกลียวหลายชั้น กำลังขยายภาพ 10,000 X

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

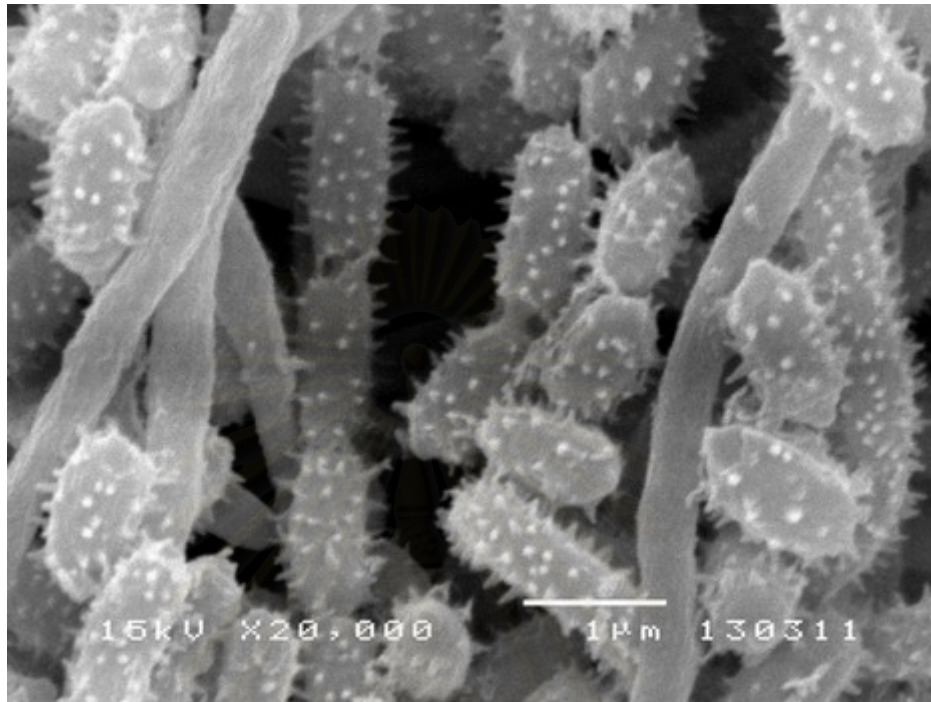


**รูปที่ 4.25** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์อายุ 3 วันของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac16-1 สายสปอร์ขดม้วนเป็นเกลียววงปิดหลายชั้นผนังสปอร์เป็นหนาม กำลังขยายภาพ 10,000 X



**รูปที่ 4.26** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์อายุ 5 วันของแอกติโนมายซีตสายพันธุ์ Ac16-1 สปอร์ต่อกันเป็นสายยาว มีการคลายเกลียว

ของสายสปอร์ทำให้สายสปอร์มีลักษณะโค้งไปมา และสปอร์พร้อมที่จะหลุดออกจากสายสปอร์ กำลังขยายภาพ 7,500 X



**รูปที่ 4.27** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะสปอร์ของแอกติโนไมซีตสายพันธุ์ Ac16-1 ผิวสปอร์เป็นหนามล้อมรอบสปอร์ สปอร์มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกปลายมน กำลังขยายภาพ 20,000 X

ภาพถ่ายโครงสร้างของแอกติโนไมซีตที่ได้คัดเลือกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าแอกติโนไมซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 7 คือ *Streptomyces* และสกุลที่เกี่ยวข้อง เพราะพบการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศจำนวนมาก ลักษณะสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว สายสปอร์ที่เป็นเส้นใยอากาศ เมื่อสายสปอร์แก่จะแตกออกจากเส้นใยหลักเป็นสายสปอร์เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่มของสายสปอร์ สายพันธุ์ Ac1-4 สายสปอร์มีลักษณะค่อนข้างตรง ส่วนปลายโค้งงอมีลักษณะคล้ายตะขอ หรือม้วนเป็นวง สายสปอร์ยาวมากโดยแตกออกจากส่วนปลายของเส้นใยหลักเป็นสปอร์สายเดี่ยว หรือเป็นกลุ่มของสายสปอร์ประมาณ 2-3 สาย ซึ่งลักษณะการสร้างสายสปอร์ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นแบบ *Retinaculiaperti* สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ ผิวสปอร์เรียบ สำหรับลักษณะการสร้างสายสปอร์มีความคล้ายคลึงกันกับแอกติโนไมซีตกลุ่มที่ 5 ในจีนัส *Actinomadura* แต่แตกต่างกันตรงที่จีนัส *Actinomadura* ไม่มีการแตกหักหรือการแบ่งเป็นส่วน ๆ ของเส้นใยอาหาร สายพันธุ์ Ac16-1

สายสปอร์มีลักษณะม้วนเป็นเกลียว เกลียวม้วนแน่นเป็นวงปิดหลายชั้น สายสปอร์ยาวแตกออก จากส่วนปลายของเส้นใยหลักเป็นสปอร์สายเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มของสายสปอร์ 2-3 สาย ซึ่ง ลักษณะการสร้างสายสปอร์ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นแบบ spiral สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ ฝิวสปอร์เป็น หนาม ซึ่งเป็นลักษณะโครงสร้างที่พบเด่นชัดใน จีโนม *Streptomyces* แอกติโนมัยซีทีสในกลุ่มที่ 7 คือ *Streptomyces* และจีโนมที่เกี่ยวข้อง ประกอบไปด้วย จีโนม *Streptomyces* และจีโนม *Streptoverticillium* ในจีโนม *Streptoverticillium* พบการสร้างเส้นใยอากาศเป็นสายตรง มีก้านชู สปอร์แตกแขนงออกเป็นวง (verticils) รอบเส้นใยหลัก ปลายก้านชูสปอร์สร้างสปอร์สายสั้น ๆ หลายสาย ฝิวสปอร์เรียบ หรือขรุขระเล็กน้อย :ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ที่สร้างสปอร์สายยาว และไม่ได้สร้างสปอร์รอบเส้นใยหลัก การศึกษาทางสรีระวิทยาและการ วิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA จะทำให้ทราบถึงจีโนม และสปีชีส์ที่แน่นอนของ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

4.12.2 ศึกษาการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 บนอาหาร เลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project (ISP) media

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยง เชื้อ ISP 6 ชนิด คือ

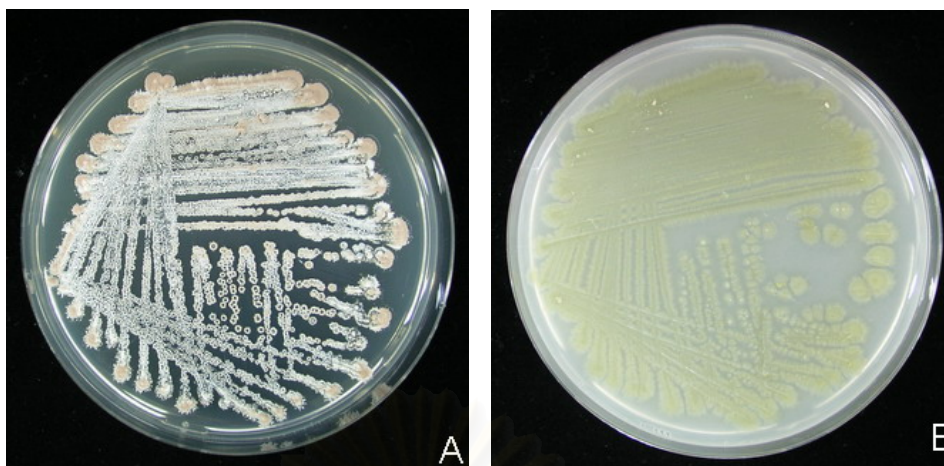
- ISP1 (TYEA) Tryptone-yeast extract agar
- ISP2 (YMEA) Yeast-malt extract agar
- ISP3 (OA) Oat meal agar
- ISP4 (ISSA) Inorganic salts starch agar
- ISP5 (GAA) Glycerol asparagines agar
- ISP6 (PYEA) Peptone-yeast extract iron agar

ศึกษาการเจริญ บนที่กักษณะของสายใยอากาศ สายใยอาหาร รงควัตถุที่ละลายน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.28 และ 4.29 แสดงลักษณะของโคโคนี สีของเส้นใยอากาศ สี ของสปอร์ และสีของเส้นใยอาหาร

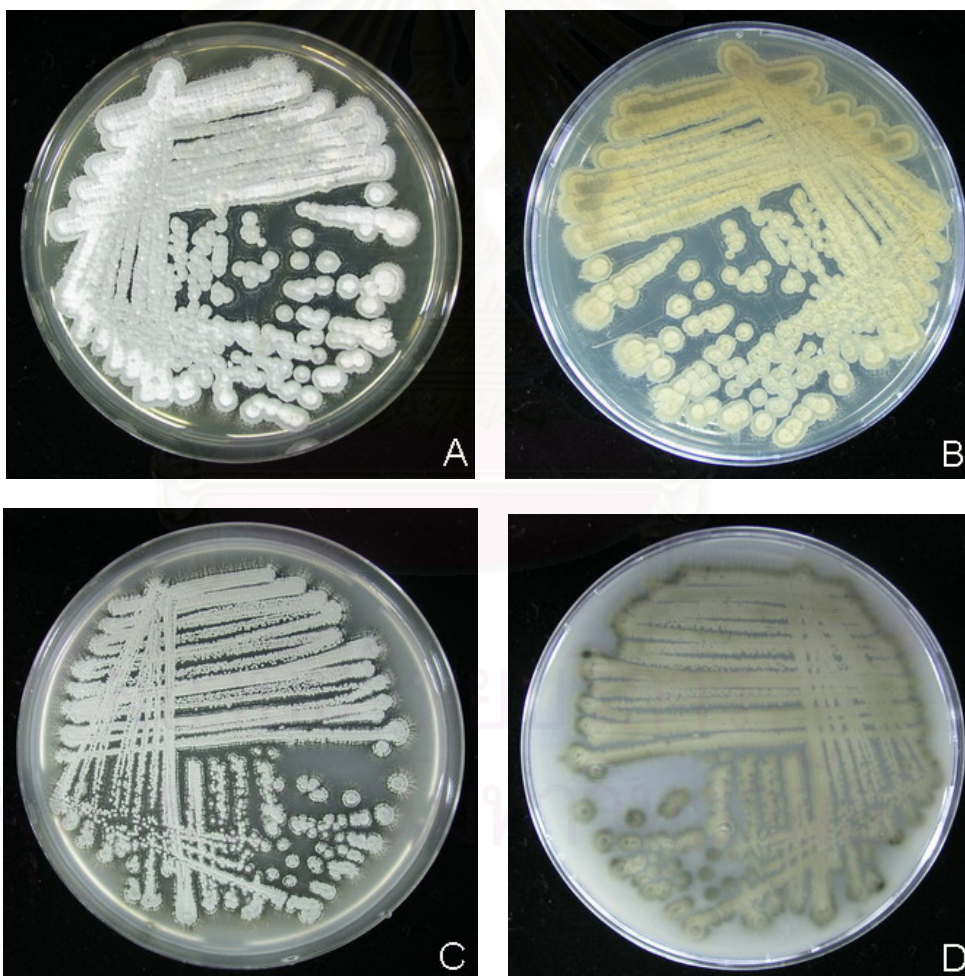
ตารางที่ 4.9 แสดงการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP

อาหาร	ลักษณะ				
	การเจริญ	การสร้างเส้นใยอาหาร	การสร้างเส้นใยอากาศ	การสร้างสปอร์	รงควัตถุที่ละลายน้ำ
<b>แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4</b>					
ISP1 (Tryptone-yeast extract agar)	ดีมาก	ดีมาก, สีเหลือง	ดีมาก, สีขาว	ดีมาก, สีน้ำตาล	ไม่สร้าง
ISP2 (Yeast-malt extract agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	น้อย, สีขาว	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
ISP3 (Oat meal agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
ISP4 (Inorganic salts starch agar)	ดี	ดี, สีเหลือง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
ISP5 (Glycerol asparagines agar)	น้อย	น้อย, สีเหลือง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar)	ดี	ดี, สีเหลือง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
<b>แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1</b>					
ISP1 (Tryptone-yeast extract agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	ปานกลาง, สีขาว	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
ISP2 (Yeast-malt extract agar)	ดีมาก	ดีมาก, สีเหลือง	ดีมาก, สีขาว	ดีมาก, สีเขียว	ไม่สร้าง
ISP3 (Oat meal agar)	ดีมาก	ดีมาก, สีเหลือง	ดีมาก, สีขาว	ดีมาก, สีเขียว	สีเทา
ISP4 (Inorganic salts starch agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	น้อย, สีขาว	น้อย, สีขาว	ไม่สร้าง
ISP5 (Glycerol asparagines agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	น้อย, สีขาว	น้อย, สีขาว	ไม่สร้าง
ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar)	ปานกลาง	ดี, สีเทาเหลือง	น้อย, สีขาว	น้อย, สีขาว	สีน้ำตาลดำ





รูปที่ 4.28 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 : A สีเส้นใยอากาศและสปอร์บนอาหาร ISP1, B สีเส้นใยอาหารบนอาหาร ISP4



รูปที่ 4.29 ลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 A) สีของเส้นใยอากาศและสปอร์บนอาหาร ISP2, B) สีของเส้นใยอาหารบนอาหาร ISP2, C) สีของเส้นใยอากาศและสปอร์บนอาหาร ISP3 และ D) สีของเส้นใยอาหารบนอาหาร ISP3

#### 4.12.3 การศึกษาการสร้างรงควัตถุเมลานิน

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารร่วนแข็ง Peptone Yeast Extract Iron Agar และอาหารร่วนแข็ง Tyrosine Agar สามารถตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน จากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร Peptone Yeast Extract Iron Agar สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ในสายพันธุ์ Ac16-1 ส่วนในสายพันธุ์ Ac1-4 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเจริญบนอาหาร Tyrosine agar ในทั้งสองสายพันธุ์

#### 4.12.4 การรีดิวซ์ไนเตรท

จากการแทง (stab) แอกติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate Agar สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อหยดด้วยสารละลาย A และ B แสดงว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้

#### 4.12.5 การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

จากการขีด (streak) แอกติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 บนผิวหน้าอาหารร่วนแข็ง Peptone Yeast Extract Iron Agar พบว่าสายพันธุ์ Ac16-1 สามารถสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้โดยอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินดำ ส่วนในสายพันธุ์ Ac1-4 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ คุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงในตารางที่ 4.10

**ตารางที่ 4.10** แสดงความสามารถในการสร้างรงควัตถุเมลานิน, การรีดิวซ์ไนเตรท และการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของแอกติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

การทดสอบ	ผลการทดสอบของแอกติโนมัยซีที	
	สายพันธุ์ Ac1-4	สายพันธุ์ Ac16-1
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	-	+
การรีดิวซ์ไนเตรท	+	+
การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	+

หมายเหตุ + : ผลการทดสอบเป็นบวก - : ผลการทดสอบเป็นลบ

#### 4.12.6 การศึกษาสมบัติการย่อยสลาย

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar ที่เติมสารที่ต้องการตรวจสอบการย่อยสลายสารแต่ละชนิดลงไป ผลแสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบ

สารทดสอบ	ผลการย่อยสลายสารโดยแอกติโนมัยซีต	
	สายพันธุ์ Ac1-4	สายพันธุ์ Ac16-1
Adenine	+	-
Tyrosine	-	+
Xylan	-	+
Xanthine	-	+
Casein	+	+
Gelatin	+	+
Starch	+	+

หมายเหตุ + : ย่อย - : ไม่ย่อย

#### 4.12.7 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar และตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4, 10, 37 45 และ 55 °C ผลการเจริญแสดงดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	สายพันธุ์ Ac1-4	สายพันธุ์ Ac16-1
4	-	-
10	-	-
37	+	+
45	+	+
55	+	+

หมายเหตุ + : เจริญ - : ไม่เจริญ

#### 4.12.8 การตรวจสอบการเจริญที่พีเอชต่าง ๆ

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 8.5, และ 9 ผลการเจริญแสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ที่พีเอชต่าง ๆ

สายพันธุ์ \ พีเอช	4	4.5	5	5.5	6	8	8.5	9
Ac1-4	-	-	-	-	-	+	+	+
Ac16-1	-	-	-	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + : เจริญ - : ไม่เจริญ

#### 4.12.9 การตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่เติมแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้ไนโตรเจน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่เติมแอสปาราจिन ผลแสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

แหล่งไนโตรเจน	การเจริญของแอกติโนมัยซีต	
	สายพันธุ์ Ac1-4	สายพันธุ์ Ac16-1
L-arginine	+	+
L-histidine	+	-
L-methionine	-	+
Potassium nitrate	+	+
L-serine	+	+
L-theonine	+	+
L-valine	-	+
B-alanine	-	+
L-glutamine	+	+

หมายเหตุ + : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ

(ชุดควบคุมบวกเติม L- asparagines เป็นแหล่งไนโตรเจน)

(ชุดควบคุมลบไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)

#### 4.12.10 การตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน

จากการนำแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่เติมแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้คาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลแสดงดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1

แหล่งคาร์บอน	การเจริญของแอกติโนมัยซีต	
	สายพันธุ์ Ac1-4	สายพันธุ์ Ac16-1
<i>L</i> -arabinose	+	+
Dextrane	+	+
<i>D</i> -fructose	+	+
<i>D</i> -galactose	+	+
<i>meso</i> -inositol	-	+
<i>D</i> -lactose	-	+
<i>D</i> -manital	-	+
<i>D</i> -mannose	+	+
<i>L</i> -rhamnose	-	+
Sucrose	-	+
Threhalose	+	+
Xylose	+	+
Sodium acetate	+	+
Sodium citrate	-	+

หมายเหตุ + : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ

(ชุดควบคุมบวกเติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน)

(ชุดควบคุมลบไม่เติมแหล่งคาร์บอน)

#### 4.13 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

จากการจำแนกสกุลของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ตามหลักการจำแนกอ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 9..(Williams และคณะ, 1994) พบว่าแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* จากผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ที่แน่ชัดได้ เพื่อจำแนกสปีชีส์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 อย่างแน่ชัดจึงได้ทำการตรวจหาลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 แต่เนื่องจากจีนัส *Streptomyces* สายพันธุ์ต่าง ๆ มีบริเวณลำดับเบสอนุรักษ์ (conserved sequence) อยู่มาก ดังนั้นจึงต้องออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมช่วงที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด (hypervariable region) ของลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ดังนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์อ้างอิงข้อมูลตาม Hintala และคณะ (2001) และ Lanoot และคณะ (2005) จากนั้นจึงส่ง PCR product ของสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ณ สำนักงานวิจัยคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสขึ้นส่วนดีเอ็นเอของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 แสดงดังรูปที่ 4.30 และ รูปที่ 4.31 ตามลำดับ

```

5'TGCAAGTCGAACGATGAACCCACTTCGGTGGGGGATTAGTGGCGAACG
GGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGA
AACGGGGTCTAATACCGGATACGACCACTTCAGGCATCTGATGGTGGTGG
AAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGA
GGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGAC
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
GAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCG
AAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GAGCTCGTAGGCGGCCTGTCACGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACC
CCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGG
AATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGG
AACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTCGTCCGTGCCGAGCTAACGCATT
AAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACACCCAGAGATG
GGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTG
TGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCCGCCGGG
GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATG
TCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGAGCTGCGATACC
GCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCT

```

GCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATT  
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCAC  
GAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGA  
GCTT3'

รูปที่ 4.30 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4  
จำนวน 1,396 เบส

5'CGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG  
TGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAAT  
ACCGGATACTGATCTGCTTGGGCATCCAAGTGGTTCGAAAGCTCCGGCGG  
TGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGAGGTAATGGCTCAC  
CAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGG  
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  
CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC  
CTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTAC  
CTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT  
AGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCG  
CTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTC  
GATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAG  
CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATC  
TCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG  
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTAGGTGTGGG  
CAACATTCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTG  
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC  
ACAAGCGGCCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTAC  
CAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGG  
TCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCC  
CTTGTGGTGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA  
GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACAC  
GTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGA  
ATCTCAAAAACCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCA  
TGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATAC  
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACA  
CCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGG  
ACTGGCGATTGGGACGAA3'

รูปที่ 4.31 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1  
จำนวน 1,412 เบส

นำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4  
และ Ac16-1 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่บันทึกและรวบรวม  
ไว้ใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์ [1http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) พบว่า  
ลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ  
*Streptomyces fradiae* โดยมีความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100% เปรียบเทียบความเหมือน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของสายพันธุ์ Ac1-4 กับ *S. fradiae* แสดงดังตารางที่ 4.16 สายพันธุ์ Ac16-1 มีลำดับเบส 16S rRNA คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces* 4 สายพันธุ์ โดยมีความเหมือนเท่ากับ 99% ได้แก่ *S. coeruleorubidus*, *S. longispororuber*, *S. coerulescens*, และ *S. viridochromogenes* จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของ *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์กับสายพันธุ์ Ac16-1 พบว่าคุณสมบัติของ *S. coeruleorubidus* ตรงกับสายพันธุ์ Ac16-1 มากที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.17 จากข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์พบว่ายีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ในแอกติโนมัยซีตจันัส *Streptomyces* มีลำดับเบสที่เป็นบริเวณอนุรักษ์อยู่มาก จึงทำให้พบหลายสายพันธุ์ที่ระดับความเหมือนเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมหรือจำเพาะต่อบริเวณที่มีลำดับเบสแตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางสรีรวิทยายังคงมีความสำคัญและจำเป็นที่จะนำมาใช้ร่วมกันกับข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์ในการจำแนกระดับสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีต



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.16 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีระวิทยาของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces fradiae*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต	
	Ac1-4	<i>Streptomyces fradiae</i>
สีของสายใยอาหาร	เหลือง	เหลือง
สีของสายใยอากาศ	ขาว	ขาว-เทา
สีสปอร์	น้ำตาล	น้ำตาล-ชมพู
รูปร่างสปอร์	ทรงกระบอก (cylindrical)	กลม - ทรงกระบอก
ลักษณะผิวสปอร์	เรียบ	เรียบ
ลักษณะสายสปอร์	สายตรงม้วนตรงปลาย	สายตรงม้วนตรงปลาย
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	-	-
การสร้างรงควัตถุ	-	-
การรีดิวซ์ไนเตรท	+	+
การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	-
<u>การย่อยสลาย</u>		
เจลาติน	+	+
แซนทีน	-	-
อะดีนีน	+	+
แป้ง	+	+
<u>การใช้แหล่งคาร์บอน</u>		
L-อะราบิโนส	+	-
L-แรมโนส	-	-
D-ฟรุกโตส	+	+
D-กาแลคโตส	-	+
ซูโครส	-	+
มีไท – อินโนซิทอล	-	+
ไซโลส	+	+
เดกซ์แทรน	+	+
D-แมนนิทอล	-	-

หมายเหตุ + : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

ที่มา : (Kim และ Goodfellow, 2002)

ตารางที่ 4.17 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีระวิทยาของแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces coeruleorubidus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา	สายพันธุ์แอคติโนมัยซีต	
	Ac16-1	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>
สีของสายใยอาหาร	เหลือง-เทา	เหลือง
สีของสายใยอากาศ	ขาว	ขาว
สีสปอร์	เขียว	เขียว
รูปร่างสปอร์	ทรงกระบอกปลายมน (cylindrical)	รูปไข่ (ovoid)
ลักษณะผิวสปอร์	หนาม	หนาม
ลักษณะสายสปอร์	เกลียวยาว	เกลียวยาว
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	+	+
การสร้างรงควัตถุ	+	+
การรีดิวซ์ไนเตรท	+	+
การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	+	+
<u>การย่อยสลาย</u>		
เจลาติน	+	+
แซนทีน	+	-
อะดีนีน	-	+
แป้ง	+	+
<u>การใช้แหล่งคาร์บอน</u>		
L-อะราบิโนส	+	+
L-แรมโนส	+	+
D-ฟรุกโตส	+	+
D-กาแลคโตส	+	+
ซูโครส	+	+
มีโซ – อินโนซิทอล	+	+
ไซโลส	+	+
เดกซ์แทรน	+	+
D-แมนนิทอล	+	+

หมายเหตุ + : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

ที่มา : (Kim และ Goodfellow, 2002)

ตารางที่ 4.18 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีระวิทยาของ *S. longispororuber* *S. coerulescens* และ *S. viridochromogenes*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ สรีระวิทยา	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต		
	<i>S. longispororuber</i>	<i>S. coerulescens</i>	<i>S. viridochromogenes</i>
สีของสลายใยอาหาร	เหลือง	เหลือง	ขาว
สีของสลายใยอากาศ	ขาว	ขาว	ขาว
สีสปอร์	ฟ้า-เขียว	เขียว	ฟ้า-เขียว
รูปร่างสปอร์	รูปไข่ (ovoid)	รูปไข่ (ovoid)	รูปไข่ (ovoid)
ลักษณะผิวสปอร์	หนาม	หนาม	หนาม
ลักษณะสายสปอร์	เกลียวยาว	เกลียวสั้น	เกลียวสั้น
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	+	-	-
การสร้างรงควัตถุ	+	-	-
การรีดิวซ์ไนเตรท	+	+	+
การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	+	+
<u>การย่อยสลาย</u>			
เจลาติน	+	-	+
แซนทีน	+	-	-
อะดีนีน	-	+	-
แป้ง	+	+	+
<u>การใช้แหล่งคาร์บอน</u>			
L-อะราบิโนส	-	+	-
L-แรมโนส	-	-	+
D-ฟรุกโตส	+	-	+
D-กาแลคโตส	+	-	-
ซูโครส	+	+	+
มีไซโท – อินโนซิทอล	-	+	-
ไซโลส	-	+	-
เดกซ์แทรน	-	-	-
D-แมนนิทอล	+	+	+

หมายเหตุ + : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

ที่มา : (Kim และ Goodfellow, 2002)

## บทที่ 5

### วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการแยกแอกติโนมัยซีทีสจากตัวอย่างมูลสัตว์กินพืชจำนวน 39 ตัวอย่าง จากสัตว์กินพืช 16 ชนิด จาก 9 จังหวัด คือ นครปฐม, กรุงเทพฯ, น่าน, ชลบุรี, กระบี่, อุบลราชธานี, สุราษฎร์ธานี, ตาก และ นครราชสีมา สามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้ 127 สายพันธุ์ เมื่อนำแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SCYB สกัดเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ นำสารสกัดมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์โดยทดสอบด้วยวิธี Agar well และทดสอบการสร้างสารยับยั้งเซลล์โคโนมะเร็งมนุษย์ด้วยวิธี MTT method พบว่ามีแอกติโนมัยซีทีสจำนวน 66.14% สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ และจำนวน 33.86% ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ สามารถจัดกลุ่มแอกติโนมัยซีทีสที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ยับยั้งแบคทีเรียและรา 28.35% ยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดียว 32.28% ยับยั้งราอย่างเดียว 5.51% ทำให้ทราบว่าประชากรส่วนใหญ่ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย มีแอกติโนมัยซีทีสจำนวน 28.35% ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยอยู่ในเกณฑ์มีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% อย่างน้อยหนึ่งเซลล์ไลน์ และจำนวน 71.65% มีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 50% มีจำนวนแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งที่อยู่ในเกณฑ์ทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50% ในแต่ละชนิดของเซลล์ดังนี้ เซลล์มะเร็งผิวหนัง (A375) 7.09%, เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KatIII) 18.11%, เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) 18.90%, เซลล์มะเร็งตับ(HapG2) 8.66%, เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) 14.96% และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) 6.93% ทำให้ทราบว่าประชากรส่วนใหญ่ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมีประชากรส่วนน้อยที่สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เมื่อพิจารณาถึงสายพันธุ์ที่มีความสามารถทั้งการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์และสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง มีจำนวน 33 สายพันธุ์ คิดเป็น 25.98%

สารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Ac1-4 ออกฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดและจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งทำให้เซลล์ BT474 มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต 2.08% จากการทดสอบการชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส พบว่าสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac1-4 ไม่สามารถชักนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสได้แสดงว่าสารสกัดมีผลเพียงยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์หรือทำให้เซลล์ตายในรูปแบบอื่น นอกจากนี้ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างสูง

ต่อ ยีสต์ (*C. albicans*, *S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*) และออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อนต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus* และ *S. aureus* สารสกัดจากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 ออกฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat) และยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งทำให้เซลล์ Jurkat และ BT474 มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต 27.31 และ 16.38% ตามลำดับ พบว่าสารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1 ชักนำให้เซลล์ Jurkat และ BT474 ตายแบบอะพอพโทซิสอย่างสูง นอกจากนี้สารสกัดจากสายพันธุ์ Ac16-1 ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างสูงต่อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *B. cereus* และ *S. aureus* และออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อนกับแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa* และ *E. coli*), ยีสต์ (*S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*)

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ SCYB เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อทุกวัน ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยน้ำออกและนำไปทดสอบการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ และศึกษาการเจริญของเชื้อโดยการหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของสายพันธุ์ Ac1-4 คือ 8 วัน แสดงดังรูปที่ 4.14 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 สามารถสร้างสารยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*), แบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa* และ *E. coli*), ยีสต์ (*C. albicans*, *S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*) ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของสายพันธุ์ Ac16-1 คือ 6 วัน แสดงดังรูปที่ 4.15 โดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ 6 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*), แบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa* และ *E. coli*), ยีสต์ (*S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*)

หลังจากพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตโดยสายพันธุ์ Ac1-4 ไม่สามารถสกัดออกมาได้ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ จึงทำการแปรผันชนิดของตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล เอทิลแอลกอฮอล์ และ เฮกเซน เพื่อใช้ในการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด พบว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ Ac1-4 ผลการทดสอบสารสกัดจากเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 7 มากกว่าการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และ เฮกเซน อย่างมีนัยสำคัญ เอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ Ac16-1 โดยสารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด มากกว่าการสกัดด้วยเมทานอล และเฮกเซน อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อศึกษาถึงองค์ประกอบของสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 ด้วย TLC โครมาโทกราฟี และทดสอบหาตำแหน่งที่เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์บนแผ่น TLC ด้วยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่าสารสกัดจากเมททานอลของสายพันธุ์ Ac1-4 ปรากฏแถบของสารบนแผ่น TLC ที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.25, 0.33, 0.72 และ 0.88 และที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.25 มีฤทธิ์ยับยั้ง ยีสต์ (*C. albican* และ *S. cerevisiae*) และ รา (*A. niger*) สารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์ของสายพันธุ์ Ac16-1 ปรากฏแถบของสารบนแผ่น TLC ที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.25, 0.43, 0.58 และ 0.87 ที่ตำแหน่งเริ่มต้น Rf เท่ากับ 0.00 ปรากฏการยับยั้งจุลินทรีย์ 6 ชนิด คือ *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* และ *A. niger* และแถบของสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.87 ออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. Cerevisiae*

ในการจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 โดยศึกษาโครงสร้างจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่ใน จีนัส *Streptomyces* ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางสรีระวิทยา และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ และพีเอชต่าง ๆ สรุปดังตารางที่ 5.1

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยายังไม่สามารถจำแนกถึงสปีชีส์ได้ ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดยงานวิจัยนี้ออกแบบไพรเมอร์โดยอ้างอิงข้อมูลจาก Rintala และคณะ (2001) และ Lanoot และคณะ (2005) จากนั้นส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ณ สำนักงานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี และเมื่อนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตทั้งสองสายพันธุ์มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ที่บันทึกไว้ใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> พบว่าลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces fradiae* โดยมีความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยากับ *Streptomyces fradiae* (Kim และ Goodfellow, 2002) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกัน สายพันธุ์ Ac16-1 มีลำดับเบส 16S rRNA คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces* 4 สายพันธุ์ โดยมีความเหมือนเท่ากับ 99% ได้แก่ *S. coeruleorubidus*, *S. longispororuber*, *S. coerulescens*, และ *S. viridochromogenes* จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของ *Streptomyces* ทั้งสี่สายพันธุ์กับสายพันธุ์ Ac16-1 Soliveri และคณะ (1987) และ Kim และ Goodfellow (2002) พบว่าคุณสมบัติของสายพันธุ์ Ac16-1 ใกล้เคียงกับ *S. coeruleorubidus* มากที่สุด

ตารางที่ 5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา ความสามารถของการเจริญที่อุณหภูมิและ  
พีเอชต่าง ๆ ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ 16-1

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีต	
	Ac1-4	Ac16-1
สีของสายใยอาหาร	เหลือง	เหลือง-เทา
สีของสายใยอากาศ	ขาว	ขาว
สีสปอร์	น้ำตาล	เขียว
รูปร่างสปอร์	ทรงกระบอก	ทรงกระบอกปลายมน
ลักษณะผิวสปอร์	เรียบ	หนาม
ลักษณะสายสปอร์	สายตรงม้วนตรงปลาย	เกลียว
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	-	+
การสร้างรงควัตถุ	-	+ (สีน้ำตาล)
การรีดิวซ์ไนเตรท	+	+
การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	+
<u>การย่อยสลาย</u>		
เจลาติน	+	+
แซนทีน	-	+
ไทโรซีน	-	+
ไซแลน	-	+
อะดีนีน	+	-
<u>การใช้แหล่งคาร์บอน</u>		
L-อะราบิโนส	+	+
ไซโลส	+	+
D-กาแลคโตส	-	+
D-แมนนิทอล	-	+
การเจริญที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
4	-	-
10	-	-
37	+	+
45	+	+
55	+	+
การเจริญที่พีเอชเท่ากับ 4.5	-	-

+ : ผลทดสอบบวก      - : ผลทดสอบลบ

จากการศึกษาคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Streptomyces fradiae* พบว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ดังต่อไปนี้ Fosfomycin มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Rajendra และคณะ, 2003), Urdamycins เป็นสารปฏิชีวนะกลุ่ม angucycline มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและเซลล์มะเร็งชนิด leukemia (Faust และคณะ, 2000), Neomycin เป็นสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ *E. coli*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. *Neisseria* sp. และ *P. aeruginosa* และยังรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น ๆ (Huang และคณะ, 2005), Waksman และ Lechevalier (1949) ค้นพบ Neomycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และสามารถยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวกได้บางชนิด จากผลการค้นพบได้ใช้ Neomycin ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ แต่มีผลในการยับยั้งยีสต์ที่ไม่ก่อโรคที่อยู่ในลำไส้ด้วย Erythromycin, Tylosin และ Narbomycin เป็นสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยเข้าจับกับไรโบโซม หรือยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ โดยที่ Tylosin มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และ *Mycoplasma* sp. (Butler และคณะ, 2002) จากรายงานที่ค้นพบ *S. fradiae* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด leukemia ได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ตรงกันกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสายพันธุ์ Ac1-4 ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ได้ นอกจากนี้สายพันธุ์ Ac1-4 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งราได้แต่ไม่พบรายงานการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งราใน *S. fradiae* และสายพันธุ์ Ac1-4 สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้สูง แต่มีรายงานการสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวใน *S. fradiae* การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยซีสขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยงเชื้อ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *Streptomyces coeruleorubidus* พบว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดังต่อไปนี้ Daunorubicin เป็นสารปฏิชีวนะกลุ่ม anthracycline ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยในปัจจุบันได้ใช้ยาปฏิชีวนะชนิดนี้ในการรักษากลุ่มโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว คือ acute myelocytic leukemia, acute lymphocytic leukemia และ chronic myelogenous leukemia และยังมี Daunomycin และ Duxorubicin ซึ่งสารปฏิชีวนะทั้งสามชนิดมีสูตรโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกันและออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเหมือนกัน (Mortensen, 1992) นอกจากนี้มีรายงานว่า *S. coeruleorubidus* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และ *Mycobacterium tuberculosis* ได้ แต่ยังไม่สามารถหาสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสารชนิดนี้ได้สำเร็จ (Sneader, 2005) จากการเปรียบเทียบกับแอกติโนมัยซีสสายพันธุ์ Ac16-1 พบว่า



สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และยับยั้งแบคทีเรียได้เหมือนกัน แต่สายพันธุ์ Ac16-1 สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์และราได้ ซึ่งการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ แอคติโนมัยซีตขึ้นอยู่กับสารอาหารสภาวะการเลี้ยงเชื้อ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 และ Ac16-1 มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้สูง จึงมีความน่าสนใจในการทำให้บริสุทธิ์ถึงระดับสูตรโครงสร้าง
2. สารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่สกัดได้จากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac16-1 มีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และเซลล์มะเร็งเต้านมเข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิสได้ จึงน่าจะทำให้สารส่วนนี้บริสุทธิ์และทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ต่อการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส
3. สารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่สกัดได้จากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้อย่างสูง แต่ไม่ชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส จึงน่าจะศึกษาถึงกลไกการยับยั้งของสารสกัดชนิดนี้ เพื่อจะได้เข้าใจถึงกลไกและสามารถหาแนวทางในการนำสารชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์หรือพัฒนาสารชนิดนี้ต่อไป
4. สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 ในส่วนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ และน่าจะเป็นส่วนที่มีความคงตัวและทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่าส่วนอื่น เนื่องจากสามารถแยกเป็นแถบของสารออกมาชัดเจนและทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งได้บนแผ่น TLC
5. สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Ac1-4 ในส่วนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบไม่เกิดฤทธิ์การยับยั้งบนแผ่น TLC อาจเป็นเพราะสารไม่มีความคงตัว หรืออยู่ในชั้นของตะกอน จึงควรตรวจสอบให้แน่ชัดว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวอยู่ในส่วนใด
6. จากแอกติโนมัยซีตที่สามารถแยกได้ทั้ง 127 สายพันธุ์ น่าจะเลือกนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุพันธุศาสตร์ให้มากกว่า 2 สายพันธุ์ดังที่มีรายงานในงานวิจัยชิ้นนี้ เนื่องจากอาจทำให้พบแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่ หรือเป็นสายพันธุ์ที่พบได้ยาก
7. จากแอกติโนมัยซีตที่สามารถแยกได้ทั้ง 127 สายพันธุ์ น่าจะนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทั้งหมด แล้วทำการจัดกลุ่มเพื่อศึกษาว่า ในมุลส์ตว์แต่ละชนิดมีแอกติโนมัยซีตสปีชีส์ใดมากหรือน้อยและในมุลส์ตว์ส่วนใหญ่มียีสต์สปีชีส์ใดเพื่อที่จะได้ทราบว่ามี

แยกติโนมายซีทีสที่แยกได้จากมูลสัตว์ที่กินพืชในประเทศไทยส่วนใหญ่แล้วจัดอยู่ในจีนัสใด  
หรือสปีชีส์ใด



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์. (2547) เซลล์เกาะผิว เซลล์แขวนลอย และการถ่ายเลี้ยงเซลล์. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม หน้า 47-62
- ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. (2546) การแยกแอกติโนมัยซีตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินร่วนปนลงในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 72-74

### ภาษาอังกฤษ

- Asano, K. and Kawamoto, I. (1986) *Catellaspera*, a new genus of the Actinomycetales. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:512-517
- Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Lamari, L., Mathieu, F., Lebrihi, A., and Sabaou, N. (2005) Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. Rese. Microbiol. 161:288-298
- Butler, A. R., Bate, N., Kiehl, D. E., Kirst, H. A. and Cundliffe, E. (2002) Genetic engineering of aminodeoxyhexose biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. J. nature biotechnology. 20:713 -716
- Cohn, J.E. (1943) The pigment production of *Actinomyces coelicolor* and *A. violaceusruber*. J. Bacteriol. 46:133 -150
- Commins, C.S. (1958) Studies on the cell wall composition and taxonomy of *Actinomycetales* and related groups. J. Gen. Microbiol. 18:173-189
- Cross, T. (1989) Growth and examination of actinomycetes some guidelines, In:Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 4. The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Cross, T. and Goodfellow, M. (1973) Actinomycetales:Characteris and Practical Importance. London:Academic Press.
- Demain, A. J. (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:455-463

