

การแยกแยะและลักษณะสมบัติของแอกติโนมายซีที่สร้างสารปฏิชีวนะและสารต้านมะเร็งจากดิน
ในจังหวัดน่าน

นายวรปรัชญ์ ศรีสุขคำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

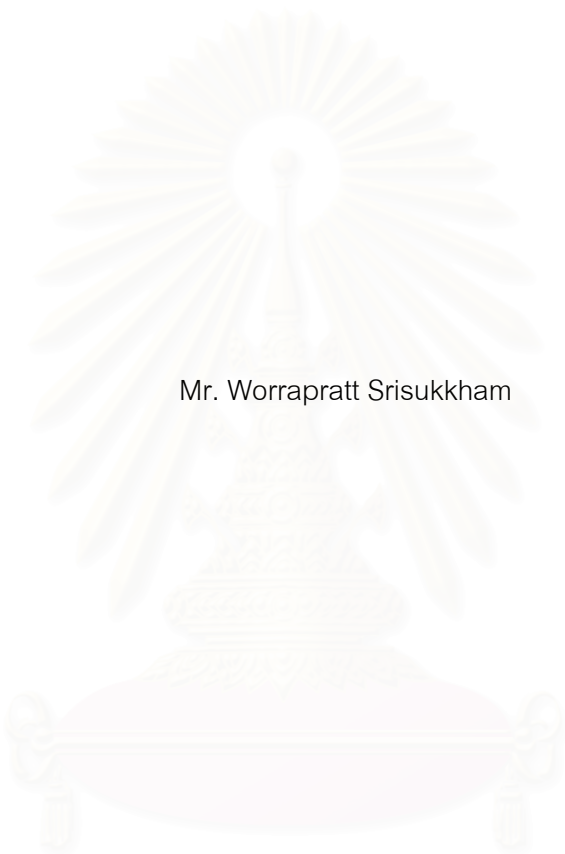
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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



Mr. Worrapratt Srisukham

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

วรปรัชญ์ ศรีสุขคำ : การแยกและลักษณะสมบัติของแอคติโนมัยซีทีสที่สร้างสารปฏิชีวนะและสารต้านมะเร็งจากดินในจังหวัดน่าน. (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC- AND ANTICANCER-PRODUCING ACTINOMYCETES FROM SOIL IN NAN PROVINCE) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ประกิตต์สินี สีहनนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว, 153 หน้า.

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

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

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

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....*ว.ปรัชญ์ ศรีสุขคำ*
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*พิเชษฐ*
 ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*จิตรตรา เพ็ญเขียว*

4772450323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ACTINOMYCETES / ANTICANCER / ANTIMICROBIAL

WORRAPRATT SRISUKKHAM: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC- AND ANTICANCER-PRODUCING ACTINOMYCETES FROM SOIL IN NAN PROVINCE.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PRAKITSIN SRIHANON, Ph.D., THESIS COADVISER: ASST. PROF. JITTRA PIAPUKIEW, 153 pp.

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

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

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

Department :.....Microbiology.....Student's signature : *Worrapratt Srisukkharn*
 Field of study :.....Industrial Microbiology....Advisor's signature : *Prakitsin Srihanon*
 Academic year :.....2007.....Co-advisor's signature : *Jittra Piapukiew*

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประทีปดีสิน สีहनนท์ อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยในทุกๆ ขั้นตอน จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงได้ให้กำลังใจ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

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

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย"จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณนางสาวธีรวัฒนา ภาระมาตย์ นางสาวสุนัดดา โยมญาติ นางสาวสุกัญญาณี แซ่ประเสริฐ นางสาวทศนา นิธิสกุลกาญจน์ นางสาวปาริฉัตร ราวีศรี นายณัฐชัย เก่งพิภักดิ์ นายสมเจตน์ เอกมหาสวัสดิ์ นางสาวฐิติรัตน์ เลิศเชาวยุท และ น้องๆ สมาชิกห้อง 401 ทุกคน ที่ให้การช่วยเหลือ และให้คำปรึกษา ตลอดจนให้คำแนะนำ จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จออกมาได้ด้วยดี และขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ สมาชิกห้อง 403 ทุกคน ที่เอื้อเฟื้อในทุกๆ เรื่อง และช่วยเหลือในขั้นตอนการทดสอบสารต้านเซลล์มะเร็ง

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตา คุณยาย คุณน้า คุณอา ทุกคน ตลอดจนพี่น้อง และญาติทุกคนที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการเรียนและการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ประวัติการค้นพบ.....	4
2.2 ลักษณะทั่วไปและแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัซีทีส.....	5
2.3 วงชีวิตของแอกติโนมัซีทีส.....	6
2.4 สัณฐานวิทยาของแอกติโนมัซีทีส.....	7
2.5 การจัดจำแนกแอกติโนมัซีทีส.....	17
2.6 ความต้องการสารอาหารของแอกติโนมัซีทีส.....	20
2.7 การสร้างกลิ่นและการสร้างรงควัตถุของแอกติโนมัซีทีส.....	22
2.8 การแยกและการคัดเลือกแอกติโนมัซีทีส.....	23
2.9 ประโยชน์ของแอกติโนมัซีทีส.....	26
2.10 สารปฏิชีวนะ.....	27
3. วิธีดำเนินงานวิจัย.....	41
3.1 อุปกรณ์.....	41
3.2 สารเคมี.....	43
3.3 การเก็บตัวอย่างดิน.....	46
3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน.....	46
3.5 การแยกแอกติโนมัซีทีสจากดินตัวอย่าง.....	46
3.6 การเก็บรักษาแอกติโนมัซีทีส.....	46
3.7 การทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัซีทีสสายพันธุ์ที่มีความสามารถ ในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....	47

3.8. การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงและสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....	52
3.9 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....	53
3.10 การแยกสารสกัดเบื้องต้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	54
3.11 การศึกษาตำแหน่งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบบนแผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี.....	54
3.12 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....	55
3.13 การศึกษาผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสต่อการตายแบบอะพอพอโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์โดยวิธีย้อมด้วย DNA dry Hoechst 33342.....	58
3.14 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....	59
3.15 การจัดจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยวิเคราะห์ ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA.....	62
4. ผลการทดลอง.....	65
4.1 ลักษณะของตัวอย่างดิน.....	65
4.2 การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากดินตัวอย่าง.....	66
4.3 การทดสอบความสามารถของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่แยกได้ในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....	67
4.4 จัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....	70
4.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราทดสอบโดยวิธี Dual Culture.....	72
4.6 การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงและสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....	85
4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2.....	89
4.8 การแยกสารปฏิชีวนะเบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	90

บทที่	หน้า
4.9 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ที่ สร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....	93
4.10 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....	100
4.11 การศึกษาผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ Nan 2.4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์.....	102
4.12 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2....	105
4.13 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA.....	120
5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง.....	125
รายการอ้างอิง.....	129
ภาคผนวก.....	136
ภาคผนวก ก.....	137
ภาคผนวก ข.....	148
ภาคผนวก ค.....	151
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	153

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอกติโนมายซีทีส.....	29
2.2 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแอกติโนมายซีทีสที่พบได้ยาก.....	31
3.1 แสดงส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่าง ๆ ในสารละลาย PCR 10 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ.....	63
4.1 แสดงแหล่งที่เก็บ ลักษณะและพีเอช ของตัวอย่างดิน.....	65
4.2 แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมายซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง.....	66
4.3 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ของแอกติโนมายซีทีส.....	68
4.4 จำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมายซีทีสที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม.....	71
4.5 แสดงระยะทางที่เส้นใยของราทดสอบถูกยับยั้งโดยแอกติโนมายซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2.....	73
4.6 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ของอาหารเลี้ยงแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ชนิดต่าง ๆ มาสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์.....	86
4.7 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ของอาหารเลี้ยงแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ชนิดต่าง ๆ มาสกัดด้วยเมทานอล.....	87
4.8 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจาก เอทิลแอลกอฮอล์และสารสกัดจากเมทานอลเมื่อเลี้ยงแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหาร SSB (Soluble starch broth).....	88
4.9 แสดงการจัดกลุ่มของแอกติโนมายซีทีสที่นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้ง เซลล์ไคน์มะเร็งมนุษย์.....	100
4.10 สรุปจำนวนสายพันธุ์ของแอกติโนมายซีทีสกลุ่มที่สร้างสารที่มีผลต่อการยับยั้ง เซลล์ไคน์มะเร็งมนุษย์ โดยทำให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ แยกตามชนิดของเซลล์มะเร็ง.....	101
4.11 แสดงการเจริญของแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ.....	110

ตารางที่	หน้า
4.12 แสดงความสามารถในการสร้างรงควัตถุเมลานิน, การรีดิวซ์ไนเตรท และการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....	115
4.13 แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบของแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....	116
4.14 ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	117
4.15 แสดงความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ที่พีเอชต่าง ๆ.....	117
4.16 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....	118
4.17 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....	119
4.18 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2 เปรียบเทียบกับ <i>Streptomyces platensis</i>	123

สารบัญภาพ

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

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

รูปที่	หน้า
4.24 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใย ของแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ Nan 6.2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน.....	107
4.25 ภาพถ่ายกำลังสูงจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดง สายสปอร์ชนิดเป็นเกลียวของแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ Nan 6.2 ที่เจริญเต็มที่ อายุ 6 วัน.....	108
4.26 ภาพถ่ายกำลังสูงจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลักษณะพื้นผิวสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ Nan 6.2.....	108
4.27 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ Nan 2.4 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ.....	111
4.28 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ Nan 6.2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ.....	113
4.29 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีที่ สายพันธุ์ Nan 2.4 จำนวน 1,083 เบส.....	120
4.30 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีที่ สายพันธุ์ Nan 6.2 จำนวน 1,097 เบส.....	121
4.31 Phylogenetic tree แสดงการจัดความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีที่ ที่ได้จาก GenBank กับแอกติโนมัยซีทีที่สายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2.....	122

บทที่ 1

บทนำ

แอกติโนมัยซีทีสเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะบางประการคล้ายรา โดยลักษณะที่คล้ายราคือ มีเส้นใยแตกแขนงออกเป็นเส้นเล็กๆ แต่เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่ารา (Sykes และ Skinner, 1973) มีการสร้างสปอร์ อาจเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่หรือเป็นสายสปอร์ เช่น ในสกุล *Micromonospora* มีการสร้างสปอร์แบบสปอร์เดี่ยวลักษณะทรงกลม บริเวณปลายเส้นใยสั้นๆ ที่แตกแขนงออกมา (Hirsch และคณะ, 2004) หรือบางชนิดไม่สร้างสปอร์แต่เส้นใยจะแตกหักเป็นท่อนๆ ลักษณะคล้ายอาโทรสปอร์ (arthospore) เช่น *Nocardia* (Lederberg และคณะ, 2000) แต่ลักษณะโดยส่วนใหญ่จะใกล้เคียงกับแบคทีเรียมากกว่า กล่าวคือ แอกติโนมัยซีทีสไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีส่วนประกอบของผนังเซลล์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย ติดสีแกรมบวก แต่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ของเบส guanine และ cytosine (%G+C) ในดีเอ็นเอสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป มีความไวต่อสารปฏิชีวนะที่ทำลายแบคทีเรียแต่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ทำลายรา ดังนั้น แอกติโนมัยซีทีส จึงถูกจัดให้เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรีย โคลิไนของแอกติโนมัยซีทีสมีลักษณะเป็นผงแป้ง หรือเป็นแผ่นหนัง ทึบแสง ผิวของโคลิไนอาจเรียบ นูน ขรุขระ เป็นเม็ดเล็ก หรือเป็นเกล็ด โคลิไนมีสีต่างๆ เช่น สีขาว เหลือง ส้ม ชมพู ม่วง ฟ้า เขียว น้ำตาล และดำ ลักษณะเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีส มี 2 ชนิด คือเส้นใยที่ชูขึ้นไปบนอากาศ เรียกว่าเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) และเส้นใยที่เจริญติกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เรียกว่าเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) แอกติโนมัยซีทีสเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ต่างๆ มากมาย โดยมีรายงานสนับสนุนว่าในจำนวนของสารทุติยภูมิที่ถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ประมาณ 61 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารทุติยภูมิที่ได้จากแอกติโนมัยซีทีส รองลงมาคือรา และแบคทีเรียตามลำดับ (Kieser และคณะ, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารปฏิชีวนะที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในทางการค้า และทางการแพทย์ ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ได้จากสกุล *Streptomyces* (Miyadoh, 1993) เช่น นีโอไมซิน (neomycin) ได้จาก *Streptomyces fradiae* นิดดามัยซิน (niddamycin) และ ซีเลสติเซทิน (celesticetin) ได้จาก *S. caelestis* (Melloui และคณะ, 2003) ในทางการแพทย์ bleomycin sulfate ที่สร้างจาก *Streptomyces verticillus* ยังใช้เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยใช้บำบัดผู้ที่เป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองได้อีกด้วย และประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่ได้จากแอกติโนมัยซีทีส ได้รับการพัฒนาปรับปรุงนำไปใช้ทางด้านเกษตรกรรม เช่น การใช้ fungichomin ที่ผลิตโดย *Streptomyces padanus* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินในกะหล่ำปลี ที่มีสาเหตุมาจาก *Rhizoctonia solani* (Shih และคณะ, 2003) นอกจากนี้ แอกติโนมัย

ซีที่ยังเป็นแหล่งของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ที่ผลิตโดย *Thermomonospora* spp. ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมผ้าโดยใช้พิมพ์ลายผ้า เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme) ผลิตจาก *Streptomyces griseus* (Caccavo, 1999) โคติเนส (Chitinase) ย่อยโคติน ผลิตจาก *Streptomyces coelicolor* (Saito และคณะ, 2001)

แอกติโนมัยซีที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ โคลน ปมรากพืช และในอากาศ ในดินพบแอกติโนมัยซีที่เป็นอันดับสองรองจากแบคทีเรียชนิดอื่น (Sykes และ Skinner, 1973) เนื่องจากในธรรมชาติ แอกติโนมัยซีทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) และในดินเป็นแหล่งอินทรีย์วัตถุต่างๆ มากมาย ทั้งซากพืช ซากสัตว์ และสาร biopolymer ต่างๆ เช่น ลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เคราติน เพคติน และโคติน เป็นต้น ซึ่งแอกติโนมัยซีที่สลายสารที่ย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนเหล่านี้ได้ (ยูวตี มหาศักดิ์ศิริ, 2546) ดังนั้นภาวะในดินต่างๆ เหล่านี้ จึงเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีที่สลาย ทำให้ดินเป็นแหล่งที่มีโอกาสพบแอกติโนมัยซีที่สลายได้มาก และมีความหลากหลาย ดังเคยมีรายงานการคัดแยกแอกติโนมัยซีที่สลายจากดินแหล่งต่างๆ เช่น ตัวอย่างดินประเทศตูนีเซีย สามารถแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ US80 ซึ่งสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ และราได้ (Fourati-Ben Fguira และคณะ, 2004) และจากดินแหล่งเดียวกันนี้ยังพบ *Streptomyces caelestis* ซึ่งสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบได้ (Melloui และคณะ, 2003) นอกจากนี้ภายในประเทศไทย พบว่าตัวอย่างดินจากจังหวัดต่างๆ 32 ตัวอย่าง สามารถแยกแอกติโนมัยซีที่สลายได้ 117 สายพันธุ์ (วีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร, 2544) และจากดิน 35 ตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งของเกาะเสม็ด จังหวัดระยอง สามารถแยกแอกติโนมัยซีที่สลายได้ 100 ไอโซเลต ในจำนวนนี้พบว่าเชื้อที่แยกได้ 80 ไอโซเลตเป็นแอกติโนมัยซีที่สลายในสกุล *Streptomyces* และอีก 20 ไอโซเลตในสกุล *Micromonospora* การคัดเลือกขั้นต้นพบว่า *Streptomyces* sp. 55 ไอโซเลต และ *Micromonospora* sp. 14 ไอโซเลตสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ (วิจิตรา อนันต์ศิริวัฒนา, 2545) ดังนั้นการคัดแยกแอกติโนมัยซีที่สลายจากดินเพื่อหาแอกติโนมัยซีที่มีคุณสมบัติเด่นในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ โดยเฉพาะในพื้นที่จังหวัดน่านซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการสำรวจมาก่อน ภูมิประเทศของจังหวัดน่านมีทั้งลักษณะที่เป็นพื้นที่ราบลุ่มแม่น้ำพื้นที่ป่าไม้และภูเขา โดยมีทิวเขาลงพระบางและทิวเขามันน้ำ ซึ่งเป็นทิวเขาคินแกรนิต ที่มีความสูง 600 - 1,200 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล ทอดผ่านทั้งจังหวัด คิดเป็นพื้นที่ประมาณร้อยละ 40 ของพื้นที่ทั้งจังหวัด สภาพพื้นที่โดยทั่วไปของจังหวัดน่าน ส่วนใหญ่ประกอบด้วยภูเขาและป่าไม้ ซึ่งมีความลาดชันเกินกว่า 30 องศา โดยมีเนื้อที่ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อที่จังหวัด มีลักษณะเป็นภูเขาสูงคั่นลอนลาด และสูงคั่นลอนชัน พื้นที่ราบลุ่มมีเป็นส่วนน้อย ได้แก่ ที่ราบกว้างใหญ่อยู่ในลุ่มน้ำน่าน - สา ตามลำน้ำน่าน และที่ราบลุ่มแคบๆ อยู่แถบอำเภอนาน้อยตอนใต้

อำเภอท่าวังผา อำเภอปัว อำเภอเชียงกลาง และอำเภอทุ่งช้าง ภูเขาที่มีความสูงมาก ส่วนใหญ่อยู่บริเวณเขตชายแดน ติดกับสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ภูเขาที่สำคัญ ได้แก่ ภูเขาที่ตั้งอยู่ทางทิศเหนือของเขตอำเภอปัว เป็นต้นกำเนิดของแม่น้ำน่าน ภูเขาที่สูงที่สุดในจังหวัดน่านคือดอยภูคา มีความสูง 1,980 เมตร เหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง ตั้งอยู่ทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ในเขตท้องที่อำเภอปัว เนื่องจากสภาพพื้นที่เป็นภูเขาสูงและป่าไม้ ทำให้มีลุ่มน้ำ และแหล่งน้ำที่เป็นต้นกำเนิด ของต้นน้ำลำธารสำคัญหลายสาย เช่น แม่น้ำน่าน แม่น้ำสา แม่น้ำว่า แม่น้ำสมุน แม่น้ำหลง แม่น้ำปัว แม่น้ำกอน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีลำธารและลำห้วยจำนวนมาก และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าดินที่จังหวัดน่านพบแอกติโนไมซีทีส และค่อนข้างมีความหลากหลาย จึงเป็นที่น่าสนใจจะศึกษาแอกติโนไมซีทีสจากดินในพื้นที่นี้

จากข้อมูลข้างต้นเป็นส่วนหนึ่งของประโยชน์อันหลากหลายของสารที่ผลิตจากแอกติโนไมซีทีส โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งสารปฏิชีวนะ และสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ยิ่งไปกว่านั้น จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ มีการปรับตัวให้ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้กันโดยทั่วไปมากขึ้น ดังนั้นข้อมูลที่จะได้จากการศึกษานี้จะทำให้ทราบถึงความหลากหลายของแอกติโนไมซีทีส ซึ่งบางชนิดอาจยังไม่มีผู้ใดค้นพบมาก่อน นอกจากนี้ยังอาจได้สารปฏิชีวนะ และสารยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดใหม่ ซึ่งอาจจะนำไปใช้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อแยกแอกติโนไมซีทีสจากดินแหล่งต่างๆ ในจังหวัดน่าน และคัดเลือกหาแอกติโนไมซีทีสที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ และสารต้านมะเร็ง

ขั้นตอนการวิจัย

1. สุ่ม และเก็บตัวอย่าง
2. แยกชนิดของแอกติโนไมซีทีสให้บริสุทธิ์ และเก็บเชื้อบริสุทธิ์
3. ทดสอบความสามารถของแอกติโนไมซีทีสในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ และสารต้านมะเร็ง
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนไมซีทีสสายพันธุ์ซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่คัดเลือก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดแยกแอกติโนไมซีทีสสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ และสารต้านมะเร็ง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติการค้นพบ

แอกติโนมัยซีทีส (actinomycetes) เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะและความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียและรา แต่ในปัจจุบันถูกจัดให้อยู่ในโปรคาริโอต (prokaryote) โดยในอดีตที่ผ่านมาแนวทางในการจำแนกเชื้อ การบัญญัติศัพท์เฉพาะเพื่อระบุสกุล และชื่อชนิดของจุลินทรีย์นี้มีความสับสนเป็นอย่างมาก มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแอกติโนมัยซีทีสในปี 1875 โดย Ferdinand Cohn ซึ่งอ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) ได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สร้างเส้นใยและมีสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายซึ่งแยกได้จากก้อนน้ำที่พบในท่อน้ำตา (concretions of human lachrymal ducts) ว่า *Streptothrix foersteri* โดย Cohn เน้นว่าจุลินทรีย์นี้มีความคล้ายคลึงกับ *Leptothrix* ต่อมาในปี ค.ศ.1877 Harz อ้างถึงโดย Waksman (1950) ได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค lumpy jaw ในวัวที่ถูกค้นพบโดย Bollinger ว่า *Actinomyces bovis* เหตุที่ตั้งชื่อดังกล่าวเนื่องจากกลุ่มเส้นใยของเชื้อแผ่ออกเป็นรัศมี ซึ่งชื่อ actinomyces นี้มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกคือ *aktis* แปลว่า a ray beam และ *mykes* แปลว่า fungus ซึ่งเมื่อรวมทั้งสองคำสามารถอธิบายได้ถึงลักษณะโคโลนีที่เป็นกลุ่มเส้นใยแผ่ออกเป็นรัศมี (ray fungus) แต่การตั้งชื่อสกุลทั้งสองแบบที่กล่าวมาข้างต้นไม่ได้รับการยอมรับ เนื่องจากชื่อ *Streptothrix* ได้มีการนำไปใช้ตั้งชื่อในจุลินทรีย์อื่นก่อนแล้ว และชื่อ *Actinomyces* ก็ไม่เป็นที่นิยมเช่นกัน

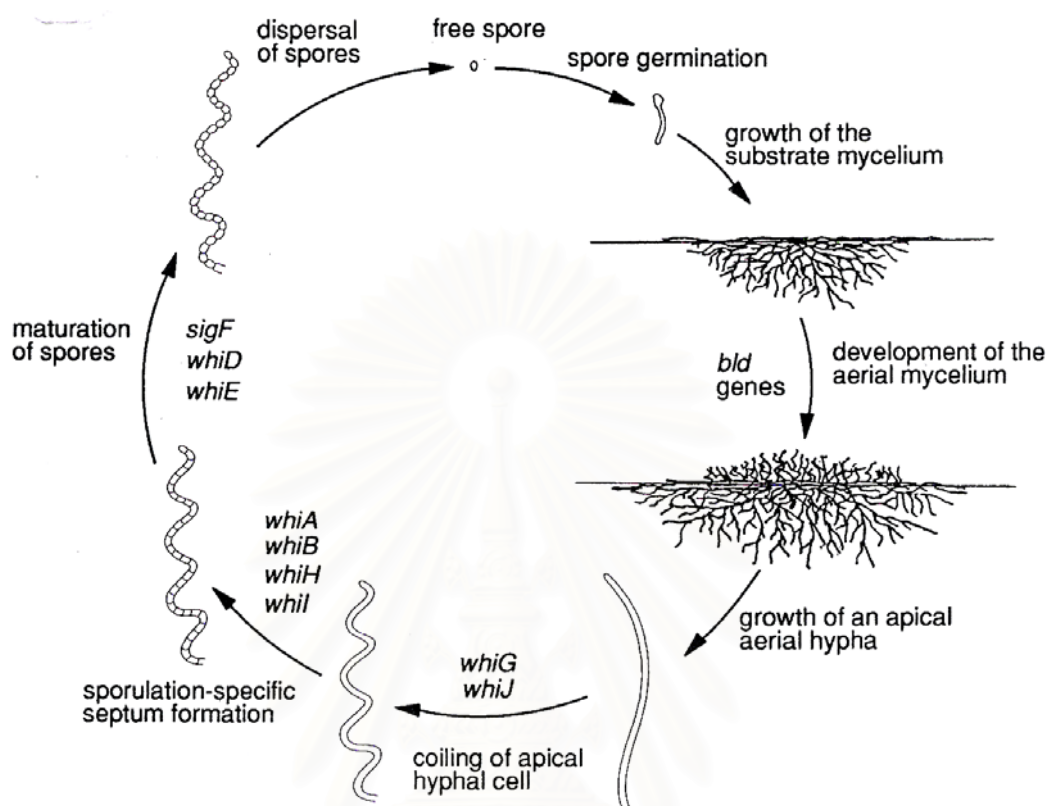
ภายหลังได้มีการตั้งชื่อสกุลของจุลินทรีย์นี้อย่างแพร่หลาย โดยอาศัยจากแหล่งอาหารตามธรรมชาติของจุลินทรีย์ หรือจากลักษณะทางกายภาพแต่ละแบบของจุลินทรีย์นั้นๆ แต่ก็ยังเป็นชื่อที่ไม่สามารถสื่อความหมายครอบคลุมทางด้านสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ได้ครบถ้วน (Waksman, 1950) ต่อมา มีการจัดกลุ่มจุลินทรีย์นี้ออกเป็นหมวดหมู่โดยใช้หลักการจำแนกเดียวกันคือ อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีทีส ได้แก่ ลักษณะเฉพาะเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ลักษณะของรงควัตถุที่สร้างขึ้น การสร้างกลี้นการสร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ การย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ และองค์ประกอบของเซลล์แอกติโนมัยซีทีส เป็นต้น (William และคณะ, 1989) และปัจจุบันได้ใช้วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่มที่สำคัญด้วย (Ueda และคณะ, 1999)