- El-Tarabily, A. K. and Sivasithamparam, K. (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biology and Biochemistry. 38:1505 -1520
- Faust, B., Hoffmeister, D., Weitnauer, G., Westrich, L., Haag, S., Schneider, P., Decker H., Kunzel, E., Rohr, J. and Bechthold, A. (2000) Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tu2717. Microbiol. 146:147-154
- Fguira, L. F., Fotso, S. and Ameer-Mehdi, R. B. (2004) Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Rese. Microbiol. 156:341-347
- Georgopapadakou, N. H. (1995) Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer chemotherapy. Marcel Dekker, Inc., USA.
- Gesheva, V. (2001) Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. Eur. J. Soil Biol. 38:85-88
- Gesheva, V., Ivanova, V. and Gesheva, R. (2004) Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. Micro. Rese. 160:243-248
- 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
- Hayakawa, M., Momose, Y. and Nonomura, H. (1996) A method for the selective isolation of *Microtetraspora giauca* and related four-spored actinomycetes from soil. 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. Ferment. Bioeng. 72:327-333
- 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
- Huang, F., Haydock, S. F., Mironenko, T., Spitteller, D., Li, Y. and Spencer, J. B. (2005) The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233:characterization of an aminotransferase involved in the formation of 2-deoxystreptamine. Org. Biomol. Chem. 3:1410-1418
- 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
- Kalakoutskii, L. V. and Agre, N. S. (1976) Comparative aspects of development and differentiation on actinomycetes. Bacteriol. Rev. 40:469-524
- Kawamoto, I. (1989) Genus Micromonospora, In:Williams, S. T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 4. The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. And Hopwood, D. P. (2000) Practical Streptomyces Genetics. John Innes Foundation, England.
- Kim, S. B. and Goodfellow, M. (2002) *Streptomyces avermitilis* sp. nov., nom. rev., a taxonomic home for the avermectin-producing streptomycetes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:2011-2014
- Kron-Wendisch, F., Kempf, A., Grund, E., Kroppenstedt, R. M. and Kutzner, H. J. (1989) Transfer of *Faaenia rectevirgula* Kurup and Agre 1983 to the genus *Sacharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975, elevation of *Sacharopolyspora hirsute* supsp. *tebri* Labeda 1987 to species level, and emended description of the genus *Sacharopolyspora*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:67-77
- Krsek, M., Morris, N., Egan, S. and Wellington, E. M.H. (2000) *Actinomycetes*. Encyclopedia of Microbiology volume 1. Academic Press, USA.

- Kuo, M. J. and Hartman, P. A. (1966) Isolation of Amylolytic Strains of *Thermoactinomyces vulgaris* and Production of Thermophilic Actinomycete Amylases. J. Bacteriol. 92:723-726
- Kutzner, H. J. (1981) The family Streptomycetaceae. In : Starr, MP., Stolp, H., Truper, HG., Balows, A. and Schlegel, H. The Prokaryotes : a hand book on habitants, Isolation and Indentification of Bacteria. Springer-Verlag, Berlin.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, C. M., Dawyndt, P., Liu, Z., Huang, Y. and Swings, J. (2005) Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. Rese in Microbiol. 156: 755-762
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F. (2000) Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie van Leeuwenhook. 78:399-405
- Lechevalier, H.A., and Lechevalier, M. P. (1967) Biology of the actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 21:71-100
- Lee, S. D. (2006) Amycolatopsis jejuensis sp. nov. and Amycolatopsis halotolerans sp. nov., novel actinomycetes isolated from a natural cave. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:549-553
- Locci, R. and Schofield, G.M. (1989) Genus *Streptoverticillium* In:Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 4. The Willams and Wilkins, Baltimore.
- Mara, D. D. and Oragui, J. I. (1981) Occurrence of *Rhodococcus coprophilus* and Associated Actinomycetes in Feces, Sewage, and Freshwater. Appl. and Envi. Micro. 42:1037-1042
- Mellouli, L., Ameer-Mehdi, R. B., Sioud, S., Salem, M. and Bejar, S. (2003) Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. Rese. Microbiol. 154:345-352
- Miyadoh, Shinji., Masa, H., Kunimoto, H., Takuji, K., Akio, S., Gernot, V. and Akira, Y. (1997) Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes, Japan.
- Mortensen, M. E. (1992) Inadvertent intrathecal injection of daunorubicin with fatal outcome. Med. Pediatr. Oncol. 20:249-253

- Murray, P.R. and Baron, M. A. (1999) Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, D. C.
- Nedwell, D. B., Russell, N. J. and Cresswell-Maynard, T. (1993) Long-term survival of microorganisms in frozen material from early Antarctic base camps at McMurdo Sound. Antarctic Science. 6:67-68
- Ohta, Y. and Ikeda, M. (1978) Deodorization of Pig Feces by Actinomycetes. Appl. Enviro. Micro. 36:487-491
- Ouhdouch, Y., Jana, M., Imziln, B., Boussaid, A. and Finance, C. (1996) Antifungal Activities of Actinomycetes Isolated From Moroccan Habitats. Actinomycetes. 7:12-22
- Ouhdouch, Y., Barakate, M. and Finance, C. (2001) Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activity. Eur. J. Soil Biol. 37:69-74
- Palaga, T., Kataoka, T., Woo, JT. and Nagai, K. (1996) Suppression of apoptotic cell death of IL-3-dependent cell line by ER/ SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors upon IL-3 deprivation. Exp.Cell. Res. 228: 92-97
- Pridham, T.G., and Gottlieb, D. (1948) The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. J. Bacteriol. 56:107-114
- Petrolini, B. S., Quaroni, S., Saracchi, M., and Sardi, P. (1993) A new genus of the madoromycetes : *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
- Ranmao, H., Guizhen, W. and Junying, I. (1993) A new genus of the actinomycetes, *Planotetraspora* gen. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:468-470
- Rajendra, P. M., Li, F. C., Qin, S., Fiebig, H. H. and Laatsch, H. (2003) Chandrananimycins A-C: Production of Novel Anticancer Antibiotics from a Marine *Actinomadura* sp. Isolate M048 by Variation of Medium Composition and Growth conditions. Int. J. Syst. Bacteriol. 1-12



- Rintala, H., Nevalainen, A., Rönkä, E. and Suutari, M., (2001) PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. Molecular and Cellular Probes. 15: 337-347
- 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
- Shirling, E. B. and Gottlieb, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313-340
- Singh, M. P., Petersen, P. J., Weiss, W. L., Kong, F. and Greenstein, M. (2000) Saccherosporins, Noval heptadecaglycoside antibiotics produced by Saccharotrix:antibacterial and mechanistic activities. Antimicrob Agent Chemother vol 44. 8:2154-2159
- Sneader, W. (2005) Drug discovery a history. John Wiley and Sons, Ltd. UK.
- 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
- Strohl, W. R., (1997) Industrial antibiotics : today and the future, In : Strohl, W. R. (ed). Biotechnology of antibiotics, 2<sup>nd</sup> end. Marcel Dekker, New York.
- Sujatha, P., Raju, K. V. V. S. N. B. and Ramana, T. (2004) Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Rese.160:119-126
- 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.
- 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. Frontiers in Applied Microbiology Vol.1. Print House, India.
- Waksman, S.A. (1950) Actinomycetes : Their Nature, Occurrence, Activities, and Importance. Massachusetts:Chronica Botanica Company.
- Waksman, S. A. and Henrici. Streptomycetaceae. In : Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Waksman, S.A. and Lomanitz, S. (1925) Contribution to the chemistry of decomposition of proteins and amino acids by various groups of microorganisms. J. Agric. Res. 30:263-281
- Waksman, S. A. and Woodruff, H. B. (1940) Bacteriostatic and Bactericidal substances produced by a soil actinoyces. J. Bacteribiol. 40:609
- Weiner, B. A. and Rhodes, R. A. (1974) Fermentation of Feedlot Waste Filtrate by Fungi and Streptomycetes. Appl.Micro. 28:845-850
- Williams, S. T., Goodfellow, M. and Alderson, G. (1989) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. The Williams and Wilkins. U.S.A.
- William, S.T., Holt, J. G., Krieg, N.R., Shealth, P.H.A. and Staley, J.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins, U.S.A.
- Wink, J. M., Kroppenstedt, R. M., Ganguli, B. N., Suresh, R. N., Schumann, P., Seibery, G. and Stackebrandt, E. (2002) Three New Antibiotic Producing Species of the Genus *Amycolatopsis*, *Amycolatopsis balhimycina* sp. nov., *A. tolypomycina* sp. nov., *A. vancoresmycina* sp. nov., and Description of *Amycolatopsis keratiniphila* subsp. *Keratiniphila* subsp. nov. and *A. keratiniphila* subsp. *nogabecina* subsp. nov. System. Appl. Microbiol. 26:38-46
- Zaher, F., Isenberg, H. D., Rosenfeld, M. H. and Scha, A. (1952) The distribution of soil actinomycetes antagonistic to protozoa. J. Parasitology. 39:33-37
- 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 intersimple sequence repeat (ISSR). New Phytol. 144:55-63

Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, Lynda., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2005) Nocardiosis and Saccharothrix genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Rese. Microbiol., 1-10



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. โซเดียม เคซีเนต อการ์ (Sodium Caseinate Agar)

โซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
เฟอร์รึคลอไรด์ ( $FeCl_3$ )	0.01	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

เติม cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ nystatin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารปฏิชีวนะทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 50 °C

#### 2. นิวเทรียนท์ อการ์ (Nutrient Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

#### 3. แมนนิทอล มังปิ้ง อการ์ (Mannitol Mungbean Agar)

ถั่วเขียวบด	20.0	กรัม
น้ำตาลแมนนิทอล (D-mannitol)	20.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำประปา	500.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

ต้มถั่วเขียวบดกับน้ำประปาจนเดือด กรองเอาถั่วเขียวออก นำน้ำต้มถั่วเขียวที่ได้มาเติมน้ำตาลแมนนิทอล และน้ำกลั่น ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 เติมน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มจนเดือดอีกครั้ง หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

#### 4. โซเดียม เคซีเนต ยีสต์ เอกซ์แทรก บรอก (Sodium Caseinate Yeast Extract Broth)

โซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2	กรัม
เฟอร์รคลอไรด์ ( $FeCl_3$ )	0.01	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2		
หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

#### 5. ทริปติก ซอย อการ์ (Tryptic Soy Agar)

กลูโคส	2.5	กรัม
แบคโต ทริปโตเน (Bacto tryptone)	17.0	กรัม
แบคโต ซอยโทเน (Bacto soy tone)	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2.5	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

#### 6. ทริปติก ซอย บรอก (Tryptic Soy Broth)

แบคโต ทริปโตเน (Bacto tryptone)	17.0	กรัม
แบคโต ซอยโทเน (Bacto soy tone)	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
หนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 7. แชนบรอกท อการ์ (Sabouraud Agar)

แบคโตเปปโทเน (Bacto peptone)	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	40.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 8. โปเตโต เดกซ์โตรส อการ์ (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง	200.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือดประมาณ 20 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้		
ปรับพีเอชเท่ากับ 5.6		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 9. มุลเลอร์ ฮินตัน อการ์ (Mueller-Hinton Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	2.0	กรัม
เคซีน (Acid Hydrolysate of Casein)	17.5	กรัม
แป้ง (starch)	1.5	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

### 10. กลูโคส ยีสต์ มอลต์ เอกซ์แทรกต์ อการ์ (Glucose Yeast Malt Extract agar)

กลูโคส	4.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ )	2.0	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

#### 11. โซเดียม เคซีนต ยีสต์ เอกซ์แทรก อการ์ (Sodium Caseinate Yeast Extract Agar)

โซเดียมเคซีนต (Sodium caseinate) 2.0 กรัม

ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) 0.5 กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.2 กรัม

เฟอร์รคลอไรด์ ( $FeCl_3$ ) 0.01 กรัม

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 10 กรัม

วุ้นผง 18.0 กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

#### 12. 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

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

#### 13. ISP2 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

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน



## 14. ISP3 โธ๊ต มีล อการ์ (Oat Meal Agar)

ข้าวโอ๊ต (Oat meal)	20.0	กรัม
*สารละลายเทรซ ซอลท์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มข้าวโอ๊ตในน้ำกลั่นโดยต้มให้เดือดประมาณ 10-15 นาที นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นลงไปให้อาหารจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เติม Trace salt solution ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (\*ภาคผนวก ก หมายเลข 23)

## 15. ISP4 อินออแกนิก ซอลท์ สตาร์ช (Inorganic Salts Starch Agar)

แป้ง (Soluble starch)	10.0	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 ซอลท์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

\*ภาคผนวก ก. หมายเลข 23

## 16. ISP5 กลีเซอรอล แอสปาราจีน อการ์ (Glycerol Asparagines Agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แอสปาราจีน ( <i>L</i> -asparagine)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
*สารละลาย เทรซ ซอลท์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

\*ภาคผนวก ก. หมายเลข 23

#### 17. ISP6 เปปโติน ยีสต์ เอกซ์แทรก ไอร์ออน อการ์ (Peptone Yeast Extract Iron Agar)

แบคโต เปปโติน (Bacto peptone)	15.0	กรัม
โปรติโอส เปปโติน (Proteose peptone)	5.0	กรัม
เฟอริก แอมโมเนียม ซิเตรต (Ferric ammonium citrate)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	1.0	กรัม
โซเดียมซัลเฟต ( $Na_2SO_4$ )	0.08	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

#### 18. ไทโรซีน อการ์ (Tyrosine Agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	15.0	กรัม
แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)	0.5	กรัม
แอล-แอสปาราจีน (L-asparagine)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1.0	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.1	กรัม
*สารละลาย เทรซ ซอลล์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2-7.4		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

\*ภาคผนวก ก. หมายเลข 23

### 19. 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		

### 20. โมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ (Modified Bennett's Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1.0	กรัม
กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แบคโต เปปโตน (Bacto peptone)	2.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.3		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที		

### 21. 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 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที		

## 22. คาร์บอน ยูทิลิเซชัน อการ์ (Carbon Utilization Agar)

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

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

ภาคผนวก ก หมายเลข 24

## 23. สารละลายเทรซ ซอลต์ (Trace Salts Solution)

เฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.1	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ( $\text{MnCl}_2$ )	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 °C

## 24. 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 ( $\text{MnCl}_2$ )	0.79	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

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

## 25. กลูโคส ยีสต์ มอลต์ เอกซ์แทรก บรอก (Glucose Yeast Malt Extract Broth)

กลูโคส	4.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	10.0	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.2

นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

## 26. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (stock reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ผงสำเร็จรูป	10.4	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต	2	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร กวนให้เป็นเนื้อเดียวกันปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าประมาณ 6.9-7.4 ด้วย HCL ความเข้มข้น 1N ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านหัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขนาด 0.22 ไมครอนเมตร ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขนาด 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพันพาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

## 27. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี Fetal Bovine Serum ความเข้มข้น 10% (working reagent)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (stock reagent)	90	มิลลิลิตร
ซีรัม (inactivated fetal bovine serum)	10	มิลลิลิตร
Gentamycin (100 mg/ml)	100	ไมโครลิตร

## 28. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 สำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (working reagent)	9	มิลลิลิตร
DMSO	1	มิลลิลิตร

## ภาคผนวก ข

### สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. 0.5 McFarland Standard

BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.175	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.175 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลาย BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร จะได้สารแขวนลอยที่มีลักษณะขุ่น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

#### 2. บัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free) ความเป็นกรด-ด่าง 7.4

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaHPO <sub>4</sub>	1.44	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	กรัม

นำแต่ละส่วนละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4 ด้วย HCL เข้มข้น 1N หรือ NaOH เข้มข้น 1N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 3. สารละลาย MTT 5 mg/ml ใน PBS

MTT	50	มิลลิกรัม
PBS	10	มิลลิลิตร

ละลาย MTT ใน PBS กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดไมโครทิวป์ปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร หุ้มแผ่นฟอยด์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 4. สารละลาย 0.04 N HCl ใน isopropanol

เติม HCl 0.331 มิลลิลิตร ลงใน 80 มิลลิลิตร isopropanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย isopropanol เก็บที่อุณหภูมิห้อง

## 5. Tris-HCl pH 8

Tris base	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาณเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

## 6. Washing buffer

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

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว (Autoclaved water) จนได้ปริมาณเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

## 7. 2X CTAB lysis buffer

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

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาณเป็น 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 8. Chloroform/isoamyl alcohol (24: 1 v/v)

Chloroform	192	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร

## 9. 20 % Polyethylene glycol 6000 (PEG)

Polyethylene glycol 6000	20	กรัม
NaCl	14.61	กรัม
เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น	200	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 10. Tris-EDTA buffer (TE buffer)

1 M Tris-HCl; pH 7.4, 7.5 หรือ 8	10	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA; pH 8.0	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 11 0.5 M EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)

EDTA	86.10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย NaOH ให้เท่ากับ 8 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้น ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ค

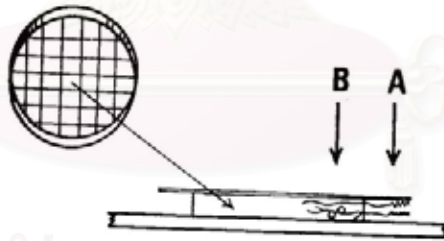
### วิธีการทดลอง

#### 1. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของมูลสัตว์

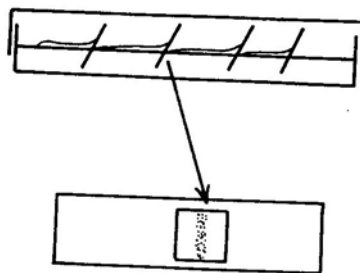
ชั่งมูลสัตว์ตัวอย่าง 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (1:2) นำไปเขย่าด้วย rotary shaker 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วย pH meter

#### 2. เทคนิค Slide Culture

ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยม (agar block) วางบนแผ่นสไลด์ฆ่าเชื้อ จากนั้นลงเชื้อบนแผ่นวุ้น วางแผ่นปิดสไลด์ฆ่าเชื้อทับด้านบน นำไปบ่มใน moist chamber สังเกตการสร้างสายใยอากาศ (A) และสายใยอาหาร (B) โดยการนำสไลด์ไปวางบนแท่นของกล้องจุลทรรศน์ ส่องดูโดยตรง หรือนำแผ่นปิดสไลด์มาวางบนแผ่นสไลด์ที่มีการหยดสี lacto phenol cotton blue นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์



หรือ ขีดแอกติโนมายซีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแผ่นปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว มาเสียบเป็นมุมเอียงลงบนรอยขีด บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นดึงแผ่นปิดสไลด์มาวางบนแผ่นสไลด์ที่หยดสี lacto phenol cotton blue ไว้ 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. 9<sup>th</sup> ed., 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 นำกระดาษกรองมากรองเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

3.3 นำกระดาษกรองที่มีเส้นใยติดอยู่เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3.4 นำออกมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

3.5 นำค่าน้ำหนักของกระดาษกรองมาหักออกผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

### 4. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

4.1 ตัดชิ้นวุ้นที่มีโคโลนีของแอติโนมัยซีตเจริญอยู่เป็นชิ้นสี่เหลี่ยม มีพื้นที่ประมาณ  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  นำชิ้นวุ้นไปอบด้วยไอของ 1% ออสเมียมเตตระออกไซด์ (Osmium tetroxide,  $\text{OsO}_4$ ) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 ซ่ เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายใต้ตู้ควีน

4.2 ขจัดน้ำออก (dehydration) จุ่มตัวอย่างในเอทานอลความเข้มข้น 30 50 70 90 และ 100% ขึ้นต่อนละ 10-20 นาทีตามลำดับ

4.3 การทำตัวอย่างให้แห้ง โดยการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยการใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical dryer model SAMDRI-780)

4.4 นำตัวอย่างไปติดบนแท่นทองเหลืองด้วยการติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (electroconductive adhesive)

4.5 นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทอง ความหนาประมาณ 20 ไมโครเมตร โดยใช้เครื่อง Ion sputter coater, model JSC-110

4.6 นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, IEOL รุ่น JSM-5410LV)

ที่มา : ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์เฉลี่ยของสารสกัดเอทิลแอสซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ  
แอกติโนมัยซีตทั้ง 127 สายพันธุ์

Antibiotic activity (average inhibition diameter zone = mm)

sample	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
Ac1-1	-	-	11	14	16	17	23
Ac1-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac1-3	-	-	10	15	11	11	10
Ac1-4	-	-	10	10	18	20	15
Ac1-5	-	-	10	-	9	-	12
Ac1-6	-	-	9	9	12	9	13
Ac1-7	-	-	-	-	-	-	-
Ac1-8	-	-	12	10	11	13	9
Ac1-9	-	-	-	-	-	-	-
Ac2-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac2-2	-	-	9	-	19	22	13
Ac2-3	-	-	-	-	-	-	-
Ac2-4	-	-	-	-	-	-	-
Ac3-1	-	-	-	-	-	10	-
Ac3-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac3-3	-	-	9	-	-	-	-
Ac4-1	-	-	29	20	16	24	15
Ac4-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac4-3	-	11	21	10	10	-	12
Ac5-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac5-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac5-3	-	-	10	-	13	13	15
Ac6-1	-	-	9	11	11	8	11
Ac6-2	-	-	23	24	-	-	-
Ac7-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac7-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac7-3	-	-	10	-	-	-	-
Ac7-4	-	-	-	-	-	-	-
Ac7-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac7-6	-	-	10	-	-	-	-