2.2 ลักษณะทั่วไป และแหล่งที่อยู่ของแอกติโนมัยซีทีส

แอกติโนมัยซีทีสเป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างเส้นใยคล้ายลักษณะของรา ติดสีแกรมบวก และมีเปอริเซ็นต์เบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ใน DNA มากกว่า 55 เปอริเซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (Kieser และคณะ, 2000) แม้ว่าแอกติโนมัยซีทีสจะสามารถสร้างเส้นใยได้คล้ายกับรา แต่มีลักษณะต่างๆที่แตกต่างจากราคือ แอกติโนมัยซีทีสไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไม่โตคอนเดรีย (Cross และ Goodfellow, 1973) นอกจากนี้ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทีสยังประกอบด้วยสารจำพวก 2, 6 diaminopimelic acid, mucopeptide (*N*-acetyl glucosamine เชื่อมกับ *N*-acetyl muramic acid), glutamic acid, glycine และ alanine (Waksman และ Henrici, 1974) ต่างจากผนังเซลล์รา ซึ่งประกอบด้วย glucans, mannans และ chitin (Commins, 1958) และเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีสมีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของรา คือมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 2.0 ไมโครเมตร เส้นใยของแอกติโนมัยซีทีสประกอบด้วย เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ โดยมีลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือต่อกันเป็นสายยาวเรียกว่า สายสปอร์ และอาจมีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์ (sporangium)

แอกติโนมัยซีทีสพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ดิน น้ำ อากาศ โคลน มูลสัตว์ และสามารถพบแอกติโนมัยซีทีส อาศัยอยู่ร่วมกันกับพืช โดยในดินพบแอกติโนมัยซีทีสเป็นอันดับสอง รองจากแบคทีเรียชนิดอื่น (Sykes และ Skinner, 1973) เช่น ตัวอย่างดินประเทศตูนิเซีย สามารถแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ US80 ซึ่งสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ และราได้ (Fourati-Ben Fguira และคณะ, 2004) และจากดินแหล่งเดียวกันนี้ยังพบ *Streptomyces caelestis* ซึ่งสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบได้ (Melloui และคณะ, 2003) เคยมีรายงานปริมาณแอกติโนมัยซีทีสในอากาศ ภายในอาคาร ในกรุงริโอเดอ์จาเนโร ประเทศบราซิล มีปริมาณเฉลี่ย 11 CFU/ m³ โดยบริเวณที่มีมากที่สุด พบปริมาณแอกติโนมัยซีทีส 127 CFU/m³ (Grigorevski-Lima และคณะ, 2006) แอกติโนมัยซีทีสบางชนิดสามารถดำรงชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycete) Lixiang Cao และคณะ (2005) สามารถแยก endophytic streptomycete ได้จากรากกล้วย โดยเชื้อส่วนใหญ่จัดอยู่ใน genus *Streptomyces* แอกติโนมัยซีทีสสามารถแยกจากสัตว์ทะเล โดย Fedrica Sponga และคณะ (1999) ได้สำรวจจุลินทรีย์ในทะเล โดยเก็บตัวอย่างจากฟองน้ำ และโคลนใต้ทะเล พบว่า ประมาณครึ่งหนึ่งของจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นแอกติโนมัยซีทีส และอยู่ในสกุล *Streptomyces* โดยที่พบในฟองน้ำ 31% และพบในโคลนใต้ทะเล 50% นอกจากนี้ยังสามารถพบแอกติโนมัยซีทีสจากไลเคนส์ ทั้งในเขตอบอุ่น และเขตร้อน (Ignacio และคณะ, 2005)

2.3 วงชีวิตของแอกติโนมัยซีทีส



รูปที่ 2.1 แสดงตัวอย่างวงชีวิต (life cycle) ของแอกติโนมัยซีทีส *Streptomyces coelicolor* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

วงชีวิตของแอกติโนมัยซีทีสเริ่มจากสปอร์งอกกลายเป็นเส้นใย เส้นใยเริ่มแรกเป็นเส้นใยอาหาร โดยแทรกตัวเข้าไปในพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นมีการสร้างเส้นใยอากาศ และพัฒนาเส้นใยอากาศเพื่อสร้างสปอร์ต่อไป Chater (1993) ได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในระยะต่างๆของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) ซึ่งเป็นแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จัก และมีข้อมูลการศึกษาการทำงานในระดับพันธุศาสตร์มากในระดับหนึ่ง ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในระยะต่างๆ การศึกษาพบว่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม germ tube งอกออกมาจากสปอร์ เจริญโดยการยืดยาวและแตกแขนงบริเวณปลายเส้นใย ได้เส้นใยอาหารจำนวนมาก หลังจากนั้น 2-3 วัน เส้นใยจะเจริญแทงขึ้นมาจากในอาหารออกสู่อากาศกลายเป็นเส้นใยอากาศ ซึ่งถูกควบคุมโดย ยีน *bld* จากนั้นเจริญโดยการยืดยาวบริเวณปลายเส้นใย เมื่อเส้นใยอากาศเจริญเต็มที่ ยีน *whiG* และ *whiJ* ควบคุมให้ปลายเส้นใยม้วนเป็นเกลียว หลังจากนั้น ยีน

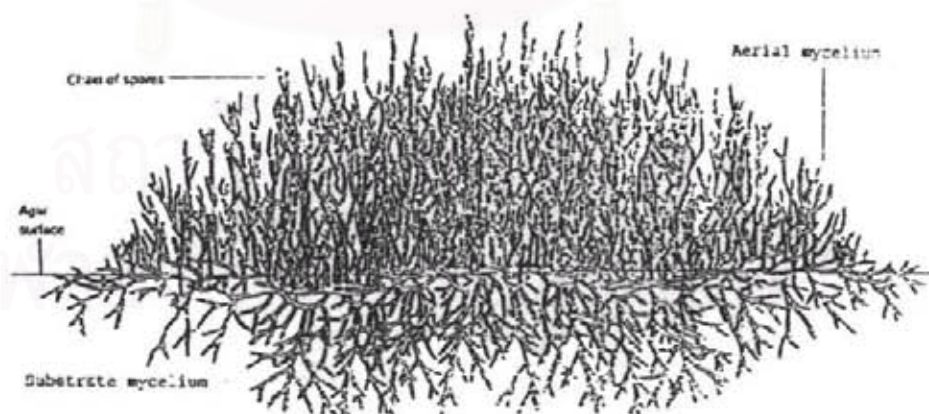
whiA whiB whiH และ *whiI* ควบคุมให้มีการแบ่งเซลล์ที่ปลายเส้นใยโดยการสร้างผนังกันแบ่งเส้นใยออกเป็นส่วน ๆ ยีน *whiD* และ *sigF* ควบคุมให้ผนังเซลล์หนาขึ้นกลายเป็นผนังสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนต่อความแห้งแล้ง และ ยีน *whiE* ควบคุมให้สปอร์มีสีเข้มขึ้น เมื่อสปอร์ที่แก่เต็มที่หลุดออกจากสายสปอร์ และไปตกในบริเวณที่เหมาะสม สปอร์ก็จะงอกเป็นเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีส เป็นการเริ่มต้นวงจรชีวิตต่อไป

การเจริญเติบโตในระยะต่างๆของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) และยีนบางส่วนที่เกี่ยวข้อง แสดงดังรูปที่ 2.1

2.4 ลักษณะวิทยาของแอกติโนมัยซีทีส

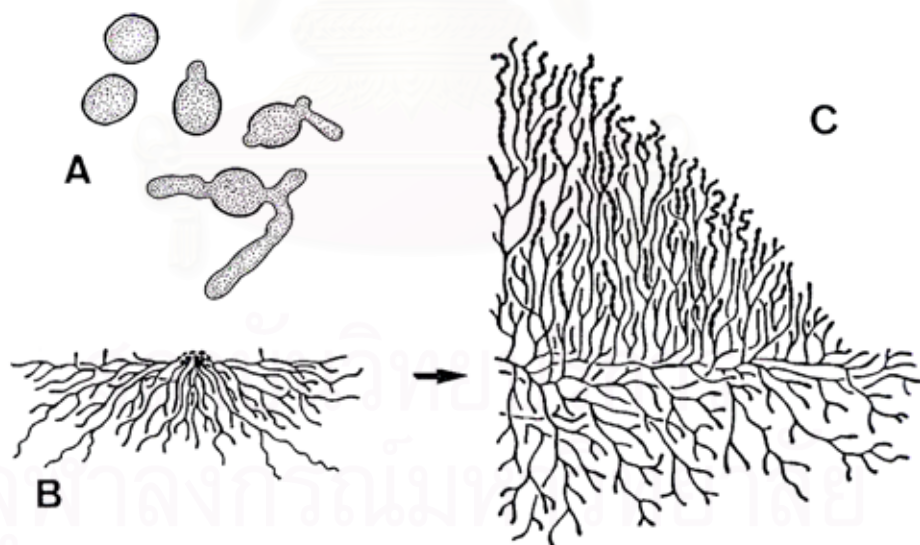
2.4.1 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส

การเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะเกิดจากการสร้างเส้นใยจำนวนมาก จนเกิดการรวมกันเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า โคโลนี (colony) ซึ่งความหมายของโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสจะต่างจากโคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียจะเกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนกัน แต่โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสเกิดจากการรวมกันของเส้นใย เป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีส (Brock และคณะ, 1984)

การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ดังแสดงในรูปที่ 2.3 เริ่มจากหัวเชื้ออาจมาจากสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่แตกหัก หรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม รูป 2.3 (A) เมื่อหัวเชื้อตกลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะพัฒนาเป็นเส้นใยอาหาร รูป 2.3 (B) เมื่อเส้นใยอาหารเจริญเต็มที่แล้วจะแทงผ่านอาหารขึ้นมาเป็นเส้นใยอากาศซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง รูป 2.3 (C) จากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี เช่น สร้างสปอร์โดยการแบ่งตัวของเส้นใยเริ่มจากการสร้างผนังกันภายในเส้นใย โดยทั่วไปเส้นใยมักมีผนังกันชั้นเดียวเพื่อความคงตัวและสร้างเป็นเส้นใยแข็ง (Kalakoutsii และ Agre, 1976) โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสมีหลายลักษณะแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่น หนุน (raised), เรียบแบน (flat) บางครั้งมีลักษณะคล้ายแผ่นหนัง (leather) มีความหลากหลายตั้งแต่นุ่มเหนียวจนถึงแข็ง สีของโคโลนีมีสี ขาว เหลือง ส้ม ชมพู แดง ม่วง ฟ้า เทียว น้ำตาลและดำ ผิวของโคโลนีมีลักษณะเรียบ (smooth) สันนูน (ridged) ขรุขระ (rough) เป็นรอยย่น (wrinkled) เป็นเม็ดเล็ก (granular) เป็นผง (powder) หรือเป็นเกล็ด (squamous) ขนาดของโคโลนีขึ้นอยู่กับ สปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีความแตกต่างตั้งแต่หน่วยมิลลิเมตรจนถึงเซนติเมตร (Miyadoh และคณะ, 1997)



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

2.4.2 โครงสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส

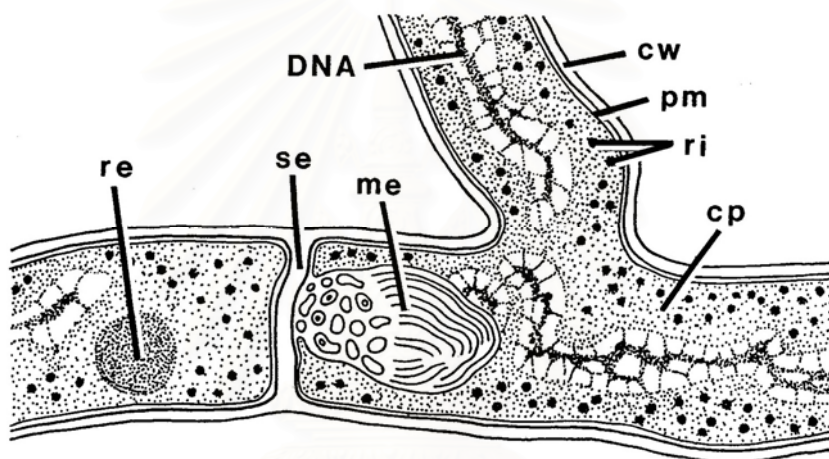
โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสจะมีการสร้างเส้นใย 2 แบบ คือ เส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยเส้นใยทั้ง 2 แบบ จะแสดงลักษณะและหน้าที่ทางชีววิทยาที่แตกต่างกัน

เส้นใยอาหาร คือ เส้นใยที่สร้างในช่วงระยะ vegetative cell การเจริญของเส้นใยชนิดนี้จะมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน โดยจะเจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วงแรกสีของเส้นใยจะเป็นสีขาวหรือครีม แต่เมื่อเจริญเต็มที่ก็จะกลายเป็นสีเหลือง แดง ชมพู ส้ม เขียว หรือ น้ำตาล เมื่อเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะมีการสร้าง germ tube หนึ่ง tube หรือหลาย tube ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นเส้นใยยาวและพัฒนาเป็นเส้นใยที่มีความซับซ้อนยิ่งขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยพบได้ตั้งแต่ 0.2-0.8 ไมโครเมตร บางชนิดมีลักษณะตรงและยาวถึง 600 ไมโครเมตรหรือมากกว่านั้น บางชนิดพบเส้นใยมีลักษณะโค้งและมีการแตกแขนง มีความยาวประมาณ 50-100 ไมโครเมตร (Kalakoutskii และ Agre, 1976) โครงสร้างของเส้นใยจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เชื้อเจริญโดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุณหภูมิและสารเคมีที่มีผลต่อการเจริญ เมื่อเชื้อมีอายุมากเส้นใยชนิดนี้จะมีการแตกหักเป็นชิ้นส่วนสั้น ๆ บางชนิดอาจมีการแตกหักอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูงหรือเจริญอยู่ในภาวะที่เป็นของเหลว (Sykes และ Skinner, 1973)

เส้นใยอากาศ คือ เส้นใยที่สร้างขึ้นด้านบนของเส้นใยอาหาร ลักษณะของเส้นใยอากาศจะแตกต่างกันไปตามกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีส ส่วนประกอบของอาหาร และภาวะของการเลี้ยงเชื้อ เส้นใยอากาศส่วนใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1-1.4 ไมโครเมตร โดยปกติเส้นใยชนิดนี้จะมีลักษณะสั้น ตรง หรือโค้ง และมีการแตกแขนงจำนวนมาก เส้นใยอากาศจะเจริญปกคลุมทั้งโคโลนี เมื่อสังเกตดูจะมีลักษณะคล้ายปมด้าย หรือ ฝุ่นชอล์กอยู่บนเส้นใยอาหาร (Kalakoutskii และ Agre, 1976) การเจริญของเส้นใยอากาศจะเริ่มเจริญมาจากเส้นใยอาหาร โดยเกิดการรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนของเส้นใยกลายเป็นเซลล์เริ่มต้น (initial cell) ซึ่งส่วนใหญ่เริ่มเจริญจากจุดกึ่งกลางของโคโลนี แล้วแผ่ออกไปทุกทิศทางโดยอาศัยกระบวนการแตกหน่อ (sprout) หรือแตกแขนง (branching) และเกิดการแบ่งตัว (subdivision) เพื่อเจริญต่อไปเป็นเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป แอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มสร้างเส้นใยอากาศที่มีลักษณะคล้ายวงแหวนเมื่อมองจากด้านบนของโคโลนี โดยลักษณะดังกล่าวเกิดจากความแตกต่างของเส้นใยที่สร้างและไม่สร้างสปอร์ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปรากฏการณ์นี้คือ การแพร่ของสารเคมีบางชนิด ความเข้มข้นของอุณหภูมิและความชื้น (Waksman, 1950)

โดยทั่วไปแอกติโนมัยซีทีสจะมีการสร้างเส้นใยทั้ง 2 แบบ เช่น ในสกุล *Streptomyces* มีทั้งเส้นใยอาหาร และเส้นใยอากาศ แต่บางชนิดสร้างเฉพาะเส้นใยอาหาร เช่น ในสกุล *Micromonospora* และ *Actinoplanes* ไม่สร้างเส้นใยอากาศ แต่จะสร้างสปอร์และ อับสปอร์ (sporangium) โดยตรงจากเส้นใยอาหาร โดยปกติจะไม่พบผนังกันเซลล์ภายในเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีส แต่อาจพบได้ในช่วงของกระบวนการแตกหักเป็นชิ้นเล็กๆ ของเส้นใย

โครงสร้างภายในเส้นใยประกอบด้วย ผนังเซลล์ซึ่งหนาประมาณ 10-20 นาโนเมตร ภายในมีเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ห่อหุ้มไซโตพลาสซึม ซึ่งภายในมีสายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆ ที่สะสมในเซลล์ ได้แก่ พอลิฟอสเฟต ไขมัน และ พอลิแซ็กคาไรด์ เยื่อหุ้มเซลล์บางแห่งจะพัฒนาไปเป็น mesosomes ตรงบริเวณติดกับผนังเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบภายในเส้นใยอาหารของแอกติโนมัยซีทีส: (cp) ไซโตพลาสซึม, (pm) เยื่อหุ้มเซลล์, (cw) ผนังเซลล์, (me) มีโทโซม, (se) ผนังกันเซลล์, (ri) ไรโบโซม, (DNA) สายดีเอ็นเอ และ (re) แอ่งสะสมสารภายในเซลล์ [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

สปอร์ของแอกติโนมัยซีทีส สปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสมีหน้าที่ในการสืบพันธุ์ เกิดจากการแบ่งออกเป็นส่วนของเส้นใย (Fragmentation) การสร้างและรูปร่างสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของกลุ่มและชนิดได้ สปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสมีหลายรูปร่างหลายลักษณะ 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 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างภายนอก คือ สปอร์เดี่ยว (single spore) สายสปอร์ (spores formed in chains) และสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ (spore formed within sporangia)

1. กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว (monosporous) พบในหลายสกุล การสร้างสปอร์เริ่มจากส่วนปลายสุดของเส้นใยมีการพองตัวออก จากนั้นมีการสร้างผนังกันระหว่างก้านชูสปอร์และส่วนที่พองออกเป็นสปอร์ และสร้างผนังสปอร์หนาขึ้น (Kawamoto, 1989) เช่น ในสกุล *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ (sporophores) เกิดขึ้นบนเส้นใยอาหาร มีการสร้างสปอร์ติดอยู่กับก้านชูสปอร์สั้น ๆ และแยกออกมาเดี่ยว ๆ ปลายสุดของก้านชูสปอร์อาจมีการแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง เช่น ในสกุล *Thermomonospora* มีการแตกแขนงของปลายก้านชูสปอร์ ส่วนในสกุล *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายเส้นใยอากาศ มีก้านชูสปอร์สั้นและไม่แตกแขนง อาจเรียกสปอร์เดี่ยวของทั้ง 3 สกุลข้างต้นว่า aleuriospores เพราะสปอร์เกิดจากปลายเส้นใยมีการโป่งออก (Cross, 1970 อ้างถึงโดย McCarthy, 1989) ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora* *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* แสดงดังรูปที่ 2.5

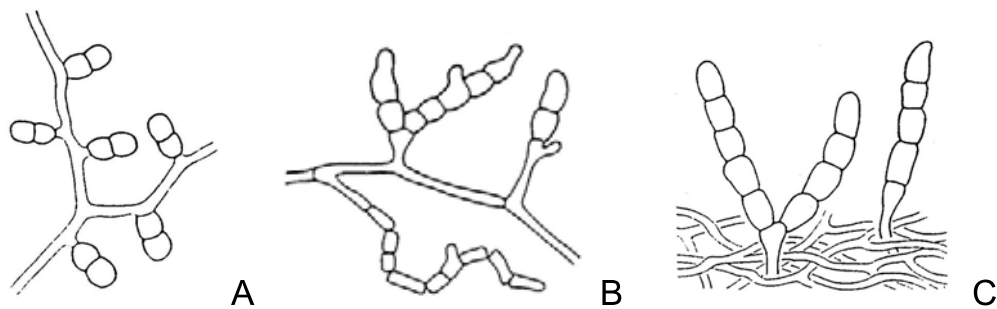


รูปที่ 2.5 แสดงการสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีทีสใน (A) *Micromonospora*, (B) *Thermomonospora*, และ (C) *Saccharomonospora* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

2. กลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสาย ในแอกติโนมัยซีทีสมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก การสร้างสปอร์เป็นสายเกิดจากการที่เส้นใยมีการแบ่งตัวเป็น segments ตามขวาง แต่ละ segments สามารถพัฒนาเป็นสปอร์ได้ สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้โดยพิจารณาถึงความยาวของสายสปอร์หรือจำนวนสปอร์ คือ สปอร์คู่ (bisporous) สปอร์สายสั้น (oligosporous) และสปอร์สายยาว (polysporous)

สปอร์คู่ ประกอบด้วย คู่ของสปอร์เรียงต่อกันตามยาว พบในสกุล *Microbispora* เป็นการสร้างสปอร์ที่พบได้ยาก มีลักษณะเป็นสปอร์คู่ทรงรีมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 ไมโครเมตร อาจเกิดขึ้นบนเส้นใยอากาศโดยตรง หรือเกิดบนก้านชูสปอร์สั้น ๆ ลักษณะสปอร์ของ *Microbispora* แสดงดังรูป 2.5 (A) การสร้างสปอร์ของ *Microbispora* เริ่มจากเส้นใยอากาศแตกหน่อออกทางด้านข้างเป็นกิ่งสั้น ๆ จากนั้นส่วนที่เป็นกิ่งมีการพองออกและสร้างผนังกันตรงกลาง แอคติโนมัยซีทีสที่สร้างสปอร์แบบ bisporous ไม่ได้พบเฉพาะในสกุล *Microbispora* เท่านั้นซึ่งลักษณะสปอร์ 2 สปอร์ ที่เรียงต่อกันตามแนววยาวยังพบใน *Actinomadura echinospora*, *Actinomadura rugatobispora* (Kroppenstedt และคณะ, 1990) อ้างอิงโดย Miyadoh และคณะ, 1990) และจันส์ *Actinobispora* (Jiang และคณะ, 1991)

สปอร์สายสั้น ส่วนมากพบ 7-20 สปอร์ต่อสาย น้อยที่สุดคือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ เช่น *Nocardia brevicatena* สร้างสปอร์สายสั้น ๆ บนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ โดยมีจำนวนสปอร์ 2-7 สปอร์อยู่บนก้านชูสปอร์ สายสปอร์อาจมีการแตกแขนง และมีการแตกหักของเส้นใยอาหารแสดงดังรูป 2.6 (B) *Saccharopolyspora rectivirgula* สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายมีจำนวนสปอร์น้อยกว่า 5 สปอร์บนก้านชูสปอร์ที่อยู่ในบริเวณด้านข้างและปลายของเส้นใย (Korn-Wendisch และคณะ, 1989) ในสกุล *Actinomadura* และ *Microtetraspera* 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 สายสปอร์สั้นอาจมีลักษณะบิดเป็นเกลียวซ้อนติดกัน หรือโค้งงอ และเส้นใยแกนที่มีสายสปอร์จะมีการบิดตัว (Locci และ Schofield, 1989) แสดงดังรูปที่ 2.7 (D) สกุล *Macrospora*, *Microcelobospora* และ *Elytrosporangium* สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ในสายสปอร์สั้น ๆ อยู่บนเส้นใยอาหาร *Sporichthya polymorpha* สร้างสปอร์สายสั้นบนเส้นใยอากาศ ซึ่งสปอร์มีลักษณะเป็นรูปแท่งจนถึงรูปกลม *Catellatospora* สายสปอร์มีลักษณะตรงจนถึงโค้งงอ มีจำนวนสปอร์ 5-30 สปอร์ อยู่บนปลายก้านชูสปอร์ที่แทงขึ้นมาจากอาหาร ก้านชูสปอร์มีขนาดสั้นและอาจแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง (Asano และ Kawamoto, 1986) ดังแสดงในรูป 2.6 (C)

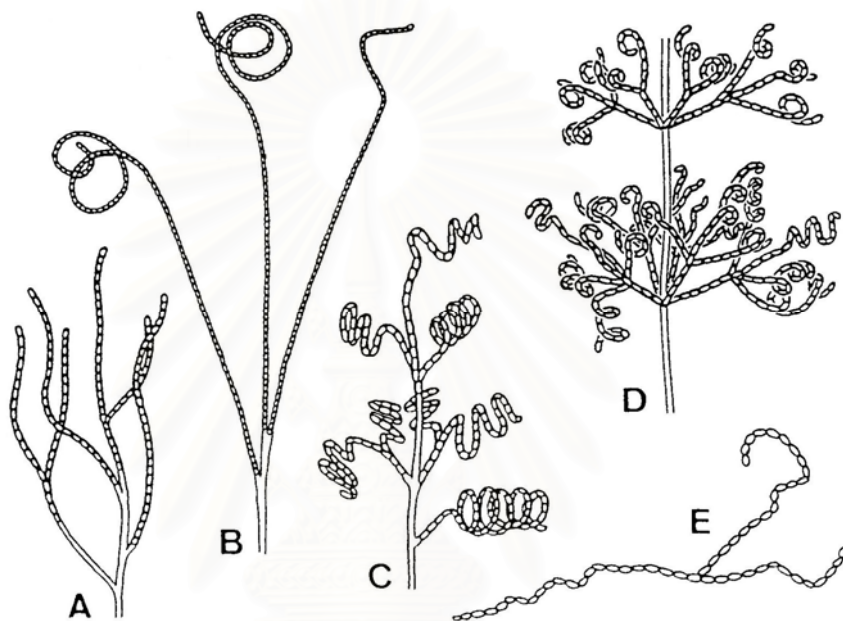


รูปที่ 2.6 แสดงแอกติโนมัยซีทีในกลุ่มที่สร้างสปอร์เป็นสายคู่และสายสั้น A. การสร้างสปอร์แบบ disporous ของ *Microbispora*, B. และ C. การสร้างสปอร์แบบ oligosporous ของ *Nocardia brevicatena* และ *Catellatospora* ตามลำดับ [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

สปอร์สายยาว แอกติโนมัยซีทีที่สร้างสปอร์สายยาวที่สำคัญ คือ สกุล *Streptomyces* มีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวมากกว่า 50 สปอร์ สปอร์ของ *Streptomyces* และแอกติโนมัยซีทีชนิดอื่นที่มีสปอร์สายยาว มักเรียกว่า arthrospores คือมีการสร้างสปอร์เป็นสาย โดยเกิดการแตกหักของเส้นใยที่เกิดจากการแบ่งเป็นส่วน ๆ ของเส้นใยเดิม บริเวณที่เกิดการแตกหักเกิดจากการกระตุ้นโดยยีนแบบสุ่ม ความแตกต่างของลักษณะของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ (Ettlinger และคณะ, 1958 อ้างถึงโดย Pridham และคณะ, 1958 อ้างถึงโดย Korn-Wendisch และ Kutzner, 1992) การสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศของ *Streptomyces* แสดงดังรูปที่ 2.7 (A B C และ D) ซึ่งมีความแตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะคือ

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

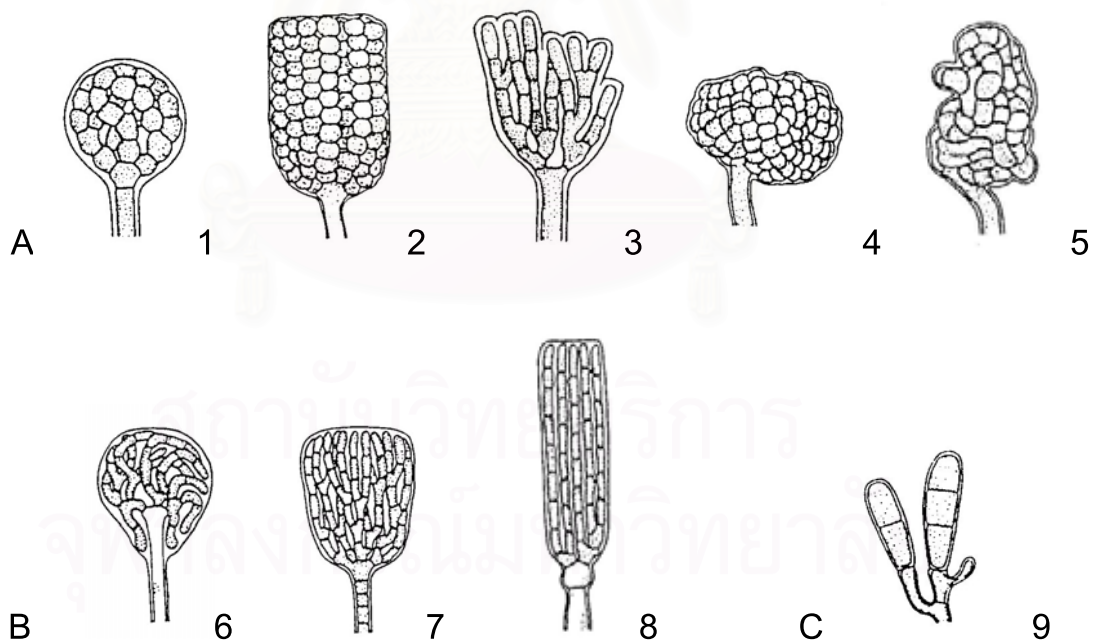
ในบางกรณีสายสปอร์ขดเป็นเกลียวแน่นและมีสปอร์จำนวนมาก ทำให้มีลักษณะเหมือนกับอับสปอร์ หรือ pycnidia เช่นในสกุล *Actinosporangium* และ *Actinopycnidium* ส่วนในสกุล *Pseudonocardia* สร้างสายสปอร์บนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศที่มีลักษณะซิกแซก (zigzag shaped) สกุล *Nocardiosis* สามารถสร้างสายสปอร์บนเส้นใยอากาศได้จำนวนมาก สปอร์อาจเป็นสายตรง งอ หรือซิกแซก (Meyer, 1989 อ้างถึงโดย Miyadoh และคณะ, 1997) แสดงดังรูปที่ 2.7 (E)



รูปที่ 2.7 แสดงการสร้างสปอร์สายยาวของแอกติโนมัยซีทีสใน สกุล *Streptomyces* : (A) *Rectiflexibiles*, (B) *Retinaculiaperti*, (C) *Spira*, (D) *Verticillati* ในเส้นใยอากาศของสกุล *Streptoverticillum* และ *Streptomyces* และ (E) fragmenting branched ในเส้นใยอากาศของสกุล *Nocardiosis* [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

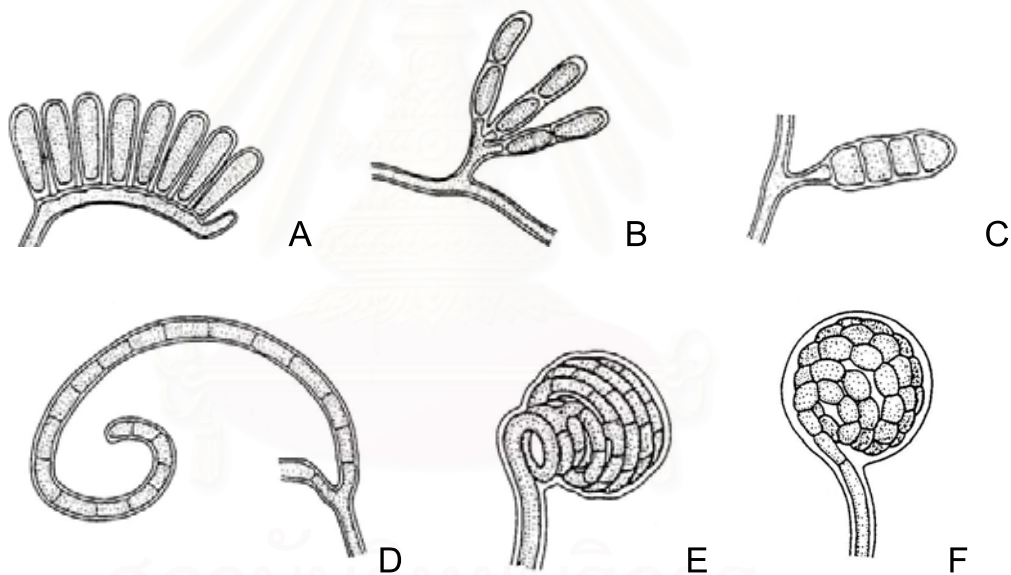
3. กลุ่มที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ มีหลายสกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์ ภายในอับสปอร์มีสปอร์อยู่มากมาย สามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยซีทีสที่สร้างอับสปอร์ได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหารและกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศ

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* อับสปอร์มีลักษณะเป็นทรงกลม หรือเกือบกลมจนถึงไม่เป็นรูปทรงที่แน่นอน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-15 ไมโครเมตร อับสปอร์สร้างขึ้นบนเส้นใยอาหารโดยตรง โดยมีก้านชูอับสปอร์ (sporangiophore) ยื่นขึ้นมาจากเส้นใยอาหาร และที่ปลายสุดของก้านชูอับสปอร์มีการแตกแขนงออกเป็นสายสปอร์หลายสายขดม้วนเป็นก้อนภายในผนังห่อหุ้ม หรือบางสปีชีส์ในสกุล *Actinoplans* สร้างอับสปอร์รูปทรงกระบอก ทรงขวด ขนาดของอับสปอร์เฉลี่ยกว้าง 10 ไมโครเมตร ยาว 15 ไมโครเมตร ภายในอับสปอร์มีสปอร์เป็นรูปแท่งต่อกันเป็นสาย (Couch, 1963 อ้างถึงโดย Vobis, 1987) ลักษณะของอับสปอร์ในสกุล *Actinoplans* แสดงดังรูปที่ 2.8 (A) สกุล *Pilimelia* สร้างอับสปอร์บนผิวของอาหาร อับสปอร์มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก หรือทรงกลม ขนาดประมาณ 10-15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่งเรียงตัวเป็นแถวขนานกัน หรือววนไม่เป็นระเบียบ ลักษณะของอับสปอร์ในสกุล *Pilimelia* แสดงดังรูปที่ 2.8 (B) สกุล *Dactylosporangium* สกุลนี้มีจำนวนสปอร์แบบ oligosporous คือ มีสปอร์ประมาณ 2-5 สปอร์ อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ แสดงดังรูปที่ 2.8 (C) (Vobis และ Kothe, 1985)



รูปที่ 2.8 แสดงรูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอาหาร (A) *Actinoplans* : 1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู่ 4. กิ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง ; (B) *Pilimelia* : 6. ทรงรี 7. รูปทรงระฆัง 8. ทรงกระบอก ; (C) *Dactylosporangium* : 9. รูปทรงกระบอก [ที่มา Atlas of Actinomycetes (1997)]

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอากาศแสดงดังรูปที่ 2.9 ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* สร้างอับสปอร์รูปทรงกระบอก ภายในมีเพียงหนึ่งสปอร์ สกุล *Planobispora* สร้างสปอร์คู่เรียงต่อกันตามยาวอยู่ภายในอับสปอร์ สกุล *Planotetraspora* สร้างอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ เรียงต่อกันเป็นหนึ่งแถว (Runmao และคณะ, 1993) สกุล *Planopolyspora* เมื่อเจริญเต็มที่อับสปอร์จะมีลักษณะเป็นเส้นยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร มีสปอร์จำนวนมากเรียงต่อกันเป็นแถวเดียวอยู่ภายในอับสปอร์ (Petrolini และคณะ, 1993) สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากอับสปอร์เป็นรูปทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเส้นใยพัฒนาเป็นสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายยาวขดม้วนอยู่ภายในอับสปอร์ สกุล *Spirillospora* สร้างอับสปอร์เป็นรูปทรงกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-24 ไมโครเมตร สปอร์เรียงตัวกันเป็นสายและขดเป็นวง ภายในวงของสายสปอร์มีการแตกแขนงของสายสปอร์ สปอร์มีลักษณะเป็นรูปแท่ง และโค้งงอ (Williams และ Sharples, 1976 อ้างถึงโดย Petrolini และคณะ, 1992)



รูปที่ 2.9 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)]

2.5 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีส

โดยทั่วไปข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีส คือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะรูปร่างและสีของเส้นใยอากาศ, เส้นใยอาหาร, พื่นผิวของสปอร์, รูปแบบของสายสปอร์และอับสปอร์, หรือการสร้างรงควัตถุ (diffusile pigment) และการสร้างรงควัตถุเมลานิน นอกจากนี้ลักษณะทางเคมีของเซลล์ คือ องค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย dibasic amino acid สามารถแบ่งผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีทีสออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ I - IV โดยแต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันไปตามกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ 3 ของสายเตตระเปปไทด์ (tetrapeptide) และไกลซีนในอินเตอร์เปปไทด์บริดจ์ (interpeptide bridges) และยังรวมถึงการวิเคราะห์รูปแบบน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ คือ อะราบินอส (arabinose) ฟรุคโตส (fucose) กาแลคโทส (galactose) เมดูโรส (madurose) และ ไชโลส (xylose) โดยอ้างอิงวิธีการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams และคณะ, 1989) แต่ในระยะหลังวิธีทางอณูพันธุศาสตร์โดยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียถึงระดับสกุลเข้ามามีบทบาทมากขึ้น ทำให้การจัดจำแนกแบคทีเรียเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพกว่าวิธีดั้งเดิม Rintala และคณะ (2001) ได้พัฒนา primer 3 ตัว ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธีพีซีอาร์ บริเวณตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงกับยีนประมวลรหัส 16S rRNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบ *Streptomyces* ต่อมา Lanoot และคณะ (2005) สามารถตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอภายในกลุ่ม streptomycetes และจัดเป็นกลุ่มต่างๆ 59 กลุ่ม จากเชื้อทั้งหมด 463 ตัว โดยใช้เทคนิค RFLP ซึ่งจำแนกความแตกต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอในบริเวณตำแหน่ง 16S-ITS (16S-ITS RFLP finger printing) ทำให้สามารถตรวจสอบความแตกต่างของ streptomycetes ชนิดต่างๆ ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ร่วมด้วย ทำให้ทราบถึงความใกล้เคียงกันในทางพันธุกรรมมากขึ้น และเป็นเหตุผลนำมาซึ่งการแก้ไขการจัดกลุ่มโดยย้ายบางสกุล (Genus) ในวงศ์ (Order) เดิมไปอยู่ในวงศ์ใหม่แม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะแตกต่างกันก็ตาม

จากเกณฑ์ข้างต้น เมื่อรวบรวมข้อมูลที่บ่งบอกถึงลักษณะเฉพาะต่างๆ แล้วนำมาวิเคราะห์ จัดกลุ่มสามารถจำแนกแอกติโนมัยซีทีที่สกัดได้เป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

1. นอคาร์ดิโอฟอร์มแอกติโนมัยซีทีส (Nocardioform actinomycetes)

แอกติโนมัยซีทีสกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลาย ส่วนใหญ่จะสร้างเส้นใยที่เป็นสายท่อนสั้นๆ บางกลุ่มมีการสร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เป็นสาย การจัดจำแนกสกุล ของ นอคาร์ดิโอฟอร์มแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มนี้ จำแนกตามองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ การมีกรด ไมโคลิก (mycolic acid) และลักษณะอื่นๆ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่

- 1.1 แบคทีเรียที่มีกรดไมโคลิก (Mycolic acid-containing bacteria)
- 1.2 สกุลชูโดร์นอคาร์เดีย (*Pseudonocardia*) และสกุลใกล้เคียง
- 1.3 สกุลนอคาร์ดิโอดีส (*Nocardiodes*) และเทอราแบคเตอร์ (*Terrabacter*)
- 1.4 สกุลโปรไมโครโมโนสปอรา (*Promicromonospora*) และสกุลใกล้เคียง

2. สกุลที่มีมัลติโลคูลาร์สปอร์แรงเกีย (Genera with multilocular sporangia)

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

3. แอกติโนแพลนนิทีส (Actinoplanetes)

เป็นกลุ่มที่มีเส้นใยอากาศน้อย หรืออาจไม่มีเลย มี meso-DAP และไกลซีนเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบอาราบินอส และไซโลสภายในเซลล์ แบ่งออกเป็นกลุ่มที่สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ภายในอับสปอร์ ได้แก่ แอกติโนแพลนนิทีส (*Actinoplanetes*) แอมพูลาเลลา (*Ampullariella*) แดกทิลอสปอร์แรงเจียม (*Dactylosporangium*) และพิลิมิเลีย (*Pilimelia*) กลุ่มที่สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ ไมโครโมโนสปอรา (*Micromonospora*) สร้างสปอร์เดี่ยว และแคเทลลาโทสปอรา (*Catellatospora*) สร้างสปอร์เป็นสาย

4. สเตรปโตมัซีส (Streptomycetes) และสกุลใกล้เคียง (related genera)

แอกติโนมัยซีทีสกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลาย โดยทั้งหมดมี L-DAP และไกลซีนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แบ่งออกเป็น กลุ่มที่สร้างเส้นใยอากาศ และสายสปอร์ยาว ได้แก่ สเตรปโตมัซีส (*Streptomyces*) และ สเตรปโตเวอร์ติซิลลัม (*Streptovorticillum*) สำหรับ

กลุ่มอื่นๆ ซึ่งสร้างเส้นใยอากาศน้อย หรือไม่สร้าง จะมีรูปแบบการสร้างสปอร์ที่หลากหลาย ได้แก่ อินทราสปอแรงเจียม (*Intrasporangium*) ไคเนอสปอเรีย (*Kineosporia*) และสปอริธยา (*Sporichthya*)

5. กลุ่มแมคูโลมัยซิส (*Maduromycetes*)

กลุ่มนี้ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP มีน้ำตาล madurose เป็นองค์ประกอบของเซลล์ สมาชิกในวงศ์นี้มีความหลากหลาย ใช้จำนวนสปอร์ การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ และการสร้างสายสปอร์บนก้านชูสปอร์เป็นเกณฑ์ในการแบ่งสกุล สมาชิกในวงศ์นี้ส่วนใหญ่สร้างสายสปอร์หรืออับสปอร์บนเส้นใยอากาศ สกุลที่สร้างสปอร์สายสั้น ๆ และสปอร์ไม่เคลื่อนที่ ได้แก่ *Microbispora* (2 สปอร์) และ *Microtetraspora* (4 สปอร์) สกุลที่สร้างสปอร์ในอับสปอร์และสปอร์เคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Planobispora* (สองสปอร์เรียงต่อกันตามยาวในอับสปอร์รูปกระบอก) และ *Planomonospora* (หนึ่งสปอร์อยู่ในอับสปอร์รูปทรงกระบอก) สกุล *Streptosporangium* สร้างสปอร์เป็นสายจำนวนมากเรียงต่อกันขดเป็นวงอยู่ในอับสปอร์ทรงกลม สปอร์ไม่เคลื่อนที่

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

กลุ่มนี้สามารถสร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์ ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP แต่ไม่มีกรดอะมิโน หรือน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบในเซลล์ที่ดูย่อย แบ่งออกเป็น กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว ได้แก่ เทอร์โมโมโนสปอรา (*Thermomonospora*) กลุ่มที่สร้างสายสปอร์ ได้แก่ แอกติโนซินีมา (*Actinosynnema*) และ สเตรปโตออลไคทิส (*Streptoalloteichus*)

7. เทอร์โมแอกติโนมัยซีทีส (*Thermoactinomycetes*)

กลุ่มนี้มีเพียงสกุลเดียว คือ เทอร์โมแอกติโนมัยซีทีส (*Thermoactinomyces*) สามารถสร้างเส้นใยอากาศได้ สร้างสปอร์เดี่ยวแบบเอนโดสปอร์ (endospores) ทั้งภายในเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ ทุกชนิดเจริญในอุณหภูมิสูง ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP แต่ไม่พบกรดอะมิโนหรือน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบในเซลล์

8. กลุ่มอื่น ๆ

เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มอื่นๆได้ โดยทุกชนิด สามารถสร้างเส้นใยอากาศ และสร้างสปอร์เป็นสายแบ่งออกเป็นสกุล *Kitasatosporia Glycomyces Kibdelosporangium* และ *Saccharothix*

2.6 ความต้องการสารอาหารของแอกติโนมัยซีทีส

แอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มมีความต้องการสารอาหารแตกต่างกันอย่างมาก บางกลุ่มสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน แต่บางกลุ่มเจริญได้เฉพาะอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อน นอกจากนี้แอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มยังสามารถปรับตัวให้ใช้สารอาหารได้หลากหลายอีกด้วย ปริมาณการสร้างเซลล์และผลิตสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีทีสจะขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของสารอาหารที่เชื้อได้รับ ดังเคยมีรายงานไว้โดย Gesheva และคณะ (2004) ซึ่งได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่ม nonpolyenic macrolide ใน *Streptomyces hygroscopicus* 111-81 พบว่า การใช้แล็กโทส หรือ กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมจากแหล่งเดิมคือกากถั่วเหลือง เติมแร่ธาตุที่จำเป็น คือแมงกานีส คอปเปอร์ และซัลเฟอร์ ในปริมาณน้อย ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเป็น 6 เท่า จากอาหารสูตรเดิม

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

แอกติโนมัยซีทีสสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ทั้งสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนและไม่ซับซ้อน โดยสารอินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ กรดอินทรีย์ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส โปรตีน โพลีเปปไทด์ และกรดอะมิโน เป็นต้น แอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มสามารถใช้สารประเภทอื่นได้ เช่น ไขมัน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน สารประกอบที่มีวงเบนซีน หรือสารที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ลิกนิน แทนนิน และยาง เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยแอกติโนมัยซีทีสจะเลือกแหล่งอาหารที่ใช้ได้ง่ายมาใช้ในการเจริญก่อน โดยแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ได้แก่ กลูโคส มอลโตส เดกซ์ตริน แป้ง กลีเซอรอล กรดอินทรีย์ และโปรตีน รองลงมาได้แก่ ซูโครส และน้ำตาลประเภทอื่น ๆ นอกจากนี้ ออการ์ ยังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในแอกติโนมัยซีทีสบางชนิด เช่น *Streptomyces coelicolor* (Cohn, 1943)

โดยทั่วไปแอกติโนมัยซีทีสมักใช้โปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน มากกว่าคาร์โบไฮเดรต ซึ่งทดสอบได้ด้วยการเติมโปรตีน หรืออนุพันธ์ของโปรตีน เช่น เปปโตน และเติมกลูโคส หรือคาร์โบไฮเดรตประเภทอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน พบว่าแอกติโนมัยซีทีสจะใช้โปรตีนเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนก่อน โดยจะขับของเสียออกมาในรูปของแอมโมเนียจำนวนมาก (Waksman และ Lomaniz, 1925)

คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วยังมีบทบาทเป็นสารบัฟเฟอร์อีกด้วย เนื่องจากถ้ามีเฉพาะโปรตีนหรืออนุพันธ์ของ

โปรตีนทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว จะทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียอย่างรวดเร็วจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีภาวะเป็นด่างสูงเกินกว่าที่เชื้อจะเจริญได้ จากปัจจัยดังกล่าวทำให้กลูโคสเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส แม้ว่าในอาหารจะมีโปรตีนหรือเปปโตินอยู่แล้วก็ตาม 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)

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

แอกติโนมัยซีทีสส่วนใหญ่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ได้ ดังนั้นโปรตีน เปปโติน หรือกรดอะมิโน จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ รองลงมาคือไนเตรท และเกลือของแอมโมเนียม ตามลำดับ โดยไนเตรทถูกจัดให้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่าเกลือของแอมโมเนียม เนื่องจากไนเตรททำให้เกิดประจุลบ แต่เกลือของแอมโมเนียมจะให้ประจุบวก ซึ่งไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส นอกจากนี้ยังพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตจะถูกใช้ได้ดีกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ (Waksman และ Lomanitz, 1925) แอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มสามารถย่อยสลายโปรตีนได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น บางกลุ่มสามารถย่อยสลายเจลาติน บางกลุ่มสามารถสร้างเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic) ซึ่งจะตกตะกอนโปรตีนในนมได้ (Sykes และ Skinner, 1973)

2.6.3 แร่ธาตุ

แอกติโนมัยซีทีสแต่ละกลุ่มสามารถใช้แร่ธาตุ ได้แก่ ฟอสฟอรัส โบแทสเซียม และแมกนีเซียมได้ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ในขณะที่ความต้องการซัลเฟอร์ แคลเซียม และเหล็กนั้นยังไม่ได้รับการยืนยันที่แน่นอน แต่พบว่าแอกติโนมัยซีทีสบางชนิดสามารถเจริญได้ดีเมื่อเติมธาตุเหล็กลงไปในการเลี้ยงเชื้อ และมีรายงานว่าสังกะสีมีบทบาทสำคัญในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสบางกลุ่มด้วย แร่ธาตุเหล่านี้แม้จะต้องการในปริมาณน้อย แต่ก็เป็นสิ่งที่ไม่ได้สำหรับการเจริญของเชื้อ (Pridham และ Gottlieb, 1948)

2.7 การสร้างกลิ่นและการสร้างรงควัตถุของแอกติโนมัยซีทีส

2.7.1 การสร้างกลิ่น

การสร้างกลิ่นเฉพาะของแอกติโนมัยซีทีส สามารถนำมาให้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกแอกติโนมัยซีทีส ได้เช่นเดียวกัน โดยกลิ่นที่สร้างขึ้นอาจมีกลิ่นคล้ายกลิ่นอับ กลิ่นดิน หรือกลิ่นผลไม้ ในปี 1895 Rullmann อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) ได้ศึกษารายละเอียดของกลิ่นที่ถูกสร้างขึ้นโดยแอกติโนมัยซีทีส พบว่าสารที่ทำให้เกิดกลิ่นที่สร้างจาก *Actinomyces ordorifer* สามารถละลายได้ในอีเทอร์ ต่อมาในปี 1947 Thaysen อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) อธิบายว่าสารดังกล่าวคือ สารจำพวกเอมีน

2.7.2 การสร้างรงควัตถุ

การสร้างรงควัตถุก็เป็นอีกเกณฑ์หนึ่งในการจำแนกแอกติโนมัยซีทีส รงควัตถุที่สร้างขึ้นจะมีความหลากหลายขึ้นกับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจำแนกตามลักษณะของโทนสี เช่น สีน้ำเงิน ม่วง แดง ชมพู เหลือง เขียว น้ำตาล หรือ ดำ ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเก็บอยู่ในสายใย โดยรงควัตถุจะเกิดจากปฏิกิริยาของไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งออกซิไดส์สารประกอบอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แอกติโนมัยซีทีส บางกลุ่มสามารถสร้างรงควัตถุได้มากกว่า 1 ชนิด เช่น *Actinomyces violaceus-ruber* และ *Actinomyces tricolor* รงควัตถุโทนสีน้ำตาลจะเป็นรงควัตถุที่พบมากที่สุด โดยเฉพาะเมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยสารอินทรีย์ (Tresner และ Backus 1963)

ความหลากหลายของรงควัตถุขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุของเชื้อ ปริมาณอากาศ และอุณหภูมิ นอกจากนี้กรดและด่างก็ยังมีผลต่อสีของรงควัตถุอีกด้วย โดยในปี 1908 Muller อ้างอิงถึงโดย Shirling และ Gottlieb (1966) รายงานว่าพีเอชมีผลต่อการสร้าง รงควัตถุของ *S. coelicolor* คือเมื่ออยู่ในภาวะเป็นกรด รงควัตถุจะเป็นสีแดง และจะกลายเป็นสีน้ำเงิน เมื่อมีภาวะเป็นด่าง

2.8 การแยกและคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีส

แอกติโนมัยซีทีสส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในดิน มักมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารในธรรมชาติ สามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อน จึงเจริญได้ช้ากว่าแบคทีเรียอื่นๆ การคัดแยกแอกติโนมัยซีทีสจากธรรมชาติ จึงต้องมีวิธีการจำเพาะที่เหมาะสมในการแยกเชื้อจากแหล่งที่ต่างกัน การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากธรรมชาติ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การทำ Pretreatment เพื่อกำจัดจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ การอบหรือต้มด้วยความร้อน การใช้สารเคมี หรือการใช้ไวรัสเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์บางชนิด (Kurtboke และคณะ, 1992) และการใช้อาหารที่จำเพาะต่อการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสแต่ละชนิด (selective media) เช่น การเติมโคตินินในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นการเจริญของแอกติโนมัยซีทีส (Grynder และคณะ, 2003) หรือการเติมสารปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ การแยกแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มต่างๆมีวิธีการแยกที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแอกติโนมัยซีทีสที่ต้องการแยก และแหล่งที่มาของเชื้อ ดังตัวอย่างรายงานต่อไปนี้

Hayakawa และคณะ (1991) แยก *Streptosporangium*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora* และ *Microbispora* จากดิน โดยแต่ละสกุลทำ pretreatment แตกต่างกันคือ *Streptosporangium* ทำการแยกโดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม benzethonium chloride (BC) 0.01% นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L และ leucomycin 1 mg/L สกุล *Dactylosporangium* แยกโดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม benzethonium chloride (BC) 0.03% นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV Agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L และ tunicamycin 10 mg/L สกุล *Micromonospora* แยกโดยนำดินตัวอย่างมาตากลมแล้วเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.5 % นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV Agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L และ tunicamycin 20 mg/L สกุล *Microbispora* แยกโดยนำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติม phenol 1.5 % และ chlorhexidine gluconate 0.03% นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร HV Agar ที่ผสม nalidixic acid 20 mg/L

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

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

Hallmann และคณะ (1997) แยกแอกติโนมัยซีทีสที่อาศัยอยู่ในพืช (endophytic actinomycete) โดยการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ จากนั้น ล้างให้สะอาดและบดด้วยโกร่งที่ปราศจากเชื้อ นำส่วนที่ได้จากการบดมากรองผ่านสำลี แล้วเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ และเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะ

Suzuki และคณะ (1999) แยกสกุล *Sporichthya* จากดิน สกุลนี้มีการสร้าง zoospore นำดินตัวอย่างมาอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อลดจำนวนของแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่แอกติโนมัยซีทีสจากนั้นเติมสารละลาย 0.1% นมพร่องไขมัน (skim milk) ใน 10 mM MOPs (morpholinepropanesulfonic acid) pH8 ในดินที่อบแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที เจือจางสปอร์ใน 0.85% NaCl นำสารละลายสปอร์ เกลี่ยบนอาหาร Humic acid-Vitamin Agar (HVG)

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

Suzuki และคณะ (2001) แยกสกุล *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 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แยกสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000xg เป็นเวลา 10 นาที วิธีนี้สามารถแยกสกุล *Planomonospora* ได้ 246 สายพันธุ์จากดินตัวอย่างทั้งหมด 1,200 ตัวอย่าง

Boudjella และคณะ (2005) แยกสกุล *Streptosporangia* จากดินในทะเลทรายซาฮารา (Saharan) โดยการนำดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปิเปตสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ 0.2 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Citin-B Vitamins Agar ที่เติม kanamycin 25 ug/ml และ cycloheximide 50 ug/ml

Zitouni และคณะ (2005) แยกสกุล *Nocardiosis* และ *Saccharothrix* จากดินในทะเลทรายซาฮารา (Saharan) โดยนำดินมาเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วปิเปตสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ มาเกลี่ยลงบนผิวหน้าของ Humic-Vitamin-B- Agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin 10 ug/ml, หรือ erytromycin 10 ug/ml และ chloramphenicol 25 ug/ml

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9 ประโยชน์ของแอกติโนมัยซีทีส

ประโยชน์ที่สำคัญของแอกติโนมัยซีทีส ได้แก่การนำไปใช้ในทางการแพทย์ คือการผลิตสารปฏิชีวนะ และสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคนิดใหม่ๆต่อไป นอกจากนี้ แอกติโนมัยซีทีสยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีกหลากหลาย ครอบคลุมด้านอุตสาหกรรม การเกษตร และสิ่งแวดล้อม ดังตัวอย่างงานวิจัยต่างๆ ดังนี้

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

Oliveira และคณะ (2005) ใช้ *Frankia* spp. ซึ่งเป็นแอกติโนมัยซีทีส (actinorhiza) จัดเป็นแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถอาศัยอยู่ในรากพืช และตรึงไนโตรเจนได้ นำมาติดเชื้อร่วมกับราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) *Glomus intraradices* ส่งผลทำให้พืช *Alnus glutinosa* ลดสภาวะความเครียดในดินที่มีความเป็นด่างสูง และเป็นการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต โดยพืชที่มีการใส่เชื้อสองชนิดนี้ร่วมกันจะมีพื้นที่ผิวใบมากขึ้น รากยาวขึ้น และมีมวลมากกว่าพืชที่ไม่มีการใส่เชื้อ หรือใส่เชื้อเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง งานวิจัยชิ้นนี้มีประโยชน์ในการช่วยฟื้นฟูสภาพพืชในดินที่เป็นด่างสูง

Goshev และคณะ (2005) แยกเอนไซม์ทนร้อน 2 ชนิด ที่มีสมบัติในการย่อยโปรตีนคอลลาเจนโดยได้จากแอกติโนมัยซีทีส 2 ชนิด คือ *Microbispora* และ *Thermoactinomyces* เมื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับ Clostidiopeptidase A พบว่า เป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติคล้าย collagenase (collagenase-like enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องหนัง และขนสัตว์ เพราะจะทำให้ขน และหนังอ่อนนุ่มลง

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

El-tarabily และ Sivasithampam (2006) ได้ศึกษา และรวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้องกับแอกติโนมัยซีทีสที่ไม่ใช่สกุล *Streptomyces* (Non-streptomycete actinomycetes) ที่มีความสามารถผลิตสารปฏิชีวนะต่อราที่ก่อโรคพืชในดิน เพื่อใช้เป็นการควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) อีกทั้งยังเป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoter)

Benimeli และคณะ (2007) คัดแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ M7 จากโคลนในแหล่งน้ำเสีย ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลาย lindane (γ -hexachlorocyclohexane) ได้ lindane เป็นสารฆ่าแมลงที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงมักตกค้าง และสะสมในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ พืช สัตว์ อาหาร รวมถึงในเนื้อเยื่อไขมันของมนุษย์ งานวิจัยชิ้นนี้เป็นฉบับแรกที่รายงานการย่อยสลาย lindane ของจุลินทรีย์ โดยไม่ต้องสะสมไว้ในเซลล์ หรือต้องเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสารอื่นก่อนการย่อยสลาย

จากรายงานดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า แอคติโนมัยซีทีสเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจในการศึกษา และประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ อีกกลุ่มหนึ่ง

2.10 สารปฏิชีวนะ (Antibiotics)

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ โดยส่วนมากจะเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีมวลโมเลกุลต่ำ สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ด้วยความเข้มข้นน้อย ๆ (Demain, 1999) โดยจะไม่รวมถึงสารสกัดจากพืช หรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ เพราะสารเหล่านี้ใช้ความเข้มข้นสูงในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ ปัจจุบันสารปฏิชีวนะยังมีแบบที่เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้สารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากธรรมชาติเป็นต้นแบบ การทำงานของสารปฏิชีวนะแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbistatic และฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbicidal ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbistatic ร่างกายจะกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้ระบบการของร่างกายคือ phagocytosis การผลิตแอนติบอดี การผลิต interferon เมื่อมีการติดเชื้อจากไวรัส และ กลไกการปฏิเสธของลำไส้ โดยการเกิดอาการท้องเสีย อาเจียน ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbicidal จะฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการทำให้เซลล์แตก แต่ร่างกายยังคงได้รับผลจากสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น (Edward, 1980)

ลักษณะของสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการใช้เป็นยารักษาโรค จะต้องมีความสมบัติต่างๆ ดังนี้ (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544)

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

2.10.1 กลไกการทำงานของสารปฏิชีวนะ

การทำงานของสารปฏิชีวนะ มีทั้งแบบยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งการทำงานของสารปฏิชีวนะสามารถแบ่งกลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์ได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544)

1. กลุ่มที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ เพนิซิลลิน (penicillin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) ไสโคลเซอร์ลิน (cycloserine) แวนโคไมซิน (vancomycin) และบาซิตราซิน (bacitracin)
2. กลุ่มที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ โพลิมิกซิน (polymixin) แกรมิซิดิน (gramicidins) ไทโรซิดิน (tyrocidin) นิสเตติน (nystatin) และแอมโฟเทอริซิน (amphotericin)
3. กลุ่มที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน ได้แก่ สเตรปโตไมซิน (streptomycin) กานาไมซิน (kanamycin) นีโอไมซิน (neomycin) เตตราไซคลิน (tetracycline) ออริโอไมซิน (aureomycin) เทอราไมซิน (terramycin) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) อิริโทรไมซิน (erythromycin)
4. กลุ่มที่ยับยั้งการทำงานของกรดนิวคลีอิก ได้แก่ ไรแฟมพิซิน (rifampicin) แอกติโนมัยซิน (actinomycin) ไมโตไมซิน (mitomycin) กรีสซิโอฟลูวิน (griseofluvin)
5. กลุ่มที่ยับยั้งระบบเอนไซม์ที่จำเพาะ ได้แก่ ซัลโฟนาไมด์

2.10.2 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีส

ปัจจุบันสารปฏิชีวนะในตลาดยาจำนวน 38 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่สารตั้งต้นมาจากธรรมชาติ 4 เปอร์เซ็นต์ มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยให้มีโครงสร้างเหมือนกับสารจากธรรมชาติ 31 เปอร์เซ็นต์ มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี และ 26 เปอร์เซ็นต์ ได้มาจากธรรมชาติ ซึ่งในจำนวนนี้มีแอกติโนมัยซีทีสเป็นแหล่งที่สำคัญของสารปฏิชีวนะ โดย 65-75 เปอร์เซ็นต์ ของสารปฏิชีวนะที่ได้มาจากธรรมชาติและใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันผลิตจากแอกติโนมัยซีทีส รองลงมาคือราและแบคทีเรีย ตามลำดับ และในจำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอกติโนมัยซีทีส 80 เปอร์เซ็นต์ ผลิตจาก *Streptomyces* ดังตารางที่ 2.1 (Krsek และคณะ, 2000) และ (Kieser และคณะ, 2000) นอกจากนั้นผลิตจากแอกติโนมัยซีทีสที่พบได้ยาก ดังตารางที่ 2.2 (El-Tarably และ Sivasithamparam, 2005)

ตารางที่ 2.1 แสดงสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีส

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	การยับยั้ง
<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>	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</i> spp.	Actinomycin D	เซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

แบคทีเรียชนิดที่	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	การยับยั้ง
<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)

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	การยับยั้ง
<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

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	เอกสารอ้างอิง
<i>Actinoplanes</i> sp	Xanthone	Cooper และคณะ (1992)
<i>Actinoplanes</i> sp	Sch 54445	Min และคณะ (1997)
<i>Actinoplanes brasiliensis</i>	A/672	Palleroni (1989)
<i>Actinoplanes caeruleus</i>	Heptaene	Palleroni (1989)
<i>Actinoplanes deccanensis</i>	Lipiarmycin	Palleroni (1989)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	เอกสารอ้างอิง
<i>Actinoplanes ianthinogenes</i>	Naphthoquinone	Palleroni (1989)
<i>Actinoplanes ferrugineus</i>	L-azetidine-2-carboxylic acid	Palleroni (1989)
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	5-azacytidine	Palleroni (1989)
<i>Actinoplanes philippinensis</i>	Macrocyclic lactone	Palleroni (1989)
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Lipoglycopeptide	Carelli และคณะ (1995)
<i>Actinoplanes 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>Micromonospora carbonacea</i>	Everninomicin	Kawamoto (19890)
<i>Micromonospora coerulea</i>	Glutarimide	BeomSeok และคณะ (1999)
<i>Micromonospora echinospora</i>	Gentamicin	Kawamoto (1989)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

แอกติโนมัยซีทีส	สารปฏิชีวนะที่สร้าง	เอกสารอ้างอิง
<i>Micromonospora echinospora</i>	Hazimicins	Marquez และคณะ (1983)
<i>Micromonospora halophytica</i>	Halomicin	Kawamoto (1989)
<i>Micromonospora inositola</i>	XK-41	Kawamoto (1989)
<i>Micromonospora 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)

2.10.3 กลุ่มของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีส

Sneider (2005) ได้จัดจำแนกสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก แอกติโนมัยซีทีสเป็นกลุ่มต่างๆ ตามลักษณะโครงสร้างพื้นฐาน ดังนี้

1. **กลุ่ม Streptomycin และ Aminoglycoside กลุ่มอื่นๆ** ได้แก่ streptomycin neomycin kanamycin lincomycin gentamycin เป็นต้น สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย amino sugar ที่เชื่อมกันแบบ glycoside linkage ออกฤทธิ์แบบ bacteriocide โดยรบกวนการแปลรหัสของ mRNA ในไรโบโซมทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

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

3. **กลุ่ม Tetracycline** ได้แก่ aureomycin (chlortetracycline) oxytetracycline เป็นต้น โมเลกุลพื้นฐานมีวงอะโรมาติกต่อกัน 4 วง ออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic กับ จุลินทรีย์ได้กว้าง เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ bacteriocide กลไกการทำงานของสารกลุ่มนี้จะยับยั้งโปรตีนโดยการไปจับกับไรโบโซม และ mRNA

4. **กลุ่ม Macrolide** ได้แก่ erythromycin และ lincomycin เป็นต้น ลักษณะ คือ เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ประกอบด้วยคาร์บอนมากกว่า 20 อะตอม มี macrocyclic lactone ring เป็นองค์ประกอบหลัก ออกฤทธิ์แบบ bacteriostatic โดยจับกับ 70S subunit ของไรโบโซมเพื่อยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

5. **กลุ่ม Rifamycin** ได้แก่ Rifamycin B และ Rifamycin SV เป็นต้น สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ พบครั้งแรกจาก *Streptomyces* ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และ *Mycobacterium tuberculosis* Rifamycin B เป็นยาปฏิชีวนะตัวแรกในกลุ่มนี้ที่ใช้กับสัตว์ซึ่งมีฤทธิ์ไม่สูงมากนัก จึงมีการพัฒนา Rifamycin SV ที่ออกฤทธิ์เป็นวงกว้างออกมา สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบ รวมถึง *Mycobacterium tuberculosis* และ *Mycobacterium leprae*

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

7. **กลุ่ม Azomycin** พบครั้งแรกจาก *Streptomyces* ในปี 1953 และได้รับการพัฒนาจนสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ในปี 1965 มีลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ trichomonocidal

มีความเป็นพิษสูงมาก จึงมีการพัฒนาสารอะนาล็อก (analogue) ได้เป็น metronidazole ใช้เป็นสารฆ่าโปรโตซัว และแบคทีเรีย

8. กลุ่ม Vancomycin และ Teicoplanin Vancomycin พบครั้งแรกจาก *Streptomyces orientalis* ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งที่เป็นแอโรบิก และแอนแอโรบิก รวมถึงเชื้อ *Staphylococcus* ที่ดื้อยาด้วย โดยมีกลไกรบกวนการสร้างผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ vancomycin ที่บริสุทธิ์ใช้เป็นยารักษาโรคทางช่องปาก และทางเดินอาหาร สำหรับ vancimycin ที่ไม่บริสุทธิ์จะทำให้เกิดผลข้างเคียง (side effect) มาก Teicoplanin เป็นสารโมเลกุลเชิงซ้อน แยกได้จาก *Actinoplanes teichomycetius* ออกฤทธิ์เหมือนกับ vancomycin แต่มีอายุการคงอยู่ในร่างกาย (half-life) ได้นานกว่า และมีการระคายเคืองน้อยกว่า vancomycin สามารถฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อ หรือเส้นเลือดได้โดยตรง

9. กลุ่ม Thienamycin เป็นสารกลุ่ม Carbapenem ซึ่งแยกได้จาก *Streptomyces* กว่า 40 ชนิด ในปี 1990 มีความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้สูง สารที่ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดในกลุ่มนี้ คือ Thienamycin ค้นพบได้ครั้งแรกจาก *Streptomyces cattleya* ในปี 1976 มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคน มีคุณสมบัติทนต่อเอนไซม์ β -lactamase สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

10. กลุ่ม Clavulanic acid เนื่องจากเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ β -lactamase ได้ จะสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะ penicillin และ cephalosporin ได้ จึงมีการค้นหายาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ได้ โดย Clavulanic acid แม้จะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ต่ำ แต่สามารถยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase ได้ จึงได้มีการใช้ Clavulanic acid ร่วมกับยาปฏิชีวนะตัวอื่น เช่น amoxicillin ซึ่งการใช้ตัวยา่วมกัน (combination) ของ Clavulanic acid กับยาชนิดอื่นนั้น ได้รับการพัฒนาเป็นยาที่ขายในท้องตลาด และทางการแพทย์ได้แล้ว โดยใช้รักษาโรคติดเชื้อในทางเดินหายใจ และทางเดินปัสสาวะ

2.10.4 สารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Sneider (2005) อธิบายไว้ว่า การค้นหาสารต้านเซลล์มะเร็งจากธรรมชาติ เริ่มต้นขึ้นเมื่อปลาย 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 *Streptomyces peuetius* เป็นสารต้านเซลล์มะเร็งอยู่ในกลุ่ม anthracyclin ยับยั้ง solid tumors และ leukemias ได้ชัดเจน มีกลไกการยับยั้งโดยไปจับกับ DNA ทำให้เซลล์ไม่มี template สำหรับ

การสังเคราะห์ DNA พบ doxorubicin (14-hydroxy-analogue of daunorubicin) ในปี ค.ศ. 1967 ผลิตโดย *S. peuetius* ออกฤทธิ์ขัดขวางการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น leukaemias, lymphomas และ solid tumours doxorubicin ถูกนำมาใช้เป็นหลักในการรักษาผู้ป่วยมา มากกว่า 25 ปี โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเอ็นไซม์ topoisomerase II ส่งผลให้สาย DNA แตกหัก aclarubicin ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1974 ผลิตโดย *S. galilaeus* ซึ่งเป็นสารกลุ่ม anthracyclin aclarubicin A มีหลายกลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เช่น ยับยั้งการทำงานของ เอ็นไซม์ 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

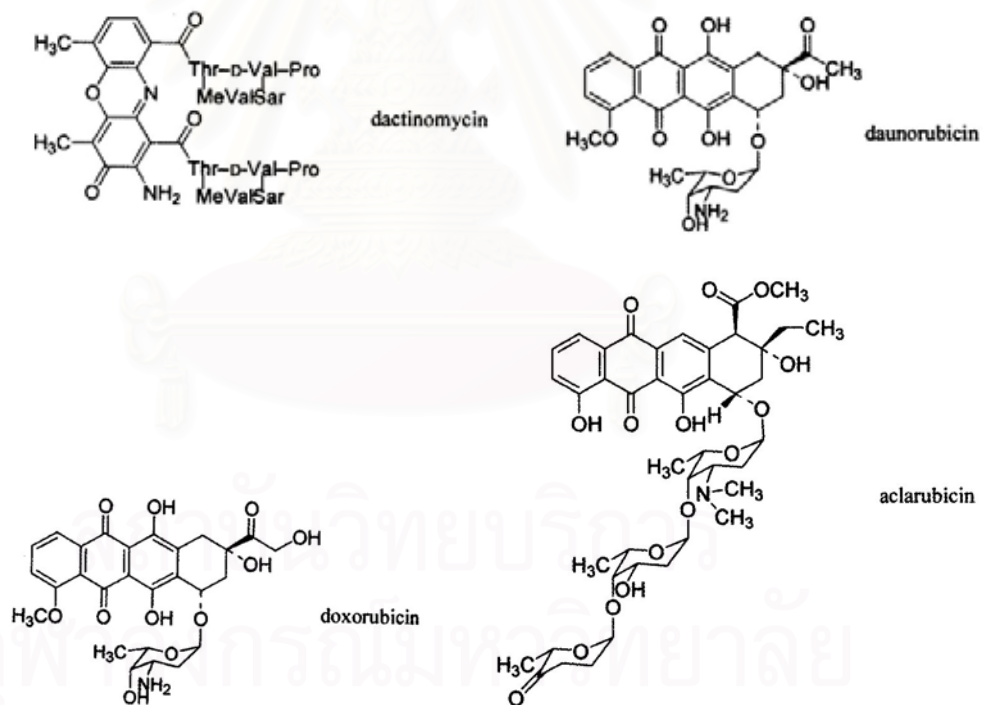
กลุ่มของสารปฏิชีวนะยับยั้งเซลล์มะเร็งแบ่งตามโครงสร้าง (Georgopapadakou, 1995)

1. Alkylating Agent สารกลุ่มนี้ปล่อยประจุบวกเข้ารบกวน 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 ด้วยพันธะโคเวเลนต์ 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 จับกับเอ็นไซม์ dihydrofolate reductase ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เบส purine และมีผลยับยั้งต่อการสังเคราะห์ DNA
4. Vinca Alkaloids and Taxol สารกลุ่มนี้ยับยั้งการรวมตัวกันของไมโครทิวบูล (microtubule) ในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ในยูคาริโอต เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการรวมตัวกันของไมโครทิวบูล 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. Etoposide และ Amsacrine ครอบคลุมการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase II ในปฏิกิริยา DNA-resealing และ แทรกเข้าไปจับในสาย DNA ทำให้เกิดการแตกหักของ DNA ออกเป็นสายคู่ หรือสายเดี่ยว

ตัวอย่างโครงสร้างสารต้านเซลล์มะเร็งแสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Sneider, 2005)

2.10.5 รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดใหม่จากแอคติโนมัยซีทีส

แม้ว่าจะมีการค้นพบสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเพื่อ ใช้ทำเป็นยารักษาโรคมาเป็นเวลานานแล้ว และได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเรื่อยมา ไม่ว่าจะเป็นการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด ดัดแปลงโมเลกุลสาร หรือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะ แต่การค้นหาแหล่งของสารปฏิชีวนะจากธรรมชาติก็ยังคงมีความสำคัญ และมีงานวิจัยเกี่ยวกับการหาแหล่งของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่มาโดยตลอด เนื่องจากปัจจัยต่างๆ หลายประการ เช่นการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ การแพร่กระจายของเชื้อจากแหล่งหนึ่งสู่อีกแหล่งที่ไม่เคยมีเชื้อโรคนั้นระบาดมาก่อน หรือแม้แต่การค้นหาแหล่งใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะในปริมาณ (Yield) ที่สูงขึ้น (Pettit และคณะ, 1999) ซึ่งแหล่งของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สำคัญที่สุดก็คือจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแอคติโนมัยซีทีส ซึ่งมีรายงานว่า เป็นทั้งแหล่งของสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ดังรายงานต่อไปนี้

Zheng และคณะ (2000) แยกแอคติโนมัยซีทีสจากสิ่งมีชีวิตในทะเลทั้งพืช และสัตว์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 1:320 เท่า ทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P388) และเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ KB เซลล์HLF และเซลล์CNE ด้วยวิธี MTT พบว่ามีเชื้อ 74 และ 67 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งอัตราการเจริญของเซลล์ P388 และ KB ได้ จากเชื้อทั้งหมด 360 สายพันธุ์ คิดเป็น 20.6% และ 18.6% ตามลำดับ

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

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

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

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

Singh และคณะ (2003) พบ Mannopectimycins เป็นสารปฏิชีวนะไกลโคเปปไทด์แบบวง ที่ผลิตโดย *Streptomyces hygroscopicus* ออกฤทธิ์ยับยั้ง Staphylococci ที่ดื้อยา methicillin และ Enterococci ที่ดื้อยา vancomycin

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

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

Boudjella และคณะ (2005) ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่กลุ่ม glycopeptide ที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ใหม่คือ *Streptosporangia* Sg10 โดยปกติสกุล *Streptosporangia* ผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่ม glycopeptide คือ sibiromycin และ sinefungins แต่จากข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปีพบว่าสารปฏิชีวนะที่ *Streptosporangia* Sg10 สร้างขึ้นมีคุณสมบัติไม่ตรงกับ sibiromycin และ sinefungins สารปฏิชีวนะนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีแต่มีฤทธิ์น้อยกว่ากับแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา

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

Gorajana และคณะ (2006) ได้มีการค้นพบสาร resistoflavine จาก *Streptomyces chibaensis* AUBN₁₇ ที่แยกได้จากโคลนใต้ทะเลในบริเวณอ่างเบงกอลประเทศอินเดีย มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งตับ อีกทั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เล็กน้อย ทั้งแกรมบวก และลบ

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



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- 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
- กล้องถ่ายรูป Olympus รุ่น C5050 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) Memmert รุ่น BE600 บริษัท Jebsen and Jebsen
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) Hepa Class 100 รุ่น 311 บริษัท Thermo electron corporation
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น H1 บริษัท Lab Service Ltd, Part
- 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.
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
- เครื่องชั่งน้ำหนัก (digital scale) บริษัท Mettler Toledo
- เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc.Edison, USA
- เครื่องดูดจากปิเปตต์ (Pipette aid) ยี่ห้อ Drummond

- เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Doc) ยี่ห้อ Vilber Lourmat
- เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (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
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler) รุ่น TP 600 บริษัท Takara Bio, Inc. Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-6010 บริษัท Hsingtai
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น stratagene บริษัท Profuge
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 บริษัท Bio-tek instrument
- เครื่อง Electrophoresis chamber set รุ่น Mupid-ex บริษัท Advance
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 ซี รุ่น ULT 1786 บริษัท FORMA Scientific, USA
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) Sharp อุณหภูมิ -20 ซี
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima, Japan
- ไมโครปิเปต (automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2 ไมโครลิตร), P10 (0.5-10 ไมโครลิตร), P20 (2-20 ไมโครลิตร), P100 (20-100 ไมโครลิตร), P1000 (0.2-1 มิลลิลิตร) บริษัท Gilsson France
- ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 1-200 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครทิวบ์ (microtubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร บริษัท Corning Incorporated, USA

- หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) 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 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
- กระดาษกรอง (cellulose acetate membrane filter) Pore size 0.45 ไมโครเมตร 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
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด 0.0025 มิลลิเมตร² ยี่ห้อ Loptik Labor บริษัท Boeco
- TLC aluminium sheet รุ่น Silica gel60 F₂₅₄ บริษัท Merck, Germany

3.2 สารเคมี

- กาแลคโตส (*D*-galactose) บริษัท Merck. Germany
- กลูตามีน (*L*-glutamine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- กลูโคส (glucose)
- เคซีน (casein)
- เจลาติน (gelatin)
- ซูโครส (sucrose) บริษัท Merck. Germany
- ไซโลส (xylose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- ไซแลน (xylan)
- โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) บริษัท Merck. Germany
- โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) บริษัท Merck. Germany
- เด็กซ์แทรน (dextran) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ทรีฮาโลส (threhalose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไทโรซีน (tyrosine)

- ทีโอนีน (*L*-theonine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- แป้ง (starch)
- โพรลีน (*L*-proline) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- โพแทสเซียม ไนเตรท (potassium nitrate) บริษัท Merck. Germany
- ฟรุกโตส (*D*-fructose) บริษัท Merck. Germany
- ฟีนิลอะลานีน (*L*-phenylalanine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- เมทไทโอนีน (*L*-methionine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แมนนิทอล (*D*-mannitol) บริษัท Difco Laboratory.
- แมนโนส (*D*-mannose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แรมโนส (*L*-rhamnose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แลคโตส (*D*-lactose) บริษัท Merck. Germany
- วาลีน (*L*-valine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- มีโซ-อินโนสิทอล (meso-inositol) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- อะราบิโนส (*L*-arabinose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- อะลานีน (*L*-alanine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- อาร์จินีน (*L*-arginine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แอสปาราจีน (*L*-asparagine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- ฮิสทีดีน (*L*-histidine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- Agar
- Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express
- Ammonium sulphate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Bacto peptone
- Bacto tryptone
- Bato soytone
- Beef extract
- Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) บริษัท Serva
- Copper sulphate $(\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$
- Dimethylsulfoxide (DMSO) บริษัท Sigma, U.S.A.
- Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) บริษัท Scharlau
- Ferric chloride (FeCl_3)
- Ferrous sulphate $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$

- Fetal Bovine Serum (FBS) Hyclone บริษัท Hyclone
- Glycerol
- Hydrochloric acid (HCl) บริษัท Merck. Germany
- Isopropanol alcohol บริษัท Merck. Germany
- Isoamyl alcohol บริษัท Carbo erba
- Manganes chloride ($MnCl_2$)
- Magnesium sulfate ($MgSO_4$)
- MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenylterazolium bromide)] บริษัท Bio Basic inc, Canada
- Di-Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)
- Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- Potassium nitrate (KNO_3)
- Sodium caseinate
- Trypsin-EDTA บริษัท Hyclone
- Trypan blue 0.5% w/v บริษัท Biochrom AG, Germany
- Taq DNA polymerase บริษัท Fermentas
- Yeast extract
- Zinc sulphate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
- อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 บริษัท Hyclone
- 2-Mercaptoethanol บริษัท Sigma, U.S.A.
- 10x Tris boric acid disodium ethylenediamine tetracetic acid (10x TBE buffer)
- Methanol
- Ethanol
- Ethylacetate
- Hexane
- Cycloheximide
- Streptomycin
- Nystatin

3.3 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ในพื้นที่จังหวัดน่าน ตัวอย่างละประมาณ 50 – 100 กรัม บันทึกสถานที่เก็บ ลักษณะ และสีของดิน บดให้ละเอียด ใส่ถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

ทำการบันทึกสมบัติของดินและวัดหาค่า pH ของดิน โดยการผสมดินและน้ำด้วยอัตราส่วนของดินต่อน้ำเท่ากับ 1:2 (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) และวัดด้วยเครื่อง pH meter

3.5 การแยกแอกติโนมัยซีตีสจากดินตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างดิน 3 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 27 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ได้สารแขวนลอยดินระดับการเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นเพิ่มระดับการเจือจางเป็น 10^{-2} - 10^{-5} (serial ten fold dilution) ปิเปตสารแขวนลอยดิน 0.1 มิลลิลิตรที่ระดับการเจือจางเท่ากับ 10^{-3} - 10^{-5} เกลี่ย (spread) บนอาหาร Sodium Caseinate Agar (SCA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยเติม cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ผสมกับ nystatin 50 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7-14 วัน คัดเลือกแอกติโนมัยซีตีสที่โคโลนีมีลักษณะแตกต่างกัน ชีดลาก (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA เพื่อให้เกิดโคโลนีเดี่ยว ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวเลี้ยง Oat Meal Agar (OMA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 17) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บสปอร์โดยทำเป็นสปอร์แขวนลอยในสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล แซ่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6 การเก็บรักษาแอกติโนมัยซีตีส

ชีดแอกติโนมัยซีตีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อผิวเลี้ยง Oat Meal Agar หรือ Mannitol Mungbean Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 7-14 วัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 1-2 เดือน สำหรับการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์บนอาหารมากพอ เติมสารละลาย 20% กลีเซอรอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร ใช้ลูป (loop) ชูดสปอร์ให้หลุดออก แล้วกรองสปอร์แขวนลอยด้วย

ลำลีปลอดเชื้อ ปิเปตต์สารแขวนลอยสปอร์ที่กรองแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ (micro tube) เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 1 ปี

3.7 การทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ที่มีความสามารถในการ สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

นำแอกติโนมัยซีทีสจากอาหารผิวเยื้องในข้อ 3.6 ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat Meal Agar (OMA) หรือ Mannitol Mungbean Agar (MBA) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.7.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

ใช้ที่เจาะรูไม้คอร์ก (cork borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีที่เจริญอยู่บนอาหารแข็งในข้อ 3.7.1 จำนวน 3 จุด ใช้เข็มเย็บเขื่อนำชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ทั้ง 3 ชิ้นถ่ายลงใน ertenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt Extract Broth (MEB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 29) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบโรตารี (rotary shaker) 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นจึงนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายต่อไป

3.7.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลาย

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.7.2 มากกรองแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกันโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วย เอทิลแอซิเตต (ethyl acetate) โดยใช้กรวยแยก โดยใช้ปริมาตรเอทิลแอซิเตตต่อปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1:1 เก็บสารสกัดส่วนของชั้นเอทิลแอซิเตตไว้ แล้วทำการสกัดส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำด้วยเอทิลแอซิเตตอัตราส่วนเท่าเดิมอีกครั้ง นำส่วนของเอทิลแอซิเตตที่ได้ทั้งสองครั้งมารวมกัน แล้วนำมาระเหยเอทิลแอซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายคราบสารสกัดด้วยสารละลาย 25%DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ในหลอดไมโครทิวป์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบและยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ต่อไป

3.7.4 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียในน้ำที่สงสัยที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

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

3.7.4.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบชนิดลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ใช้ลูปเชี่ยโคโลนีเดี่ยว 4-5 โคโลนี ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสังเกตเห็นว่าหลอดเชื้อขุ่น ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ซึ่งเทียบเท่ากับการอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml

3.7.4.2 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบชนิดลงบนอาหาร Sabouraud Agar (SBA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ใช้ลูปเชี่ยโคโลนีเดี่ยว 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 1×10^6 - 3×10^6 CFU/ml

3.7.4.3 การเตรียมราเส้นใยสำหรับทดสอบ

เลี้ยงราในอาหารผิวเคียง PDA (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) 3-5 วัน หรือจนมีการสร้างสปอร์ เต็มสารละลาย 0.85% NaCl ใช้ลูปชุบสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอยกรองสปอร์ด้วยสำลีปลอดเชื้อ จากนั้นปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ CFU/ml โดยการเจือจางสปอร์ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl แล้วนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemocytometer)

3.7.4.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี

Agar well (Murray และ Baron, 1999)

ใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในหลอดทดลองที่มีสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.7.4.1 - 3.7.4.3 บิดสำลีกับข้างหลอดพอหมาด ๆ ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Agar สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นยีสต์ และรา โดยป้ายให้ทั่วในลักษณะสามทิศทาง ทิ้งจนอาหารไว้เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้ที่เจาะรูไม้คอร์กเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนอาหารแข็ง แล้วนำชิ้นวุ้นที่เจาะออกโดยใช้เข็มเย็บเชื้อ (needle) ทำการควบคุมให้หลุมที่เจาะมีปริมาตรเท่ากันโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิเปตสารสกัดจากข้อ 3.7.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารแพร่เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบ, บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับราเส้นใย หลังจากนั้นวัดบริเวณที่เกิดวงใส (clear zone) โดยชูดควบคุมบวกสำหรับเชื้อแบคทีเรีย คือ streptomycin, ยีสต์ คือ nystatin และราเส้นใย คือ cycloheximide และชูดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อและผ่านขั้นตอนการสกัดเหมือนกันทุกประการ

3.7.4.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้ ถ้วยสเตนเลส

ใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในหลอดทดลองที่มีสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.7.4.1 - 3.6.4.3 ปิดสำลีกับข้างหลอดพอมหาคัด ๗ ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Agar สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นยีสต์ และรา โดยป้ายให้ทั่วในลักษณะสามทิศทาง ทั้งจานอาหารไว้เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นนำถ้วยสเตนเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางบนผิวหน้าอาหาร โดยควบคุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบและปริมาณอาหารในจานเลี้ยงเชื้อให้เท่ากัน ปิดตบสารสกัดจากข้อ 3.7.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงในถ้วยสเตนเลส ที่ไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารแพร่เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ *Aspergillus niger* หลังจากนั้นวัดบริเวณที่เกิดวงใส (clear zone) โดยชุดควบคุมบวกสำหรับเชื้อแบคทีเรีย คือ streptomycin, ยีสต์ คือ nystatin และราเส้นใย คือ cycloheximide และชุดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อและผ่านขั้นตอนการสกัดเหมือนกันทุกประการ

3.7.4.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราทดสอบโดยวิธี

Dual Culture (Aghighi และคณะ, 2004)

การทดลองนี้ทำการทดสอบเฉพาะแอกติโนมัยซีทีสที่ได้ผ่านการคัดเลือกขึ้นต้นแล้ว โดยร่าก่อให้เกิดโรคพืช จากกรมวิชาการเกษตร ดังนี้

Alternaria porri DOAC 1756

Collectotrichum capsici DOAC 1196

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* DOAC 0874

Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* DOAC 0893

Pythium aphanidermatum DOAC 1662

Phytophthora parasitica DOAC 0005

เตรียมรாதสอบโดยใช้ที่เจาะรูไม้คอร์ก (cork borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของรாதสอบ แล้วนำชิ้นวุ้นที่เจาะออกโดยใช้ เข็มเย็บเชื้อ นำชิ้นวุ้นของรாதสอบที่ได้ วางลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP2 (ภาคผนวก ก หมายเลข 16) แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-6 วัน

เตรียมแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบโดยใช้ที่เจาะรูไม้คอร์ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยผ่านเปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสที่ เจริญอยู่บนอาหารแข็งในข้อ 3.6.1 นำชิ้นวุ้นที่มีแอกติโนมัยซีทีส วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP2 ในจานเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ทดสอบ โดยวางให้มีระยะห่างจากจุดที่จะวางชิ้นวุ้นรாதสอบ 3 เซนติเมตร แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 วัน จากนั้นใช้ที่เจาะรูไม้คอร์ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนโคโลนีของรாதสอบที่เตรียมไว้ข้างต้นชนิดละ 2 ชิ้น ชิ้นแรกนำมาวางในระนาบเดียวกันในจานเลี้ยงเชื้อที่มีแอกติโนมัยซีทีส เป็นชุดทดสอบ ชั้นที่ 2 วาง ลงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP2 เป็นชุดควบคุม แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 วันสำหรับ *Pythium aphanidermatum* และ ประมาณ 4-6 วัน สำหรับ รบทดสอบอื่น ทำการบันทึกระยะทางที่เส้นใยของรாதสอบถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีทีส ($\Delta\gamma$) โดยใช้สูตร

$$\Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma$$

γ_0 คือ รัศมีของเส้นใยที่เจริญแผ่ออกมาของราในชุดควบคุม

γ คือ รัศมีของเส้นใยของราในชุดทดสอบที่เจริญในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีทีส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8 การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงและสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

3.8.1 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

เตรียมหัวเชื้อแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ตามวิธีการในข้อ 3.7.1 โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MEB ตามวิธีการในข้อ 3.7.2 ปั่นที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

3.8.2 การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสม

ทำการแปรผันอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 6 ชนิด คือ Yeast-Malt Extract Agar (ISP2) Sodium Caseinate Broth (SCB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) Sodium Caseinate Yeast Extract Broth (SCYB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) Nutrient Broth (NB) Malt Extract Broth (MEB) และ Soluble Starch Broth (SSB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะโดยปิเปตหัวเชื้อจากข้อ 3.8.1 ใส่ในพลาสติกที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแต่ละชนิด พลาสติกละ 1 มิลลิลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดทำจำนวน 3 ชุด ปั่นที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นกรองเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารแต่ละชนิด ทั้ง 3 ชุด มาสกัดด้วยตัวทำละลายโดยทำการแปรผันตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน (hexane), เอทิลแอซิเตต (ethyl acetate) และ เมทานอล (methanol) โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิดชุดแรก ทำการสกัดโดยใช้ เฮกเซน ชุดที่สองและชุดที่สาม ทำการสกัดโดยใช้เอทิลแอซิเตตและเมทานอลตามลำดับ ในกรณีที่ตัวทำละลายคือ เฮกเซน และ เอทิลแอซิเตต ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.7.3 ในกรณีที่ตัวทำละลายคือ เมทานอล ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มล. โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) จนน้ำเลี้ยงเชื้อแห้งและมีลักษณะเป็นผง จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 100 มล. ลงไปเพื่อสกัดสาร เก็บส่วนที่เป็นชั้นของตัวทำละลายนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายสารออกมาด้วยสารละลาย 25%DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้วิธีการใช้ด้วยอะลูมิเนียมเป็นภาชนะรองรับสารสกัดตามวิธีการในข้อ 3.7.4.5 นำผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้ ไปทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.9 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

3.9.1 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

เตรียมหัวเชื้อแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ตามวิธีการในข้อ 3.7.1 โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ตามวิธีการในข้อ 3.7.2 ป่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

3.9.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์

ปิเปตหัวเชื้อจากข้อ 3.9.1 ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Soluble Starch Broth (SSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใส่หัวเชื้อพลาสติกละ 1 มิลลิลิตร ป่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วย เครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ กรองเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ และทำการบันทึกผลน้ำหนักของกระดาษกรองเอาไว้แล้ว นำเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักของเส้นใยในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำไปสกัดโดยใช้ตัวทำละลายคือ เมทานอล โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) จนน้ำเลี้ยงเชื้อแห้งและมีลักษณะเป็นผง จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 100 มล. ลงไปเพื่อสกัดสาร กรองเอากากตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 เก็บส่วนที่เป็นตัวทำละลายนำมาทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายสารออกมาด้วยสารละลาย 25%DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีการในข้อ 3.7.4.5 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและน้ำหนักแห้งของเซลล์ และความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและปริมาณสารปฏิชีวนะ

3.10 การแยกสารสกัดเบื้องต้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น Silica gel60 F₂₅₄ และใช้ตัวทำละลาย เช่น เมททานอล, เอทิลแอลกอฮอล์, และ เฮกเซน เป็นตัวชะเพื่อเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะเบื้องต้น โดยหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ออกจากสารอื่น ๆ ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง การตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC หลังจาก develop แล้วมีหลายวิธี เช่น อบแผ่น TLC ในภาชนะที่อิมตัวด้วยไอของไอโอดีน หรือส่องภายใต้รังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือพ่นด้วยสาร anisaldehyde ในกรดซัลฟิวริก หรือจุ่มด้วยสารละลายวานิลลิน (vanillin) แล้วพ่นลมร้อน สีของสารจะปรากฏ จากนั้นทำการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารและคำนวณหาค่า retention factor (Rf)

3.11 การศึกษาตำแหน่งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบบนแผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี (Bioautography) (Zitouni และคณะ, 2005)

หลังจากที่ develop แผ่น TLC ด้วยระบบของตัวชะที่เหมาะสมแล้ว นำแผ่น TLC ออกมาจากภาชนะที่อิมตัวด้วยไอของตัวชะ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวชะระเหยออกไปจนหมด หลังจากนั้นนำแผ่น TLC มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอยู่ด้านล่างนำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.7.4.1 - 3.7.4.3 มาทดสอบการยับยั้งบนแผ่น TLC โดยปิเปตเชื้อทดสอบในปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่มีวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ (semi solid) ขณะอาหารเลี้ยงเชื้อยังเป็นของเหลวที่อุณหภูมิ 42-45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายอย่างสม่ำเสมอในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นทำการเทอาหารที่ปลงบนแผ่น TLC ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแบคทีเรียทดสอบ คือ Mueller-Hinton Agar และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับยีสต์และราเส้นใยคือ Sabouraud Agar หลังจากอาหารแข็งตัวแล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นราเส้นใย ตรวจสอบบริเวณใสบนแผ่น TLC และวัดหาค่า Rf ของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิด ในการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบมีชุดควบคุมบวกคือแผ่น TLC ที่ spot สารสกัดจากแอกติโนมัยซีสแต่ไม่ได้ทำการชะด้วยตัวทำละลายและชุดควบคุมลบคือ แผ่น TLC ที่ไม่ได้ spot สารสกัดจากแอกติโนมัยซีส

3.12 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสายยับยั้งเซลล์ไลน์ มะเร็งมนุษย์

เซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ (Human tumour cell lines) ที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

A375	(Human malignant melanoma)	ATCCno.CRL-1619
SW620	(Human colorectal adenocarcinoma)	ATCCno.CCL-227
KatoIII	(Human gastric carcinoma)	ATCCno.HTB-103
HepG2	(Human hepatocellular carcinoma)	ATCCno.HB-8065
BT474	(Human ductal carcinoma)	ATCCno.HTB-20
Jurkat	(Human acute T cell leukemia)	ATCCno.CRL-2063

3.12.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

นำเซลล์มะเร็งที่ถูกเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาละลาย โดยแช่หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส ทันที แกว่งหลอดไปมาให้ น้ำแข็งละลายอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นใช้ปิเปตแก้วดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีสารละลาย 1XPBS (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ PRMI-1640 (complete media) (ภาคผนวก ก หมายเลข 32) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ปิเปตอาหารขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นปิเปตถ่ายเซลล์แขวนลอยทั้งหมดใส่ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบดูสัณฐานวิทยาของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับทุกวัน และเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน หรือเมื่อเห็นว่าอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จนกว่าเซลล์จะเจริญหนาแน่น

3.12.2 การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

ในกรณีที่เซลล์มะเร็งเป็นชนิดเซลล์เกาะผิว ได้แก่ A375, SW620, KatoIII, HepG2 และ BT474 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยดูดอาหารเก่าทั้งหมดออกแล้วเติมอาหารใหม่ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เข้าไปแทน ในกรณีที่เซลล์มะเร็งเป็นชนิดเซลล์แขวนลอย ได้แก่ Jurkat ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยการดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม complete media

ปริมาณ 7 มิลลิลิตรลงไป ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว ดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ รอจนเซลล์เจริญหนาแน่นจึงถ่ายเซลล์สู่จานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมต่อไป

3.12.3 การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำไปทำการทดสอบ

นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.12.1 ที่อยู่ในระยะ exponential phase ถ่ายลงในจานเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม ในกรณีนี้เซลล์มะเร็ง Jurkat ATCCno.CRL-2063 ซึ่งเป็นเซลล์แขวนลอย ถ่ายเซลล์โดยการดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งได้ตะกอนของเซลล์ กรณีที่เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์เกาะผิว ถ่ายเซลล์โดยการดูดอาหารในภาชนะเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วยการเติมสารละลาย 1XPBS (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เอียงภาชนะไปมา 5-6 ครั้ง แล้วดูดสารละลายออก เติม trypsin-EDTA ความเข้มข้น 0.25% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาประมาณ 2 นาที สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเคาะภาชนะด้านข้างเบา ๆ เมื่อเซลล์เริ่มหลุดตัวและแขวนลอยอยู่ในอาหาร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ complete media ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดูดอาหารขึ้นลงชะเซลล์ที่เหลือให้หลุดออกจากผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ ดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งได้ตะกอนของเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ complete media ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต หลังจากนั้นเจือจางเซลล์ให้มีจำนวน 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ลงในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ในปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบกับสารสกัดด้วยวิธี MTT ต่อไป

3.12.4 การนับจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ที่มีชีวิตโดยย้อมด้วยสี trypan blue

ปิเปตต์สารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.11.3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ย้อมด้วยสี trypan blue ความเข้มข้น 0.5% w/v ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับโดยนับเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ 4 มุม ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมไม่ติดสีของ trypan blue โดย

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

3.12.5 การทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบโดยวิธี MTT assay

(Palaga และคณะ, 1996)

หลังจากบ่มเซลล์ในข้อ 3.11.3. เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว หยดสารสกัดจาก แอคติโนมายซีทีสที่ได้จากข้อ 3.6.3 ลงไปในหลุมของภาดเลี้ยงเซลล์ โดยหยดปริมาตรหลุมละ 5 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ โดยหยดสารละลาย MTT (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย MTT เท่ากับ 0.5 mg/ml สารละลาย MTT จะทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้สารละลาย MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็นผลึกสีม่วงไม่ละลายน้ำ เรียกว่าผลึก formazan ซึ่งปริมาณ dehydrogenase ในเซลล์หนึ่ง ๆ จะคงที่ ดังนั้น ปริมาณผลึก formazan ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต โดยมีชุดควบคุมคือหลุมที่หยดด้วยสารละลาย 25%DMSO และ Blank คือหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง เมื่อหยดสารละลาย MTT แล้ว บ่มเซลล์ที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น เติม 0.04 N HCl ใน isopropanol (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วทำการปิเปตของเหลวขึ้นลงหลายครั้งด้วย multi channel pipette เพื่อละลายผลึกสีม่วง หลังจากนั้นนำภาดเลี้ยงเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (%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_{test average} = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ใช้ทดสอบด้วยสารสกัดจาก แอคติโนมายซีทีส

OD_{control negative control average} = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบด้วย สารละลาย 25%DMSO

OD_{blank average} = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์

3.12.6 การเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว

ในเซลล์ชนิดเกาะผิวทำการลอกเซลล์ที่เกาะกับภาชนะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ 0.25% trypsin-EDTA ได้เซลล์แขวนลอย ในเซลล์ชนิดแขวนลอยสามารถดูดเซลล์ออกมาได้เลย โดยดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 + 1%DMSO (ภาคผนวก ก หมายเลข 33) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดเก็บเซลล์ (cryotube) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทันที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดเก็บเซลล์ไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งสามารถเก็บเซลล์ไว้ได้เป็นเวลานาน

3.13 การศึกษาผลของสารสกัดจากแอกติโนมายซีทีต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์โดยวิธีย้อมด้วย DNA dry Hoechst 33342 (สายพิน, 2549)

ประเภทเซลล์แขวนลอย ได้แก่เซลล์มะเร็ง Jurkat

เตรียมเซลล์ Jurkat แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ complete media ให้มีความเข้มข้น 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม จำนวน 3 หลุม โดยหลุมแรกหยดด้วยสารสกัดจากแอกติโนมายซีทีปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลุมที่สองหยดด้วยสารละลาย 25%DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเป็นชุดควบคุมลบ และหลุมที่สามหยดด้วย etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นชุดควบคุมบวก เลี้ยงเซลล์ในตู้ป่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 1XPBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นที่สภาวะเดิมเทส่วนใสทิ้ง เติม 1% glutaraldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปิเปต 1% glutaraldehyde ที่ ปั่นล้างเซลล์ด้วย 1XPBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เทส่วนใสทิ้ง เติม 1XPBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ที่ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ลงบนกระจกสไลด์ ปิดด้วย cover slip ใช้น้ำยาทาเล็บเคลือบรอบๆ ด้านข้างของ cover slip ตรวจสอบจำนวนเซลล์ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิสโดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิส} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เกิด apoptotic nuclei} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}$$

3.14 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

จำแนกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา เช่น การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างรงควัตถุเมลานิน การทดสอบทางชีวเคมี การย่อยสลายสาร ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความสามารถในการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ตามวิธีที่รายงานโดย (Williams และคณะ, 1989)

3.14.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope:SEM)

ใช้เทคนิค slide culture (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Malt Extract Agar (GYM) (ภาคผนวก ก หมายเลข 13) และ Sodium Caseinate Yeast Extract Agar (SCYA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 14) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหาร และจำนวนวันที่มีการสร้างสปอร์ จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด วิธีเตรียมตัวอย่างดังภาคผนวก ค หมายเลข 4 สังเกตลักษณะการแตกออกของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ ลักษณะของสายสปอร์ การเรียงตัวของสปอร์ ลักษณะพื้นผิวของสปอร์

3.14.2 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP (International Streptomyces Project) (ภาคผนวก ก หมายเลข 15-20)

อาหาร ISP ชนิดต่าง ๆ ได้แก่

ISP1 คือ Trypton-Yeast Extract Agar (TYEA)

ISP2 คือ Yeast-Malt Extract Agar (YMEA)

ISP3 คือ Oat Meal Agar (OAA)

ISP4 คือ Inorganic Salts Starch Agar (ISSA)

ISP5 คือ Glycerol Asparagines Agar (GAA)

ISP6 คือ Peptone Yeast Extract Iron Agar (PYEA)

ซี้ดแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 1-6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน บันทึกการเจริญ สีและลักษณะของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำและการสร้างสปอร์

3.14.3 ทดสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน

เลี้ยงแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหาร ISP6 (Peptone Yeast Extract Iron Agar) และ Tyrosine Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 21) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 โดยจะเกิดสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.14.4 ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท

แทง (stab) แอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 22) ในหลอดอาหารขนาด 16x150 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 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) ลงในหลอดทดลองซึ่งจะเกิดสีแดง แต่ถ้าการทดสอบไม่เกิดสีแดงอันเนื่องมาจากไนไตรท์ถูกสลายต่อไปเป็นแอมโมเนีย และก๊าซไนโตรเจน ต้องทดสอบขั้นที่สองโดยเติมผงสังกะสีลงไป หากเกิดสีแดงแสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ (Shirling และ Gottlieb, 1966)

3.14.5 ทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

ซี้ด (streak) และแทง แอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนผิวหน้าอาหารวุ้นเลี้ยง ISP6 (Peptone Yeast Extract Iron Agar) และ อาหารสำเร็จรูป TSI บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง สังเกตอาหารจะมีสีน้ำเงินดำ (bluish-black color) ควรสังเกตสีของอาหารก่อนที่จะสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ลงไป (Tresner และ Danga, 1958) และถ้ามีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะเกิดการแตกที่วุ้นในอาหาร TSI

3.14.6 การศึกษาสมบัติการย่อยสลายสาร (degradation activity)

ซี้ดแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) 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) ตรวจสอบการย่อยสลายโดยสังเกต

การเปลี่ยนแปลงความใสบริเวณรอบหรือใต้โคโลนีในอาหารวุ้น ยกเว้นการย่อยสลายเจลาตินและแป้ง ตรวจสอบโดยสังเกตจากวงใสหลังจากเททับด้วยสารละลาย acidified HgCl₂ และ Iodine ตามลำดับ

3.14.7 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) บ่มที่อุณหภูมิ 37 , 45 และ 55 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญหลังจากวันที่ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญหลังจาก 2 สัปดาห์

3.14.8 การตรวจสอบการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) ที่มีพีเอช เท่ากับ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 8.5, และ 9 ตามลำดับ และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญหลังจาก 14 วัน

3.14.9 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 24) ที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ 0.1%L-arginine, 0.1%L-histidine, 0.1%L-methionine, 0.1%potassium nitrate, 0.1%L-theonine, 0.1%L-valine, 0.1%L-glutamine และ 0.1%B-alanine บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนโดยเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมบวกคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่ประกอบด้วย 0.1% L-Asparagine หรือ 0.1% L-proline

3.14.10 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 25) 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 ตามลำดับ ทำการตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนโดยเปรียบเทียบการเจริญกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน และอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่ประกอบด้วย 1.0% glucose บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.15 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

3.15.1 การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou และคณะ (1999) โดยเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP2 (Yeast-Malt Extract Agar) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเส้นใยประมาณ 30 กรัม ไปบดด้วยโกร่งจนละเอียดเติมสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ถ่ายส่วนผสมลงในหลอดไมโครเซนติพิวส์ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรและบั่นเหวี่ยงซ้ำเพื่อล้างตัวอย่างจนของเหลวส่วนบนใส เติมสารละลาย 2X CTAB (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายผสมของ chloroform/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นบั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนติพิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลายผสมของ chloroform/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนติพิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาบั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม 70 % เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 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 ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที บั่นเหวี่ยง

ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนผสมให้เหลือตะกอนของดีเอ็นเอ ล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม 70%เอธานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

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

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

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

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

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้ โคโรโมโซมมอลดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ซึ่งสกัดตามวิธีในข้อ 3.14.1 เป็นแม่แบบ (template) ในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ประกอบด้วยสารผสม dNTP, forward primer, reward primer, เอนไซม์ Tag DNA polymerase, PCR บัฟเฟอร์, แมกนีเซียมคลอไรด์, และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่าง ๆ ในสารละลาย PCR 10 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ

รีเอเจนต์	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR บัฟเฟอร์	1x
2mM dNTP mixture	0.2 mM
25 mM MgCl ₂	1.5 mM
PrimerI (forward)	0.5 µM
PrimerII (reverse)	0.5 µM
Tag DNA polymerase	0.5 U
แม่แบบ (DNA template)	1ไมโครลิตร

ปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอไรเซชันประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

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 โดยผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (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

3.15.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ primer PA (forward primer) กับ StrepF (Reward primer) ส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ณ บริษัททอร์คเมตริกซ์ เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับข้อมูลลำดับเบสที่มีอยู่ใน GenBank DNA database จากเว็บไซต์ นำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันของตัวอย่างและข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank DNA database โดยนำข้อมูลลำดับเบสมาจัดเรียงความเหมือนของลำดับเบสโดยใช้ โปรแกรม Clustal X (<http://innprotweiznann.ac.il/software/ClustalX.html>) และทำการตรวจสอบการจัดเรียงความเหมือนของลำดับเบสอีกครั้งด้วยโปรแกรม MacClade 4 (Maddison และ Madison, 2001) โดยมีลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของ *Nocardia asteroides* (z36934) เป็น outgroup Phylogenetic tree จะถูกสร้างขึ้นใน Neighbour-Joining mode ของโปรแกรม PAUP*4.08b (PPC) (Swofford, 1999)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะของตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจาก 7 อำเภอในพื้นที่จังหวัดน่าน จำนวน 15 ตัวอย่าง เพื่อแยกหา แอคติโนมัยซีทีส ศึกษาลักษณะเนื้อดิน สี และ วัดหาค่า pH ของตัวอย่างดินที่เก็บได้ pH ของตัวอย่างดินอยู่ในช่วงระหว่าง 5.92 – 8.70 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่เก็บ ลักษณะและพีเอช ของตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของดิน	ค่า pH
1	ต.ไหล่น่าน อ.เวียงสา	ดินร่วน สีน้ำตาล	6.68
2	ป่าชุมชน อ.สันติสุข	ดินเนื้อละเอียด จับเป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาลม่วง	6.77
3	ห้วยหลักลาย อ.สันติสุข	ดินเนื้อละเอียด จับเป็นก้อน สีน้ำตาลม่วงเข้ม	6.63
4	บ้านปางช้าง อ.สันติสุข	ดินเนื้อละเอียด จับเป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาล	7.57
5	ป่าบ้านปางช้าง อ.สันติสุข	ดินเนื้อละเอียด จับเป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาลเข้ม	7.51
6	ป่าชุมชน อ.ภูเพียง	ดินร่วนเนื้อละเอียด สีน้ำตาลเหลือง	6.78
7	ต.บ่อเกลือ 1 อ.บ่อเกลือ	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาลเข้ม	8.70
8	ต.บ่อเกลือ 2 อ.บ่อเกลือ	ดินร่วน สีน้ำตาลแดง	8.22
9	บ้านบ่อ อ.บ่อเกลือ	ดินร่วนปนทราย สีเทา	8.36
10	ต.บ่อเกลือใต้ อ.บ่อเกลือ	ดินร่วน สีน้ำตาล	5.92

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของดิน	ค่า pH
11	คอยภูคา อ.ปัว	ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม	7.31
12	ร.ร.แม่จริม อ.แม่จริม	ดินร่วน สีน้ำตาล	7.05
13	บ้านนาคา อ.แม่จริม	ดินลูกรัง สีน้ำตาลเหลือง	7.26
14	ต.หนองแดง อ.แม่จริม	ดินลูกรัง สีน้ำตาลเหลือง	7.17
15	บ้านนาทะนุง อ.นาหมื่น	ดินร่วน สีน้ำตาลดำ	7.34

4.2 การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากดินตัวอย่าง

จากการแยกแอกติโนมัยซีทีสจากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sodium Caseinate Agar พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้จำนวนทั้งสิ้น 61 สายพันธุ์ โดยแต่ละแหล่งได้จำนวนสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสแตกต่างกัน โดยตัวอย่างดินจาก ต.ไหล่น่าน อ.เวียงสา พบแอกติโนมัยซีทีสมากที่สุด 10 สายพันธุ์ ส่วนตัวอย่างดินที่พบแอกติโนมัยซีทีสน้อยที่สุด ได้แก่ ตัวอย่างดินจากห้วยหลักลาย อ.สันติสุข ตัวอย่างดินจาก ต.บ่อเกลือใต้ อ.บ่อเกลือ และตัวอย่างดินจาก ต.หนองแดง อ.แม่จริม โดยสามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้ 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง

ลำดับตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้	จำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้
1	Nan 1.1, Nan 1.2, Nan 1.3, Nan 1.4, Nan 1.5, Nan 1.6, Nan 1.7, Nan 1.8, Nan 1.9, Nan 1.10	10
2	Nan 2.1, Nan 2.2, Nan 2.3, Nan 2.4, Nan 2.5, Nan 2.6, Nan 2.7	7
3	Nan 2.8	1

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ลำดับตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้	จำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้
4	Nan 2.9, Nan 2.10, Nan 2.11, Nan 2.12, Nan 2.13	5
5	Nan 2.14, Nan 2.15	2
6	Nan 3.1, Nan 3.2, Nan 3.3, Nan 3.4	4
7	Nan 4.1, Nan 4.2, Nan 4.3, Nan 4.4	4
8	Nan 4.5, Nan 4.6, Nan 4.7, Nan 4.8	4
9	Nan 4.9, Nan 4.10, Nan 4.11	3
10	Nan 4.12	1
11	Nan 5.1, Nan 5.2, Nan 5.3, Nan 5.4, Nan 5.5, Nan 5.6	6
12	Nan 6.1, Nan 6.2	2
13	Nan 6.3, Nan 6.4, Nan 6.5, Nan 6.6, Nan 6.7, Nan 6.8, Nan 6.9, Nan 6.10	8
14	Nan 6.11	1
15	Nan 7.1, Nan 7.2, Nan 7.3	3

4.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่สายพันธุ์ที่แยกได้ใน การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด 61 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) เป็นเวลา 10 วัน สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ออก และละลายสารสกัดด้วยสารละลาย 25%DMSO ได้สารสกัดทั้งหมด 61 ชนิด นำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well กับจุลินทรีย์ทดสอบ 7 ชนิด พบว่าแบคทีเรียที่สกัดแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ
ของแอกติโนมัยซีทีส

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
Nan 1.1	-	-	+	-	-	-	-
Nan 1.2	-	-	+	-	-	-	-
Nan 1.3	-	+++	++	+++	++	+	-
Nan 1.4	-	-	+	-	-	-	-
Nan 1.5	-	-	-	-	-	-	-
Nan 1.6	-	-	+	++	-	-	-
Nan 1.7	-	-	+	-	-	-	-
Nan 1.8	-	-	+	-	-	-	-
Nan 1.9	-	-	-	-	-	-	-
Nan 1.10	-	-	+	-	-	-	-
Nan 2.1	-	-	+	-	-	-	-
Nan 2.2	-	-	-	-	-	-	-
Nan 2.3	-	-	+	-	-	-	-
Nan 2.4	-	-	+	+	-	-	-
Nan 2.5	-	-	+	-	-	-	-
Nan 2.6	-	-	+	-	-	-	-
Nan 2.7	-	-	+	-	-	-	-
Nan 2.8	-	-	-	++	-	-	-
Nan 2.9	-	-	+	-	-	-	-
Nan 2.10	-	-	-	-	-	-	-
Nan 2.11	-	-	+	-	-	-	-
Nan 2.12	-	-	+	-	-	-	-
Nan 2.13	-	-	+	++	-	-	-
Nan 2.14	-	-	-	-	-	-	-
Nan 2.15	-	-	+	-	-	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

สายพันธุ์ แอกติโน มัยซีทีส	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
Nan 3.1	-	-	-	-	-	-	-
Nan 3.2	-	-	-	-	-	-	-
Nan 3.3	-	-	-	-	-	-	-
Nan 3.4	-	-	-	-	-	-	-
Nan 4.1	-	-	-	-	-	-	-
Nan 4.2	-	-	+	-	-	-	-
Nan 4.3	-	-	+	-	-	-	-
Nan 4.4	-	-	+	-	-	-	-
Nan 4.5	-	-	+	-	-	-	-
Nan 4.6	-	-	+	-	-	-	-
Nan 4.7	-	-	+	-	-	-	-
Nan 4.8	-	-	+	-	-	-	-
Nan 4.9	-	-	+	-	-	-	-
Nan 4.10	-	-	-	-	-	-	-
Nan 4.11	-	-	+	-	-	-	-
Nan 4.12	-	-	+	-	-	-	-
Nan 5.1	-	-	+	-	-	-	-
Nan 5.2	-	-	-	-	-	-	-
Nan 5.3	-	-	+	-	-	-	-
Nan 5.4	-	-	+	+	-	-	-
Nan 5.5	-	-	+	-	-	-	-
Nan 5.6	-	-	+	-	-	-	-
Nan 6.1	-	-	+	-	-	-	-
Nan 6.2	-	+++	+++	+++	+++	++	+
Nan 6.3	-	-	+	-	-	-	+
Nan 6.4	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

สายพันธุ์ แอกติโน มัยซีทีส	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
Nan 6.5	-	-	-	-	-	-	-
Nan 6.6	-	-	+	-	-	-	-
Nan 6.7	-	-	+	-	-	-	-
Nan 6.8	-	-	-	-	-	-	-
Nan 6.9	-	-	+++	++	++	-	+
Nan 6.10	-	-	+	-	-	-	-
Nan 6.11	-	-	+	-	-	-	-
Nan 7.1	-	-	+	-	-	-	-
Nan 7.2	-	-	+	-	-	-	-
Nan 7.3	-	-	+	-	-	-	-

หมายเหตุ +++ = ความกว้างของ Inhibition zone 18.2 มิลลิเมตรขึ้นไป
 ++ = ความกว้างของ Inhibition zone 13.1 – 18.1 มิลลิเมตร
 + = ความกว้างของ Inhibition zone 8.0 – 13.0 มิลลิเมตร
 - = ไม่แสดงการยับยั้ง

4.4 จัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

จากการทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบจากแอกติโนมัยซีทีสจำนวน 61 สายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ยับยั้งแบคทีเรียและรา กลุ่มที่ 2 ยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดียว กลุ่มที่ 3 ยับยั้งราอย่างเดียว และกลุ่มที่ 4 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ แสดงดังตารางที่ 4.4 โดยจำนวนสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 จำนวนสายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีทีสที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละกลุ่ม

ขอบเขตการยับยั้งกลุ่ม จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์แอคติโนมัยซีทีส	รวม	เปอร์เซ็นต์
ยับยั้งแบคทีเรีย และรา	Nan 1.3, Nan 6.2, Nan 6.3, Nan 6.9,	4	6.56
ยับยั้งแบคทีเรีย อย่างเดียว	Nan 1.1, Nan 1.2, Nan 1.4, Nan 1.6, Nan 1.7, Nan 1.8, Nan 1.10, Nan 2.1, Nan 2.3, Nan 2.4, Nan 2.5, Nan 2.6, Nan 2.7, Nan 2.8, Nan 2.9, Nan 2.11, Nan 2.12, Nan 2.13, Nan 2.15, Nan 4.2, Nan 4.3, Nan 4.4, Nan 4.5, Nan 4.6, Nan 4.7, Nan 4.8, Nan 4.9, Nan 4.11, Nan 4.12, Nan 5.1, Nan 5.3, Nan 5.4, Nan 5.5, Nan 5.6, Nan 6.1, Nan 6.6, Nan 6.7, Nan 6.10, Nan 6.11, Nan 7.1, Nan 7.2, Nan 7.3,	42	68.85
ยับยั้งราอย่างเดียว	-	0	0
ไม่ยับยั้งทั้งแบคทีเรีย และรา	Nan 1.5, Nan 1.9, Nan 2.2, Nan 2.10, Nan 2.14, Nan 3.1, Nan 3.2, Nan 3.3, Nan 3.4, Nan 4.1, Nan 4.10, Nan 5.2, Nan 6.4, Nan 6.5, Nan 6.8	15	24.59

โดยกลุ่มแบคทีเรียได้แก่

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Escherichia coli ATCC 25922

Bacillus cereus ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 25923

กลุ่มราได้แก่

Candida albicans ATCC 10231

Saccharomyces cerevisiae ATCC 5169

Aspergillus niger ATCC 6275

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า จากจำนวนแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้ทั้งหมด 61 สายพันธุ์ มีแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ 75.41 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจำนวนแอกติโนมัยซีทีสที่ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้มีจำนวน 24.59 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างเดียวมีจำนวนมากที่สุด คือ 68.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในจำนวนนี้ ทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้อย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบเพปติโดไกลแคนไว้ เมมเบรนนี้มีไขมันมากถึง 11-12 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นสารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ (เนงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541)

จากผลการทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่ามีเพียงสายพันธุ์เดียวที่มีขอบเขตการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบได้มากที่สุดถึง 6 ชนิด คือ แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ซึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* *S. aureus* *E. coli* *C. albicans* *S. cerevisiae* และออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อนกับ *A. niger* และยังออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดได้ในระดับสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์นี้ไปทำการศึกษเพิ่มเติมต่อไป

4.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราทดสอบโดยวิธี

Dual Culture

เมื่อนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ซึ่งได้รับการคัดเลือกในขั้นต้นว่ามีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด มาทำการศึกษเพิ่มเติมโดยใช้วิธี Dual Culture โดยทำการทดสอบกับราทดสอบสายพันธุ์เดิมคือ *A. niger* และทดสอบกับราที่ก่อให้เกิดโรคพืช ได้แก่ *Alternaria porri* *Collectotrichum capsici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* *Pythium aphanidermatum* และ *Phytophthora parasitica* ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.1-4.7

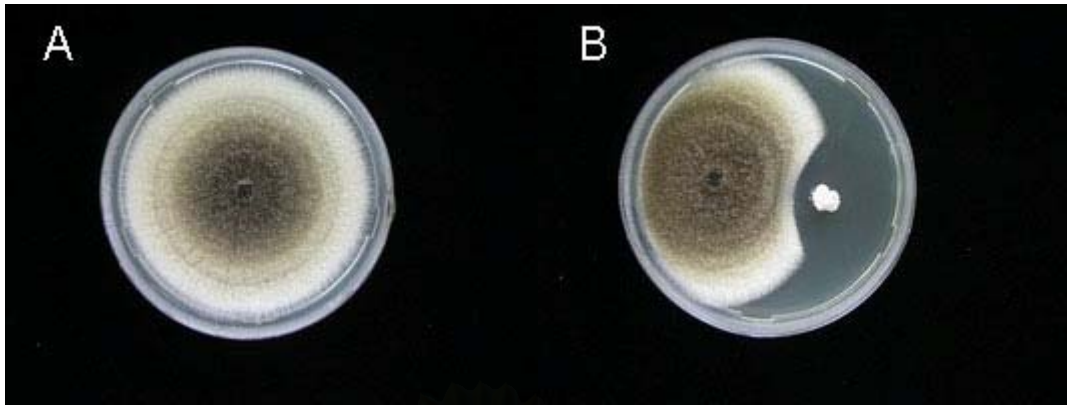
ตารางที่ 4.5 แสดงระยะทางที่เส้นใยของราทดสอบถูกยับยั้งโดยแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2 ($\bar{X} \pm SD$)

ราทดสอบ	$\Delta\gamma$ (มิลลิเมตร)
<i>Aspergillus niger</i>	8.67±0.58
<i>Alternaria porri</i>	10.00±1.00
<i>Collectotrichum capsici</i>	7.33±0.58
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	11.33±0.58
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	11.67±0.58
<i>Pythium aphanidermatum</i>	21.67±0.58
<i>Phytophthora parasitica</i>	11.67±1.53

$\Delta\gamma$ คือ ระยะทางที่เส้นใยของราทดสอบถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอคติโนมัยซีทีส

จากตารางที่ 4.5 แอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคพืชที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 7 ชนิด โดยให้ผลการยับยั้งสูงสุดต่อ *P. aphanidermatum* ซึ่งลักษณะโคโลนีของราทดสอบสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อถูกยับยั้ง แสดงดังรูปที่ 4.1 - 4.7

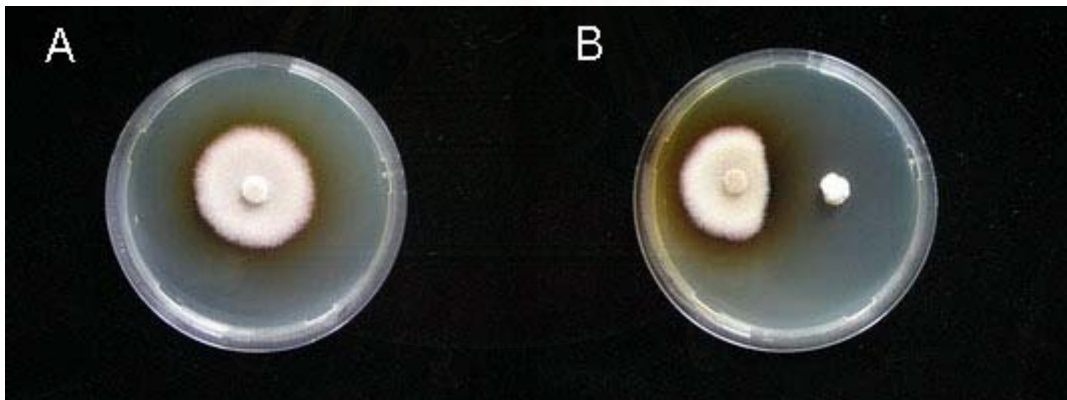
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* โดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Aspergillus niger* ในชุดควบคุม

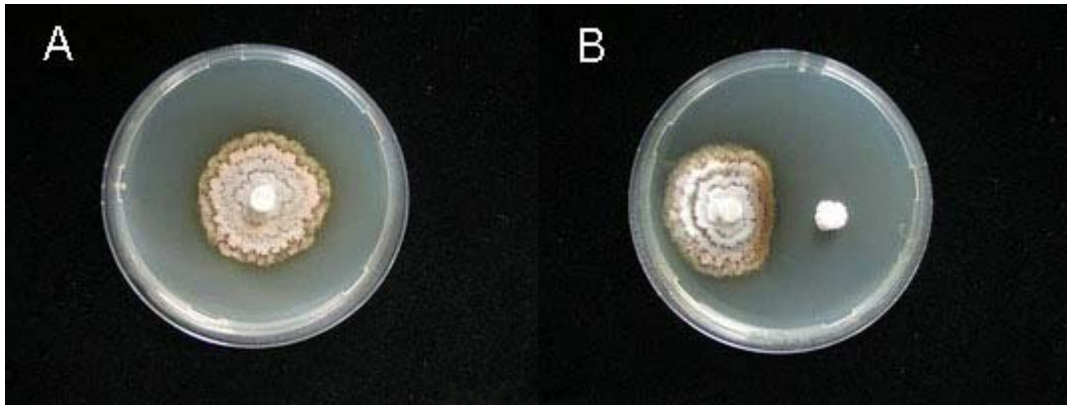
B ลักษณะโคโลนีของ *Aspergillus niger* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2



รูปที่ 4.2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Alternaria porri* โดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Alternaria porri* ในชุดควบคุม

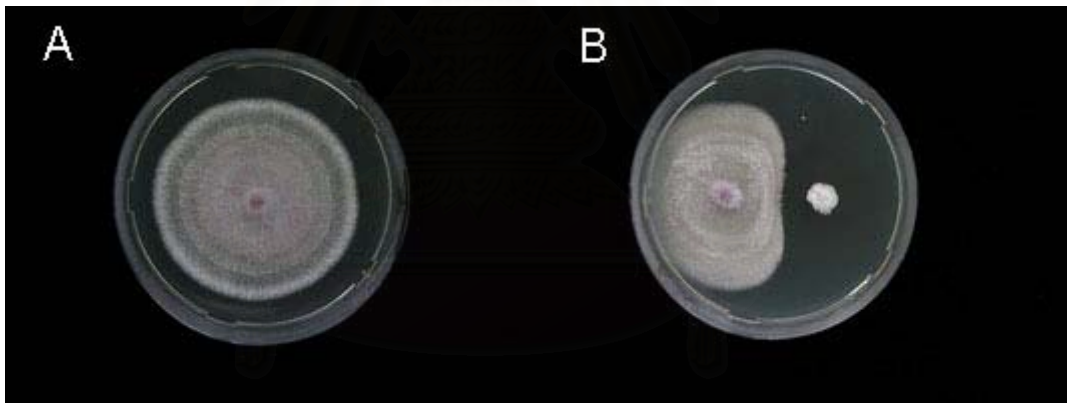
B ลักษณะโคโลนีของ *Alternaria porri* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2



รูปที่ 4.3 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Collectotrichum capsici* โดยแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Collectotrichum capsici* ในชุดควบคุม

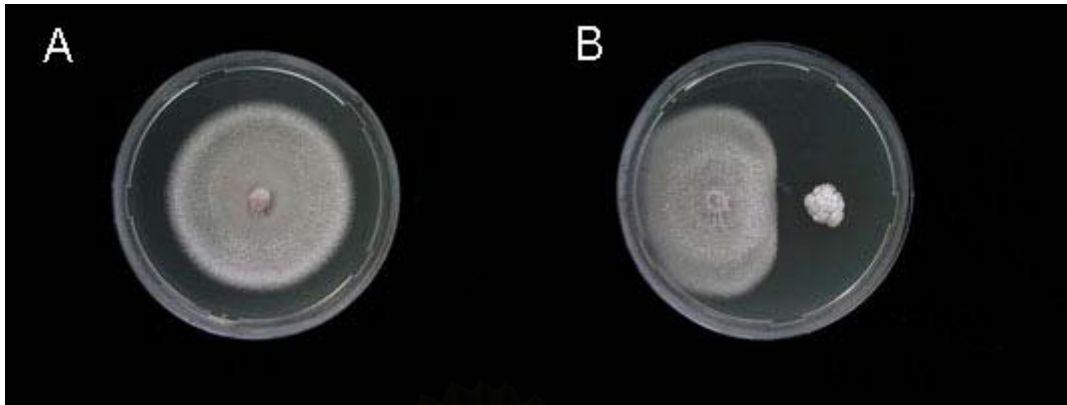
B ลักษณะโคโลนีของ *Collectotrichum capsici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธุ์ Nan 6.2



รูปที่ 4.4 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* โดยแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในชุดควบคุม

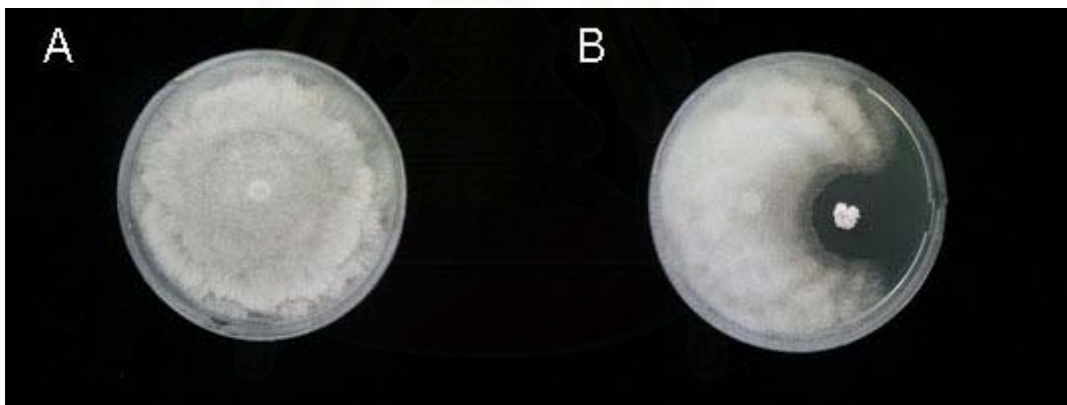
B ลักษณะโคโลนีของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธุ์ Nan 6.2



รูปที่ 4.5 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* โดย
 แอกติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ในชุดควบคุม

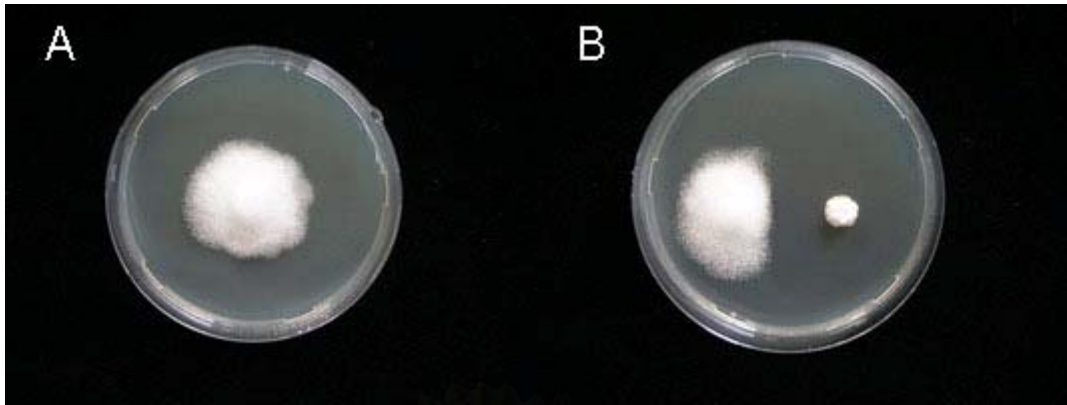
B ลักษณะโคโลนีของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* เมื่อเลี้ยงร่วมกับ
 แอกติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Nan 6.2



รูปที่ 4.6 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Pythium aphanidermatum* โดยแอกติโนมัยซีทีที่
 สายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Pythium aphanidermatum* ในชุดควบคุม

B ลักษณะโคโลนีของ *Pythium aphanidermatum* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีที่
 สายพันธุ์ Nan 6.2

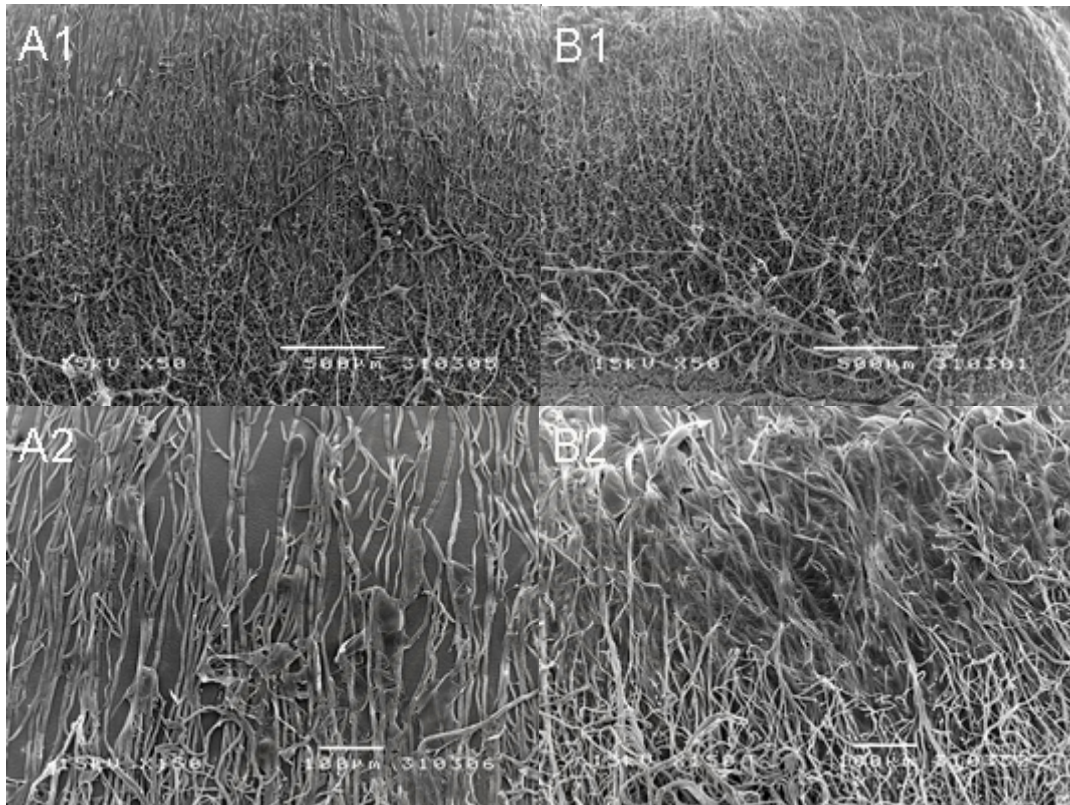


รูปที่ 4.7 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora parasitica* โดยแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Phytophthora parasitica* ในชุดควบคุม

B ลักษณะโคโลนีของ *Phytophthora parasitica* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2

จากรูปที่ 4.1-4.7 แอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคพืชที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 7 ชนิด สังเกตได้จากลักษณะโคโลนีของราทดสอบที่เกิด ส่วนว่าบริเวณที่เจริญเข้าหาโคโลนีของแอคติโนมัยซีทีส โดยเส้นใยส่วนปลายของโคโลนีจะแผ่ ออกในลักษณะที่ถูกจำกัดพื้นที่ ซึ่งต่างกับโคโลนีของราทดสอบในชุดควบคุมที่เส้นใยส่วนปลายของโคโลนีแผ่ออกอย่างอิสระรอบทิศทาง ซึ่งลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันบริเวณเส้นใยส่วนปลายระหว่างราทดสอบในชุดควบคุมกับราทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สามารถเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังแสดงในรูปที่ 4.8-4.14

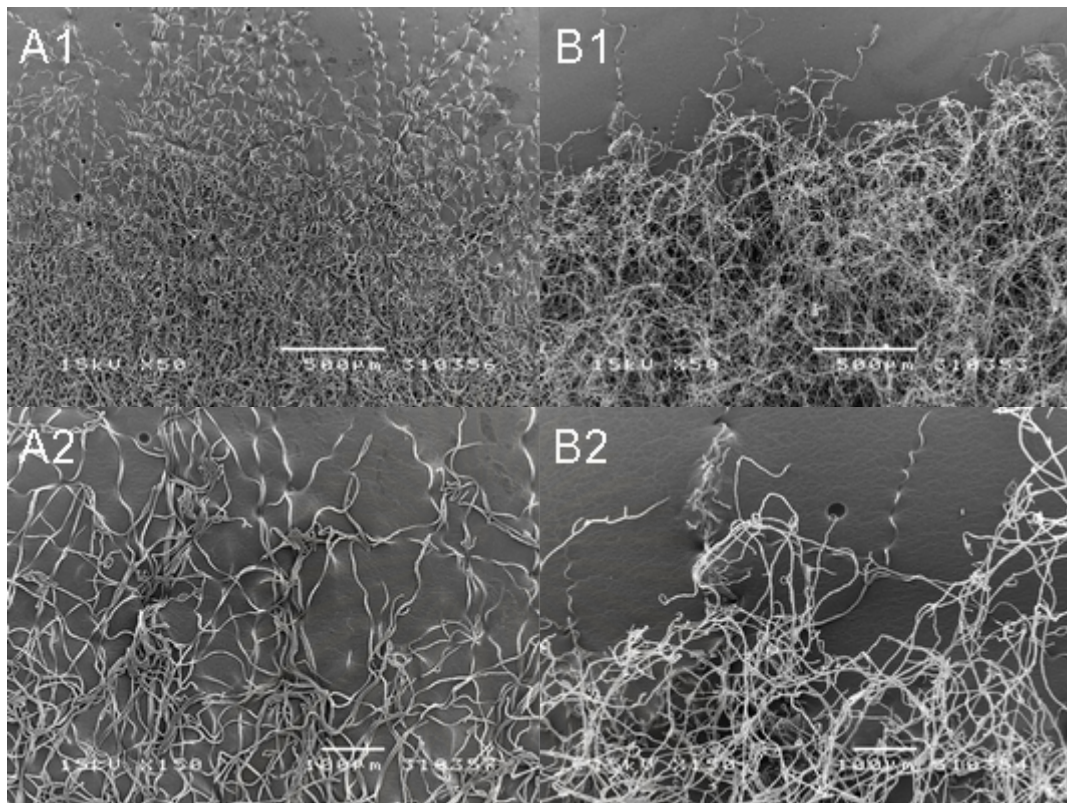


รูปที่ 4.8 ลักษณะเส้นใยของ *Aspergillus niger* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Aspergillus niger* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Aspergillus niger* เมื่อเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

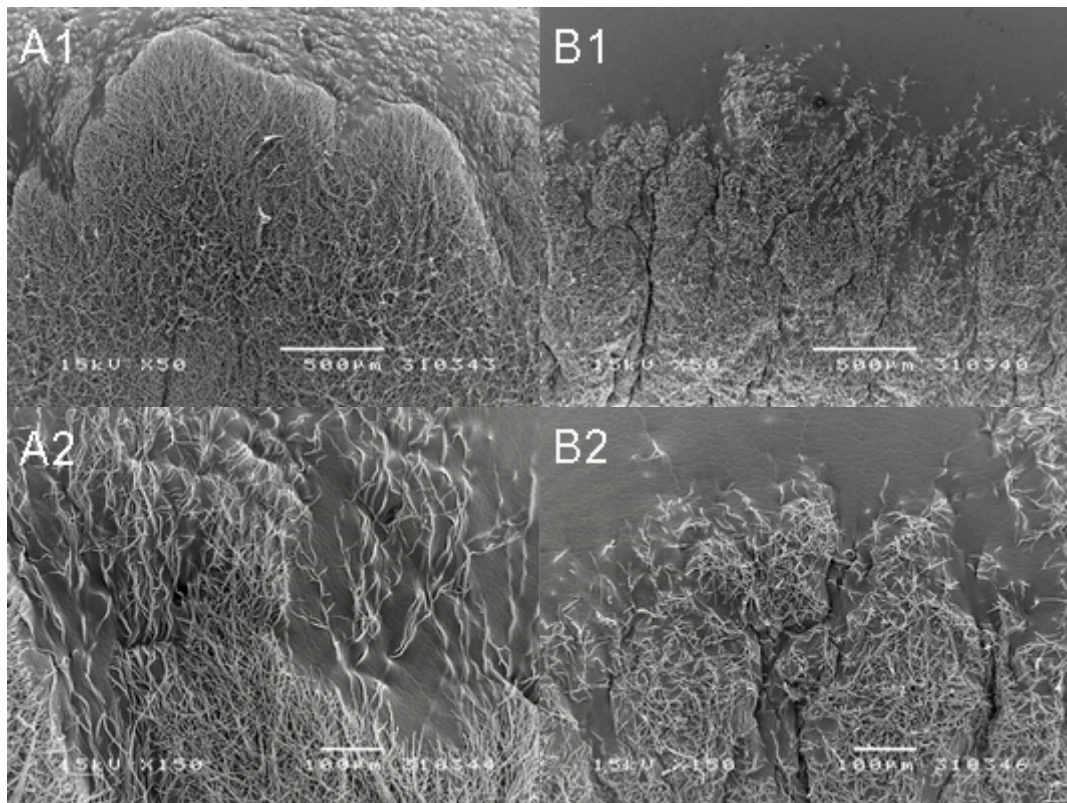
จากรูปที่ 4.8 เส้นใยของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียสายพันธุ์ Nan 6.2 มีการขดตัวหดสั้นและหึ่งงอ ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยสามารถเจริญยืดยาวแผ่ออกไปได้อย่างอิสระ ดังรูป A1 และ A2



รูปที่ 4.9 ลักษณะเส้นใยของ *Alternaria porri* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

- รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Alternaria porri* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)
- รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Alternaria porri* เมื่อเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.9 เส้นใยของ *A. porri* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Nan 6.2 มีการขดตัวและกระจุกตัวรวมกันอย่างหนาแน่น ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยสามารถเจริญยืดยาวแผ่ออกไปได้อย่างอิสระ และอยู่รวมกันอย่างหลวม ๆ ดังรูป A1 และ A2



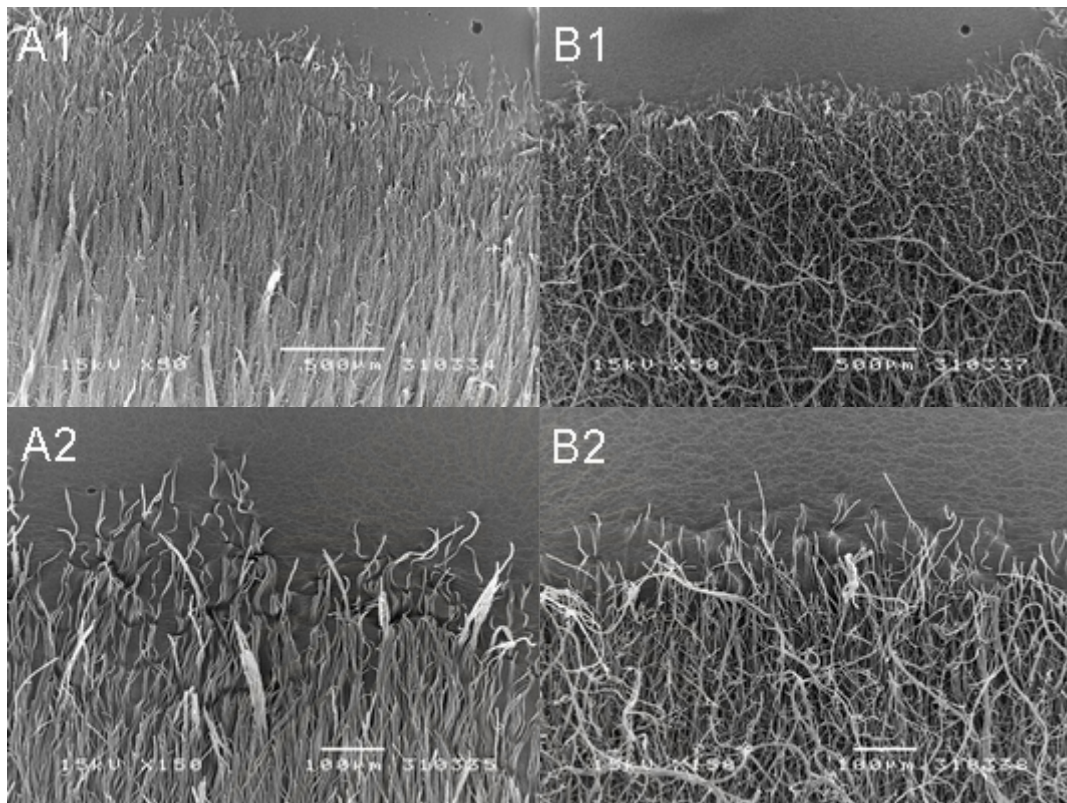
รูปที่ 4.10 ลักษณะเส้นใยของ *Collectotrichum capsici* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Collectotrichum capsici* ในชุดควบคุม
กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Collectotrichum capsici*
เมื่อเลี้ยงร่วมกับ สายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

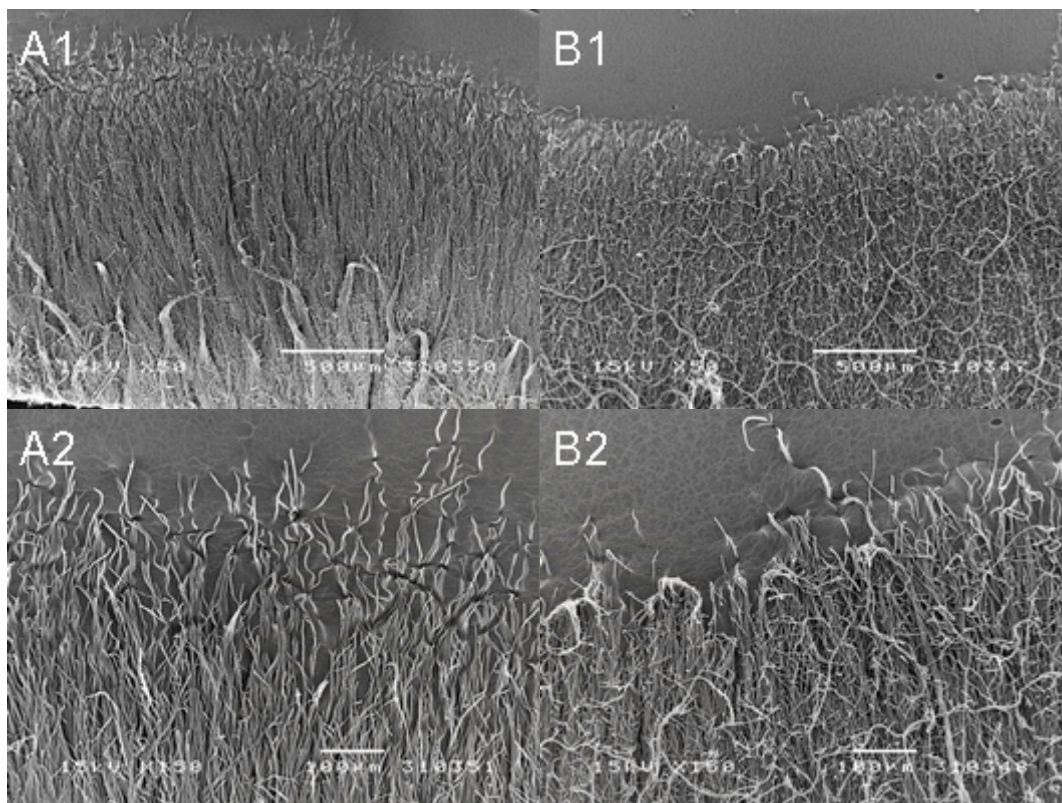
จากรูปที่ 4.10 เส้นใยของ *C. capsici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลักษณะหงิกงอ มีการขดตัวและกระจุกตัวรวมกันอย่างหนาแน่น ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยสามารถเจริญยืดยาวแผ่ออกไปได้อย่างอิสระ และอยู่รวมกันอย่างหลวม ๆ ดังรูป A1 และ A2



รูปที่ 4.11 ลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

- รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)
- รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

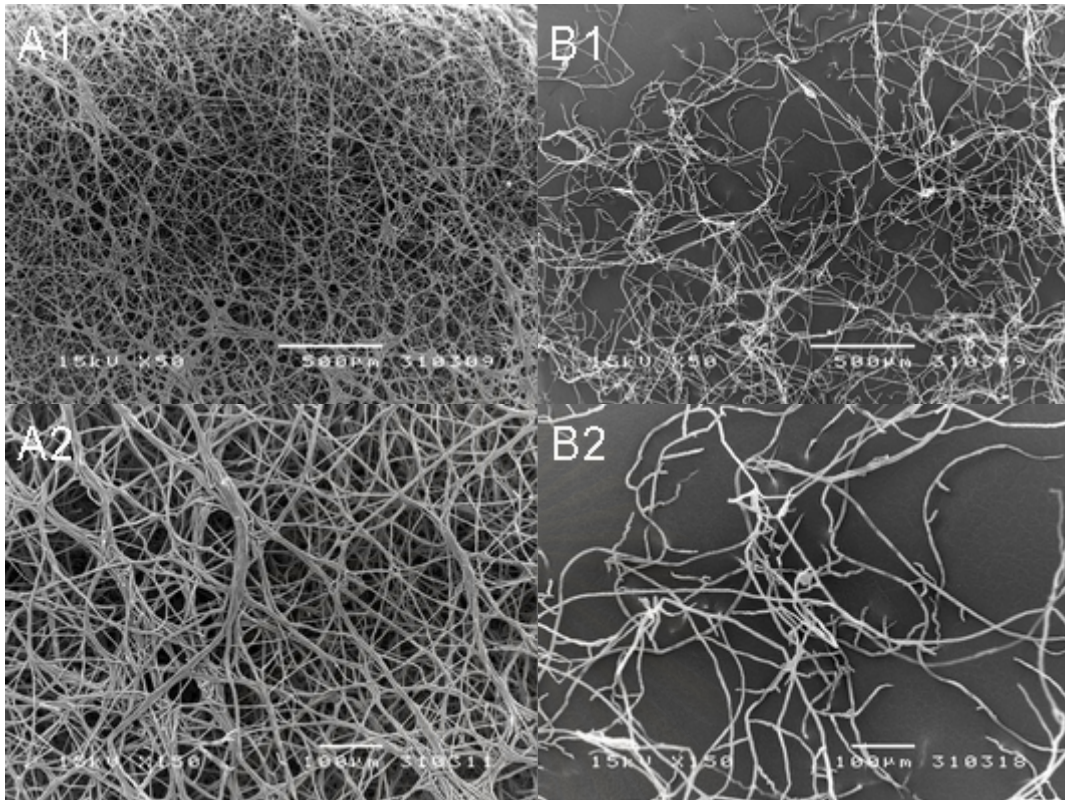
จากรูปที่ 4.11 เส้นใยของ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลักษณะหึ่งงอ มีการหดตัวหดสั้น และกระจุกตัวอยู่รวมกันอย่างไม่เป็นระเบียบ เห็นได้อย่างชัดเจน ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยเจริญแผ่ออกอย่างเป็นระเบียบ เส้นใยบริเวณส่วนปลายเจริญยืดยาวแผ่ออกไปได้อย่างอิสระ ดังรูป A1 และ A2



รูปที่ 4.12 ลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

- รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)
- รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* เมื่อเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.12 เส้นใยของ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลักษณะหึ่งงอ มีการขดตัวหัดสั้นเข้ามารวมกันอย่างหนาแน่นและไม่เป็นระเบียบ เห็นได้อย่างชัดเจน ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยเจริญแผ่ออกอย่างเป็นระเบียบ เส้นใยบริเวณส่วนปลายเจริญยืดยาวออกไปได้อย่างอิสระ ดังรูป A1 และ A2



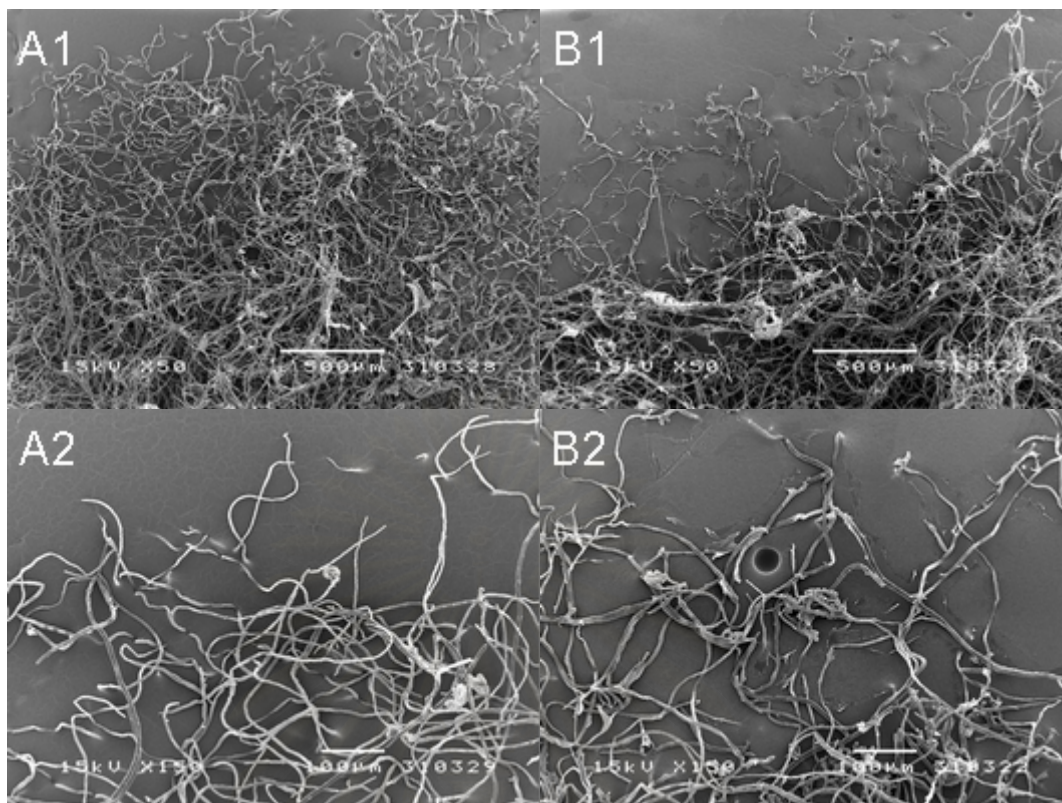
รูปที่ 4.13 ลักษณะเส้นใยของ *Pythium aphanidermatum* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Pythium aphanidermatum* ในชุดควบคุม
กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Pythium*
aphanidermatum เมื่อเลี้ยงร่วมกับ สายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1)
150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.13 เส้นใยของ *P. aphanidermatum* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Nan 6.2 เจริญแบบกระจายตัวอย่างหลวม ๆ ดังรูป B1 และ B2 ในขณะที่เส้นใยในชุดควบคุมเจริญประสานกันอย่างหนาแน่น ดังรูป A1 และ A2



รูปที่ 4.14 ลักษณะเส้นใยของ *Phytophthora parasitica* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Phytophthora parasitica* ในชุดควบคุม
กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Phytophthora parasitica*
เมื่อเลี้ยงร่วมกับ สายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.14 เส้นใยของ *P. parasitica* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลักษณะหักงอและเจริญแบบกระจายตัวอย่างหลวม ๆ ดังรูป B1 และ B2 ในขณะที่เส้นใยในชุดควบคุมเจริญได้ดีและหนาแน่นกว่า ดังรูป A1 และ A2

จากรูปที่ 4.8-4.14 จะเห็นได้ว่าลักษณะเส้นใยส่วนปลายของโคโคนีราทดสอบเมื่อตรวจส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เปรียบเทียบระหว่างราทดสอบในชุดควบคุมกับราทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราทดสอบในแต่ละชนิดมีลักษณะที่เกิดขึ้นหลายลักษณะ เช่น มีการเจริญในลักษณะที่เส้นใยแผ่ออกไม่เต็มที่ (รูปที่ 4.11 และ 4.12) การเจริญของ

เส้นใยน้อยประสานกันกันอย่างหลวม ๆ (รูปที่ 4.13) เส้นใยมีลักษณะหึ่งงอเป็นกระจุกรวมกัน เนื่องจากถูกจำกัดพื้นที่ในการเจริญ (รูปที่ 4.9 และ 4.10) ทั้งนี้เนื่องจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งรบกวนแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งออกมา ทำให้รบกวนทดสอบไม่สามารถเจริญในบริเวณนี้ได้

จากผลการทดสอบข้างต้นเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่มีขอบเขตการยับยั้งกว้างที่สุด คือสามารถยับยั้งจำนวนสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทดสอบได้มากที่สุด และให้การยับยั้งในระดับสูง สามารถคัดเลือกได้แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมขั้นต้นในการผลิตสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกนี้

4.6 การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงและสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

เมื่อทำการเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด คือ ISP2 SCB SCYB NB MEB และ SSB ครบ 10 วันแล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปกรองเอาเส้นใยออกทั้ง 3 ชุด จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยชุดแรกสกัดโดย เอทิลแอลกอฮอล์ ชุดที่ 2 สกัดโดย เมทานอล และชุดที่ 3 สกัดโดย เฮกเซน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ชุด ไปทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ โดยใช้ถ้วยสเตนเลสเป็นภาชนะใส่สารสกัดทดสอบ ได้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.6 - 4.7

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจาก
น้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ชนิดต่าง ๆ
มาสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้งด้วยสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ (มิลลิเมตร)					
	ISP2	SCB	SCYB	NB	MEB	SSB
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0 c	0 c	0 c	0 c	13.67 a	11.33 b
<i>B. cereus</i> ATCC 6633	0 b	0 b	0 b	0 b	11.33 a	11.33 a
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0 c	0 c	0 c	0 c	11.67 b	13.67 a
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0 c	0 c	0 c	0 c	10.33 b	14.00 a
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	0 c	0 c	0 c	0 c	16.33 b	22.00 a
<i>A. niger</i> ATCC 6275	0 c	0 c	0 c	0 c	12.67 b	17.67 a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลขในแนวนอน เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติแบบมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ISP2 (Yeast-malt extract broth) SCB (Sodium caseinate broth) SCYB (Sodium caseinate yeast extract broth) NB (Nutrient broth) MEB (Malt extract broth) SSB (Soluble starch broth)

จากตารางที่ 4.6 เมื่อนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one way anova พบว่า เมื่อพิจารณาข้อมูลในแนวนอนสามารถแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหารแต่ละชนิด พบว่า ในอาหาร SSB มีกลุ่มค่าเฉลี่ยของการยับยั้งที่สูงที่สุด อยู่มากที่สุด ดังนั้น

เมื่อต้องการสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ อาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงมากที่สุดคือ SSB

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจาก น้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ชนิดต่าง ๆ มาสกัดด้วยเมทานอล

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้งด้วยสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ (มิลลิเมตร)					
	ISP2	SCB	SCYB	NB	MEB	SSB
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0 c	0 c	0 c	0 c	10.67 b	13.00 a
<i>B. cereus</i> ATCC 6633	10.67 c	0 d	0 d	0 d	12.33 b	17.00 a
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10.00 b	0 c	0 c	0 c	10.00 b	21.67
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	14.67 a	0 c	0 c	0 c	12.67 a	10.33 b
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	14.67 c	0 d	0 d	0 d	16.67 b	25.00 a
<i>A. niger</i> ATCC 6275	16.33 b	10.00 d	0 e	0 e	13.67 c	18.33 a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลขในแนวนอน เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติแบบมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ISP2 (Yeast-malt extract broth) SCB (Sodium caseinate broth) SCYB (Sodium caseinate yeast extract broth) NB (Nutrient broth) MEB (Malt extract broth) SSB (Soluble starch broth)

จากตารางที่ 4.7 เมื่อนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one way anova พบว่า เมื่อพิจารณาข้อมูลในแนวนอนสามารถแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งได้แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหารแต่ละชนิด พบว่า ในอาหาร SSB มีกลุ่มค่าเฉลี่ยของการยับยั้งที่สูงที่สุด อยู่มากที่สุด โดยให้ค่าการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสูงที่สุดถึง 5 ชนิด ดังนั้นเมื่อต้องการสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ด้วยเมทานอล อาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงมากที่สุดคือ SSB

ส่วนการใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน ในการสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 6 ชนิด ไม่ปรากฏผลยับยั้งในจุลินทรีย์ทดสอบทุกสายพันธุ์

จากผลการคัดเลือก SSB เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ Nan 6.2 โดยให้ขอบเขตและค่าการยับยั้งสูงสุด ทั้งที่ใช้เอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลเป็นตัวทำละลาย และเมื่อใช้วิธีทางสถิติวิเคราะห์ผลเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการใช้สกัดสารปฏิชีวนะจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์และสารสกัดจากเมทานอลเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหาร SSB (Soluble starch broth)

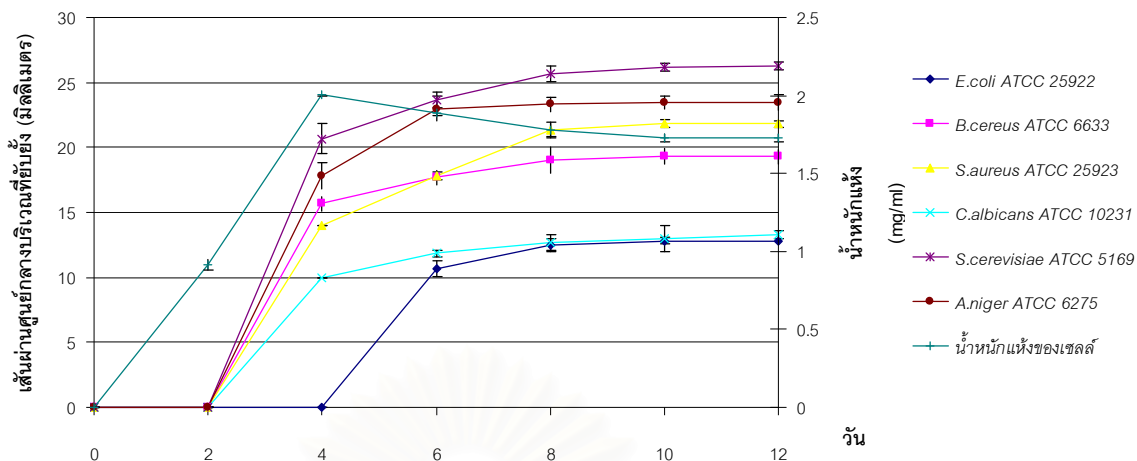
จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้งด้วยสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (มิลลิเมตร)	
	สารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์	สารสกัดจากเมทานอล
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0 g	0 g
<i>E. coli</i> ATCC 25922	11.33 ef	13.00 de
<i>B. cereus</i> ATCC 6633	11.33 ef	17.00 c
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	13.67 d	21.67 b
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	14.00 d	10.33 f
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169	22.00 b	25.00 a
<i>A. niger</i> ATCC 6275	17.67 c	18.33 c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลข เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ ทั้งทางแนวตั้งและแนวนอน ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติแบบมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 4.8 เมื่อนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one way anova พบว่า เมื่อพิจารณาข้อมูลทั้งหมดสามารถแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งได้แตกต่างกัน โดยเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหาร SSB (Soluble starch broth) พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ Nan 6.2 คือ เมทานอล เนื่องจากมีกลุ่มของค่าเฉลี่ยการยับยั้งในระดับสูงมากที่สุด กล่าวคือ สารสกัดจากเมทานอลออกฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิดได้ในระดับสูงสุด เมื่อเทียบกับสารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์ และเฮกเซน โดยสามารถยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*), แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*), ยีสต์ (*S. cerevisiae* และ *C. albican*) และ รา (*A. niger*) ในขณะที่เอทิลแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายสารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งในระดับสูงรองลงมา ส่วนเฮกเซนไม่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ออกมาได้เลย

4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

จากการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหารเหลว Soluble Starch Broth (SSB) โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 2 4 6 8 10 และ 12 ตามลำดับ นำน้ำเลี้ยงเชื้อมารองแยกเส้นใย และหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดด้วยเมทานอลแล้วนำมาทดสอบ พบว่าสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด คือ *B. cereus* *S. aureus* *E. coli* *S. cerevisiae* *C. albican* และ *A. niger* ซึ่งปริมาณสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างออกมาขึ้นอยู่กับเวลาในการเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 จากกราฟพบว่าการเจริญของเชื้อ 4 วันแรกเป็นระยะ log phase จากนั้น เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากวันที่ 4 เป็นต้นไป การสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรียทดสอบส่วนใหญ่ สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 4 สำหรับสารยับยั้ง *E. coli* เริ่มสร้างหลังวันที่ 4 เป็นต้นไป และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงประมาณวันที่ 10 ซึ่งมีปริมาณสูงสุดและจะคงที่เรื่อยไป ดังนั้นในการเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะควรใช้เวลาอย่างน้อย 10 วัน

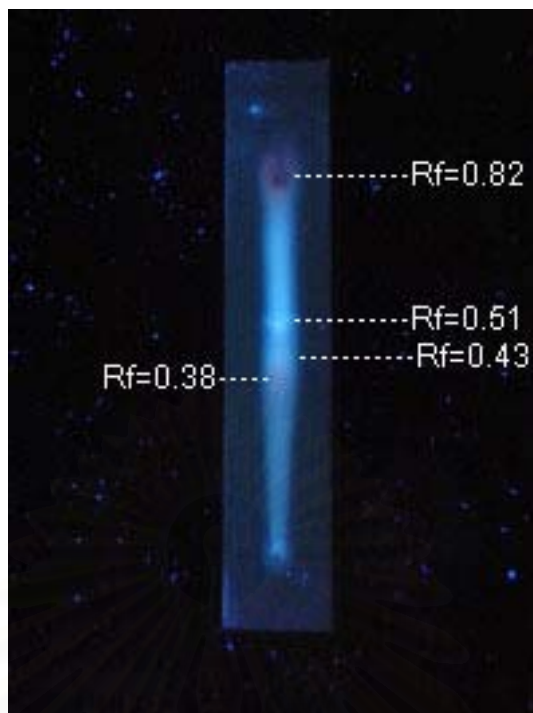


รูปที่ 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีที่สายพันธุ์ Nan 6.2 (ค่าเฉลี่ย \pm SD)

4.8 การแยกสารปฏิชีวนะเบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ทำการแยกสารสกัดโดยใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น Silica gel60 F₂₅₄ โดยนำสารสกัดที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ SSB ที่เพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีที่สายพันธุ์ Nan 6.2 เป็นเวลา 10 วัน ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่น TLC แล้วนำไป develop ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลในอัตราส่วน 3:2 โดยสารสกัดจากสายพันธุ์ Nan 6.2 ปรากฏตำแหน่งของสารออกมา 4 ตำแหน่งเมื่อตรวจสอบด้วยรังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร มีค่า Rf เท่ากับ 0.38 0.43 0.51 และ 0.82 ดังแสดงในรูปที่ 4.16

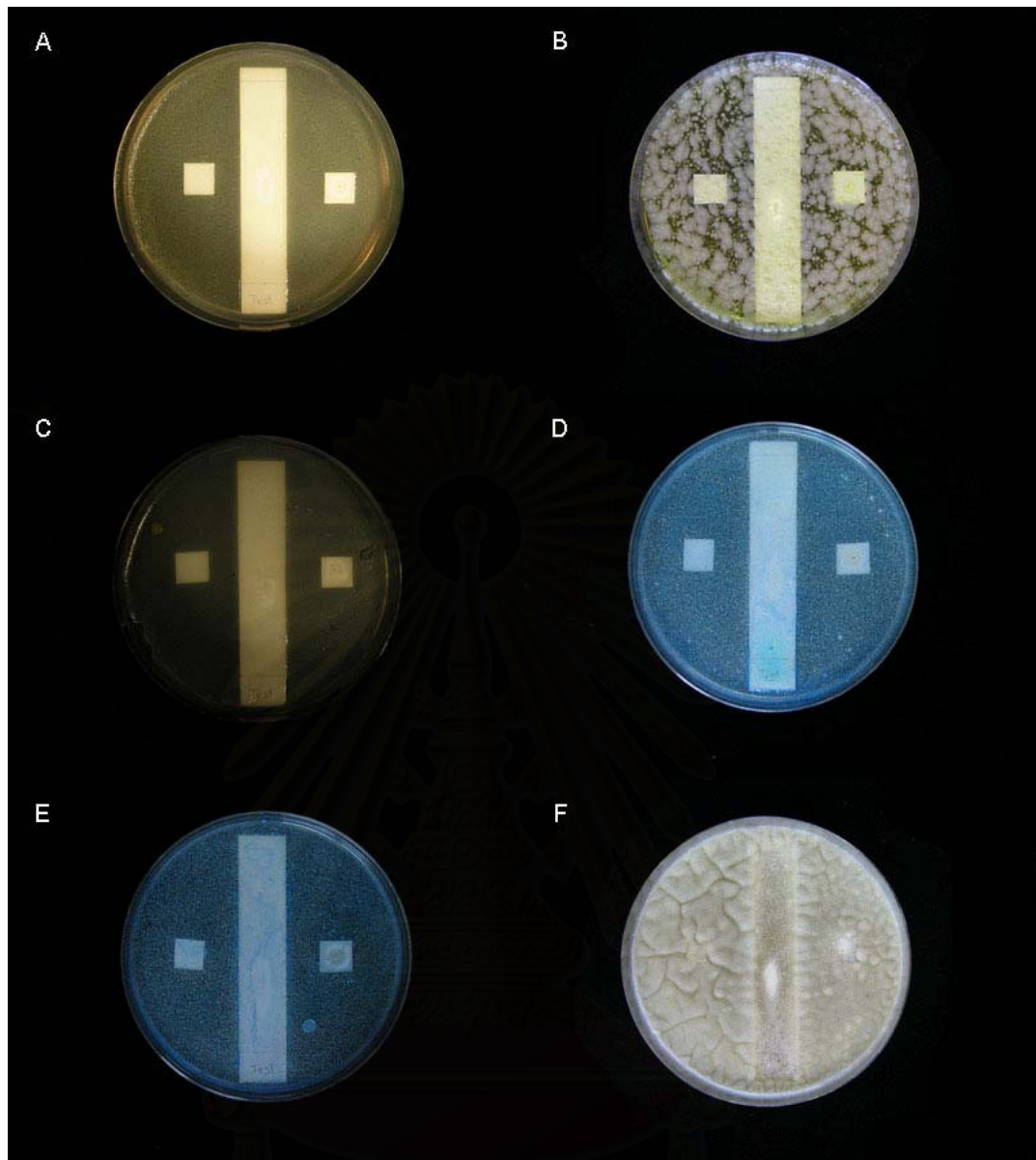
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.16 แสดงการแยกสารสกัดจากสายพันธุ์ Nan 6.2 โดยใช้แผ่น TLC ตรวจสอบภายใต้รังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

เมื่อนำแผ่น TLC ที่แยกสารได้นี้ไปทดสอบหาตำแหน่งของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่าบริเวณของ Rf 3 ตำแหน่ง เท่านั้น คือ 0.38 0.43 และ 0.51 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยยับยั้ง *B. cereus* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *C. albicans* ATCC 10231 *S. cerevisiae* ATCC 5169 และ *A. niger* ATCC 6275 ดังแสดงในรูปที่ 4.17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.17 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Nan 6.2 ที่แยกได้ขึ้นต้นด้วยแผ่น TLC

A ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *E. coli* ATCC 25922

B ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *B. cereus* ATCC 6633

C ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *S. aureus* ATCC 25923

D ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *C. albicans* ATCC 10231

E ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *S. cerevisiae* ATCC 5169

F ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *A. niger* ATCC 6275

โดยแผ่น TLC ชั้นเล็ก ทางซ้ายและขวา เป็นชุดควบคุมผลลบ (แผ่น TLC ที่ไม่ได้หยดสารสกัด) และชุดควบคุมผลบวก (แผ่น TLC หยดสารสกัดแต่ไม่ผ่านการชะด้วยตัวทำละลาย) ตามลำดับ

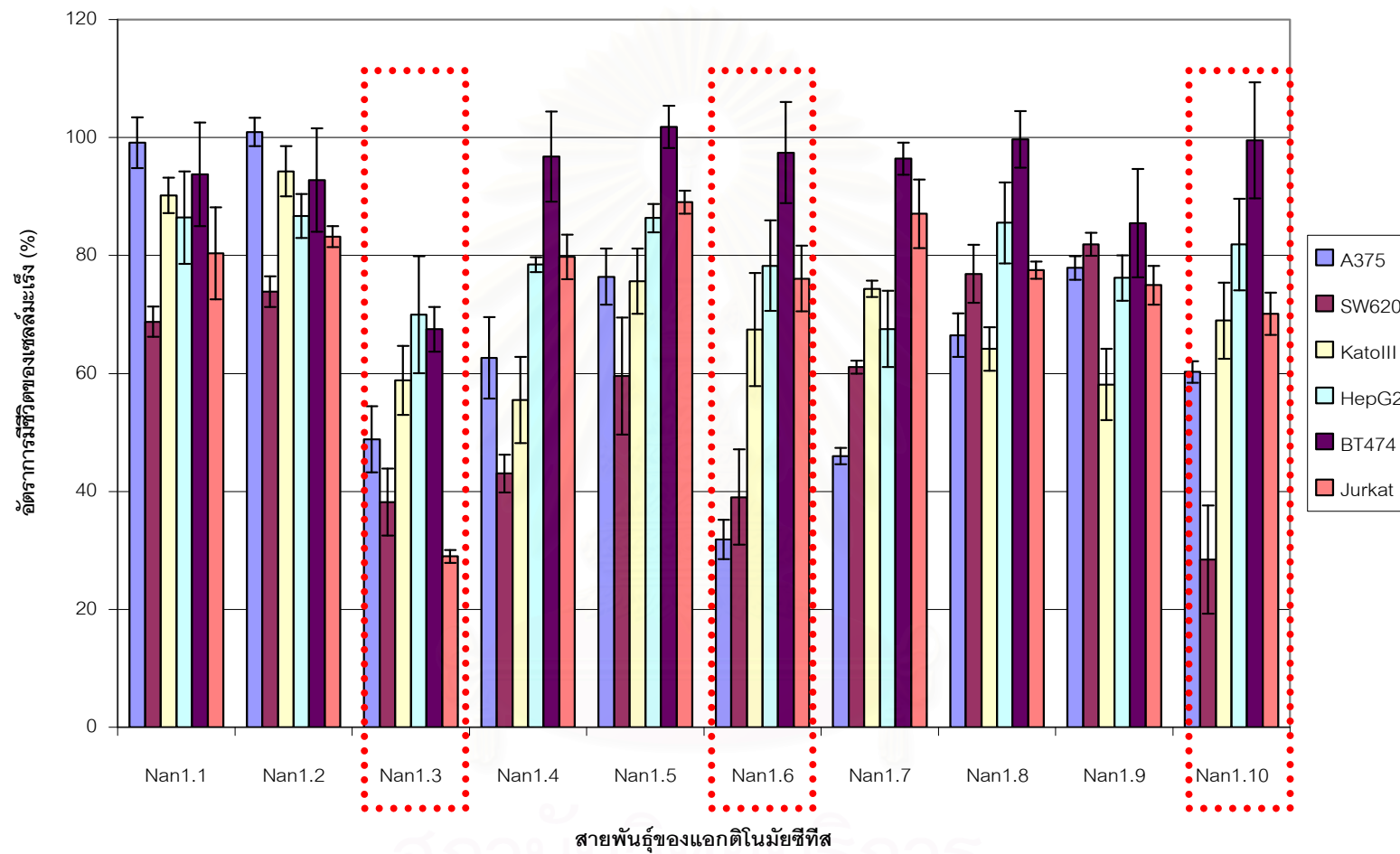
4.9 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งมนุษย์

นำแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด 61 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) เป็นเวลา 10 วัน สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ออก และละลายสารสกัดด้วยสารละลาย 25%DMSO ได้สารสกัดทั้งหมด 61 ชนิด นำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT กับเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ (Human tumour cell lines) 6 ชนิด ดังนี้