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์เฉลี่ยของสารสกัดเหททิลแอซีเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ  
ของแอกติโนมัยซีตทั้ง 127 สายพันธุ์

Antibiotic activity (average inhibition diameter zone = mm)

sample	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
Ac8-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-1	-	-	11	10	11	10	17
Ac9-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-3	-	-	11	-	-	15	-
Ac9-4	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-6	-	-	10	-	9	10	-
Ac9-7	-	-	-	-	-	-	12
Ac9-8	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-9	-	-	18	-	-	-	-
Ac9-10	-	-	-	-	-	-	-
Ac9-11	-	-	9	-	-	9	-
Ac9-12	-	-	13	10	-	-	-
Ac9-13	-	-	-	-	-	-	-
Ac10-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac10-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac10-3	-	-	9	-	-	9	-
Ac11-1	-	-	9	-	-	-	-
Ac12-1	-	-	9	-	-	-	-
Ac12-2	-	-	10	-	9	10	11
Ac13-1	-	-	13	-	-	-	-
Ac13-2	-	-	9	-	-	11	-
Ac13-3	-	-	10	-	9	10	11
Ac14-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac15-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac15-2	-	-	11	-	-	-	-
Ac16-1	11	13	21	26	-	10	13
Ac16-2	-	-	22	10	-	-	-
Ac17-1	-	-	10	-	-	9	-
Ac18-1	-	-	-	-	-	-	10
Ac18-2	-	-	10	8	-	-	-
Ac19-1	-	-	11	-	-	11	10
Ac20-1	-	-	-	-	-	9	-
Ac21-1	-	-	13	10	-	-	-
Ac23-1	-	-	11	-	-	25	-
Ac23-2	-	-	10	-	-	11	-
Ac24-1	-	-	13	-	-	-	-
Ac24-2	-	-	12	-	-	9	-

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์เฉลี่ยของสารสกัดเหททิลแอสิตเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ  
ของแอกติโนมัยซีตทั้ง 127 สายพันธุ์

Antibiotic activity (average inhibition diameter zone = mm)

sample	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
Ac24-3	-	-	10	10	-	-	-
Ac24-4	-	-	10	-	11	13	10
Ac24-5	-	-	10	-	9	-	-
Ac25-1	-	-	11	-	-	9	-
Ac25-2	-	-	12	-	-	-	-
Ac25-3	-	-	-	-	-	-	-
Ac25-4	-	-	-	-	9	10	-
Ac25-5	-	-	9	-	9	-	11
Ac25-6	-	-	9	-	-	-	-
Ac26-1	-	-	11	-	-	9	-
Ac27-1	-	-	11	9	-	9	11
Ac27-2	9	11	18	10	-	-	-
Ac28-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac28-2	-	12	20	9	-	12	-
Ac28-3	-	-	25	24	-	-	-
Ac28-4	-	-	-	-	-	-	-
Ac28-5	-	-	12	9	-	-	-
Ac29-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac29-2	-	-	9	-	-	-	-
Ac29-3	-	-	10	-	-	-	-
Ac29-4	-	-	-	-	-	-	11
Ac29-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac29-6	-	-	10	-	-	-	-
Ac29-7	-	-	16	11	-	-	-
Ac30-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac30-2	-	-	10	-	11	13	-
Ac30-3	-	-	10	-	-	-	-
Ac30-4	-	-	11	-	-	-	-
Ac30-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac30-6	-	-	-	-	-	-	-
Ac31-1	-	-	11	-	10	14	-
Ac31-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac31-3	-	-	10	-	-	-	-
Ac31-4	-	-	9	-	-	11	-
Ac31-5	-	-	-	-	-	-	-
Ac32-1	-	-	-	-	12	14	-
Ac32-2	-	-	-	-	-	-	-
Ac32-3	-	-	9	-	-	-	-
Ac32-4	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์เฉลี่ยของสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแอคติโนมัยซีตทั้ง 127 สายพันธุ์

Antibiotic activity (average inhibition diameter zone = mm)

sample	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
Ac32-5	-	-	17	11	-	-	-
Ac32-6	-	-	-	-	-	-	-
Ac33-1	-	-	-	-	-	-	-
Ac33,2	-	-	9	-	-	-	-
Ac33-3	-	-	-	-	-	-	-
Ac34-1	-	-	23	14	-	-	-
Ac35-1	-	-	9	-	-	-	-
Ac35-2	-	-	14	-	-	-	-
Ac35-3	-	-	25	20	-	-	-
Ac35-4	-	-	25	18	-	-	-
Ac36-1	-	-	9	-	-	-	-
Ac36-2	-	-	10	-	-	-	-
Ac36-3	-	-	-	9	11	9	-
Ac36-4	-	-	9	-	-	-	-
Ac37-1	-	-	12	-	-	-	-
Ac37-2	-	-	9	-	-	-	-
Ac38-1	-	-	10	-	-	-	-
Ac38-2	-	-	9	-	-	-	-
Ac39-1	-	-	9	-	-	-	-
Ac39-2	-	-	-	-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดเหททิลแอซิติเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีส์ทั้ง 127 สายพันธุ์

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ : Cell lines viability(%)						
sample	A375	SW620	Kat0III	HePG <sub>2</sub>	BT474	Jurkat
Ac1-1	115.46	64.78	69.71	84.82	0.89	42.53
Ac1-2	93.42	93.13	75.49	103.37	102.37	97.03
Ac1-3	86.51	63.75	76.40	80.10	1.48	57.38
Ac1-4	96.38	57.22	80.97	80.78	2.08	62.17
Ac1-5	101.48	78.35	80.37	79.76	24.63	81.34
Ac1-6	57.24	19.24	32.42	42.66	73.29	88.95
Ac1-7	120.89	94.50	69.10	97.13	102.97	87.19
Ac1-8	70.72	18.04	24.96	53.12	66.47	73.91
Ac1-9	96.22	95.02	82.34	97.81	104.15	108.64
Ac2-1	86.18	88.49	74.89	94.94	101.48	89.70
Ac2-2	83.39	21.31	28.46	47.05	56.68	76.69
Ac2-3	90.46	88.66	72.75	93.59	101.19	82.17
Ac2-4	94.57	88.32	75.19	97.13	100.89	77.62
Ac3-1	96.05	89.69	74.58	94.27	102.67	86.54
Ac3-2	99.01	91.24	78.08	98.82	93.47	96.47
Ac3-3	110.20	99.48	69.41	106.58	98.52	97.59
Ac4-1	71.88	20.62	38.36	35.24	58.16	93.31
Ac4-2	88.16	87.29	84.47	93.59	96.74	97.12
Ac4-3	42.43	24.40	37.90	86.85	98.22	81.71
Ac5-1	90.79	85.22	82.50	92.58	100.89	92.94
Ac5-2	88.32	86.43	80.52	107.94	96.14	96.75
Ac5-3	91.94	20.62	32.88	50.59	63.20	88.30
Ac6-1	10.21	31.07	44.39	44.87	60.21	80.70
Ac6-2	95.74	72.80	70.13	68.24	18.30	45.39
Ac7-1	45.01	38.45	62.69	70.13	68.20	65.61
Ac7-2	69.83	68.02	73.98	90.10	90.35	82.71
Ac7-3	76.18	89.09	74.87	62.50	63.16	82.52
Ac7-4	62.22	103.70	83.63	100.49	85.09	96.54
Ac7-5	73.22	103.51	88.45	103.08	85.96	100.19
Ac7-6	77.31	99.26	82.49	102.92	97.34	106.64
Ac8-1	78.55	98.34	90.61	103.41	87.28	118.88
Ac9-1	35.38	35.30	28.55	69.16	53.73	64.02
Ac9-2	60.22	43.25	41.24	62.82	53.95	73.55
Ac9-3	44.89	31.61	71.32	67.53	55.26	43.08



ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากน้ำ  
เลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีตทั้ง 127 สายพันธุ์

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ : Cell lines viability(%)						
sample	A375	SW620	KatoIII	HePG <sub>2</sub>	BT474	Jurkat
Ac9-4	77.31	92.79	82.23	98.38	88.60	87.94
Ac9-5	71.82	91.87	84.64	102.92	87.28	84.95
Ac9-6	81.30	97.41	89.97	101.14	92.76	92.62
Ac9-7	71.57	29.02	39.72	65.42	46.71	69.63
Ac9-8	77.31	94.27	87.06	109.09	99.34	102.80
Ac9-9	75.06	96.12	76.40	83.77	96.05	98.60
Ac9-10	74.19	92.42	78.55	100.32	97.15	93.74
Ac9-11	51.50	83.18	71.45	93.18	91.45	41.87
Ac9-12	74.74	84.47	75.25	94.48	77.63	97.01
Ac9-13	74.69	86.32	76.14	101.14	88.16	100.75
Ac10-1	74.94	89.65	94.42	100.97	86.84	110.47
Ac10-2	80.55	86.50	78.55	110.55	88.38	101.96
Ac10-3	72.82	71.72	67.51	91.07	77.85	62.99
Ac11-1	71.82	87.99	63.71	95.94	88.38	86.26
Ac12-1	73.19	89.46	64.41	98.21	72.60	97.76
Ac12-2	64.84	86.88	56.35	102.11	74.26	90.37
Ac13-1	76.56	86.14	58.50	96.10	89.60	107.20
Ac13-2	78.93	95.80	75.84	90.70	96.44	102.45
Ac13-3	58.48	90.72	63.24	128.73	30.64	73.64
Ac14-1	77.10	64.80	48.84	89.45	71.51	59.83
Ac15-1	82.44	70.75	53.08	94.36	80.00	64.64
Ac15-2	110.38	87.22	78.02	94.35	82.05	84.69
Ac16-1	95.11	68.48	92.16	85.55	16.38	27.31
Ac16-2	92.52	83.89	81.36	94.73	100.27	91.16
Ac17-1	105.34	88.27	78.92	91.03	100.14	75.06
Ac18-1	91.91	20.84	28.53	30.00	44.77	53.91
Ac18-2	98.93	99.47	97.30	92.73	105.75	75.06
Ac19-1	41.22	23.29	31.11	114.18	34.97	64.33
Ac20-1	98.63	80.21	81.11	90.91	94.38	68.75
Ac21-1	101.83	81.61	90.62	93.45	78.90	73.40
Ac23-1	98.63	88.09	85.73	103.45	78.77	80.74
Ac23-2	95.65	23.47	38.43	28.91	44.99	56.04
Ac24-1	93.74	93.35	90.36	88.04	94.25	80.82
Ac24-2	64.27	22.59	29.17	42.18	43.65	63.14
Ac24-3	96.79	81.61	83.03	83.81	92.19	78.14
Ac24-4	65.50	37.13	56.17	118.91	32.96	68.98
Ac24-5	102.24	72.50	89.20	91.45	87.95	74.43
Ac25-1	64.58	42.03	55.78	41.64	41.00	61.17
Ac25-2	90.23	79.86	96.92	96.36	79.18	75.22

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดเอทิลแอสซิเตตจากน้ำ  
เลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีตทั้ง 127 สายพันธุ์

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ : Cell lines viability(%)						
sample	A375	SW620	Kat0III	HePG <sub>2</sub>	BT474	Jurkat
Ac25-3	90.99	77.58	105.66	94.36	89.18	90.06
Ac25-4	63.82	37.83	45.76	59.45	49.00	57.30
Ac25-5	59.85	19.96	25.19	120.90	43.65	63.61
Ac25-6	118.02	60.07	61.83	81.45	93.88	47.43
Ac26-1	80.00	83.89	80.98	83.09	86.85	68.27
Ac27-1	69.31	60.25	66.59	112.23	49.35	59.67
Ac27-2	94.66	66.61	82.36	89.03	85.94	98.18
Ac28-1	71.30	17.88	43.27	57.19	49.74	77.27
Ac28-2	84.73	91.24	86.68	89.39	85.03	83.43
Ac28-3	87.69	83.76	75.76	109.89	50.13	80.20
Ac28-4	80.92	96.17	82.99	88.49	86.07	87.88
Ac28-5	68.46	84.12	72.08	80.58	75.65	85.05
Ac29-1	76.00	93.98	95.69	85.97	92.19	92.53
Ac29-2	77.85	79.74	101.52	88.31	85.81	85.45
Ac29-3	76.15	76.82	84.52	86.51	83.85	85.35
Ac29-4	84.76	57.48	70.18	82.91	75.91	85.25
Ac29-5	80.15	77.19	93.65	85.43	85.16	87.07
Ac29-6	81.08	92.34	74.24	85.07	96.61	87.17
Ac29-7	67.69	77.37	61.29	77.52	90.10	81.72
Ac30-1	78.46	93.80	85.66	89.39	85.68	96.06
Ac30-2	10.62	21.35	23.98	52.88	45.83	85.66
Ac30-3	76.77	98.91	114.59	85.97	91.80	89.49
Ac30-4	77.54	88.14	81.85	84.89	81.90	88.08
Ac30-5	88.92	87.77	82.74	87.41	101.69	89.19
Ac30-6	88.31	87.23	86.68	92.63	100.78	88.69
Ac31-1	-6	26.82	18.53	31.83	44.66	83.23
Ac31-2	75.23	83.94	77.54	84.89	88.80	89.39
Ac31-3	74.46	91.42	73.35	92.27	91.41	92.53
Ac31-4	74.15	99.64	88.07	90.47	93.49	94.75
Ac31-5	79.23	88.87	96.57	88.31	77.99	90.20
Ac32-1	22.00	17.71	19.67	44.06	44.40	82.12
Ac32-2	85.69	86.86	74.75	85.97	94.04	89.49
Ac32-3	90.46	92.34	81.85	83.03	90.85	88.99
Ac32-4	90.00	92.70	71.45	85.71	92.77	91.72
Ac32-5	80.46	80.06	61.39	78.66	106.17	89.20
Ac32-6	89.23	92.27	69.31	79.33	93.19	92.84
Ac33-1	90.00	93.66	73.27	79.83	93.19	90.41

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดเอทิลแอสซิเตตจากน้ำ  
เลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีตทั้ง 127 สายพันธุ์

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ : Cell lines viability(%)						
sample	A375	SW620	Kat0III	HePG <sub>2</sub>	BT474	Jurkat
Ac33-2	87.85	91.19	71.62	79.66	92.34	91.99
Ac33-3	104.68	92.74	90.76	80.50	88.51	91.99
Ac34-1	99.79	99.81	66.67	80.34	68.30	91.63
Ac35-1	98.34	87.64	73.60	84.03	90.21	91.02
Ac35-2	97.02	81.00	75.08	84.54	92.34	97.94
Ac35-3	92.23	94.44	77.72	78.49	133.83	96.24
Ac35-4	100.85	97.37	69.14	77.31	93.83	93.08
Ac36-1	90.85	99.38	65.51	77.82	95.32	90.66
Ac36-2	8.72	38.79	37.13	44.71	76.17	82.04
Ac36-3	86.81	101.08	94.40	75.63	94.68	89.93
Ac36-4	96.38	95.98	83.33	77.48	101.70	90.90
Ac37-1	95.74	89.34	92.24	85.88	130.85	91.99
Ac37-2	91.06	89.18	78.88	81.51	98.72	96.36
Ac38-1	97.02	83.62	67.82	75.80	106.81	90.53
Ac38-2	95.96	90.73	70.46	80.50	106.38	87.86
Ac39-1	103.19	92.74	63.04	77.98	98.09	89.08
Ac39-2	107.45	97.22	68.98	75.63	63.62	89.68

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Dancan ของ บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ Ac1-4 ด้วยตัว ทำละลาย 3 ชนิดคือ เมททานอล เอทิลแอลกอฮอล์ และเฮกเซน

ANOVA

จุลินทรีย์ ทดสอบ		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>B. cereus</i>	Between Groups	1384.000	3	461.333	5536.000	.000
	Within Groups	.667	8	.083		
	Total	1384.667	11			
<i>S. aureus</i>	Between Groups	1343.583	3	447.861	2687.167	.000
	Within Groups	1.333	8	.167		
	Total	1344.917	11			
<i>P. aeruginosa</i>	Between Groups	1233.000	3	411.000	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	1233.000	11			
<i>E. coli</i>	Between Groups	1262.250	3	420.750	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	1262.250	11			
<i>S. cerevisiae</i>	Between Groups	55.000	3	18.333	220.000	.000
	Within Groups	.667	8	.083		
	Total	55.667	11			
<i>C. albicans</i>	Between Groups	51.000	3	17.000	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	51.000	11			
<i>A. niger</i>	Between Groups	183.000	3	61.000	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	183.000	11			

*B. cereus*

Duncan

SOLVENT	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
hexane	3	.0000			
ethyl acetate	3		10.0000		
methanol	3			20.0000	
broth	3				28.6667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

*S. aureus*

Duncan

SOLVENT	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
hexane	3	.0000			
ethyl acetate	3		10.0000		
methanol	3			23.3333	
broth	3				26.3333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

*P. aeruginosa*

Duncan

SOLVENT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
ethyl acetate	3	.00		
hexane	3	.00		
methanol	3		14.00	
broth	3			24.33
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

*E. coli*

Duncan

SOLVENT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
ethyl acetate	3	.00		
hexane	3	.00		
methanol	3		15.00	
broth	3			24.31
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

*S. cerevisiae*

Duncan

SOLVENT	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
broth	3	17.3333			
hexane	3		21.0000		
ethyl acetate	3			22.0000	
methanol	3				23.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

*C. albicans*

Duncan

SOLVENT	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Broth	3	15.0000		
Hexane	3	15.6667		
ethyl acetate	3		18.0000	
Methanol	3			20.0000
Sig.		.397	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

*A. niger*

Duncan

SOLVENT	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Broth	3	14.0000			
Hexane	3		19.0000		
ethyl acetate	3			20.0000	
Methanol	3				25.3333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หมายเหตุ	control	=	น้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย
	Methanol	=	น้ำเลี้ยงเชื้อที่ถูกสกัดด้วย methanol
	Ethyl acetate	=	น้ำเลี้ยงเชื้อที่ถูกสกัดด้วย Ethyl acetate
	Hexane	=	น้ำเลี้ยงเชื้อที่ถูกสกัดด้วย Hexane

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Duncan ของ บริเวณยับยั้งของจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ Ac16-1 ด้วยตัว ทำละลาย 3 ชนิดคือ เมททานอล เอทิลแอซิเตต และเฮกเซน

## ANOVA

จุลินทรีย์ ทดสอบ		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<i>B. cereus</i>	Between Groups	185.583	3	61.861	371.167	.000
	Within Groups	1.333	8	.167		
	Total	186.917	11			
<i>S. aureus</i>	Between Groups	1195.333	3	398.444	2390.667	.000
	Within Groups	1.333	8	.167		
	Total	1196.667	11			
<i>P. aeruginosa</i>	Between Groups	594.000	3	198.000	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	594.000	11			
<i>E. coli</i>	Between Groups	594.000	3	198.000	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	594.000	11			
<i>S. cerevisiae</i>	Between Groups	410.250	3	136.750	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	410.250	11			
<i>C. albicans</i>	Between Groups	.000	3	.000	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	.000	11			
<i>A. niger</i>	Between Groups	342.000	3	114.000	.	.
	Within Groups	.000	8	.000		
	Total	342.000	11			

*B. cereus*

## Duncan

SOLVENT	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
hexane	3	9.3333			
methanol	3		15.0000		
broth	3			17.3333	
ethyl acetate	3				20.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000



Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

*S. aureus*

Duncan

SOLVENT	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
hexane	3	.0000			
methanol	3		19.0000		
broth	3			21.3333	
ethyl acetate	3				26.3333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

*Pseudomonas*

หมายเหตุ control = น้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลาย  
 Methanol = น้ำเลี้ยงเชื้อที่ถูกสกัดด้วย methanol  
 Ethyl acetate = น้ำเลี้ยงเชื้อที่ถูกสกัดด้วย Ethyl acetate  
 Hexane = น้ำเลี้ยงเชื้อที่ถูกสกัดด้วย Hexane

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทีศนา นิธิสกุลกาญจน์ เกิดเมื่อวันที่ 22 สิงหาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัด นครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสตรีทุ่งสง สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิชาการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตร จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547

### การเสนอผลงานทางวิชาการ

บทความเรื่อง Bioactive compounds produced by actinomycetes isolated from herbivore dung in Thailand

ในการประชุมหัวข้อ International Symposium on Microbial Ecology

สถานที่ Ehime University Matsuyama, Japan

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย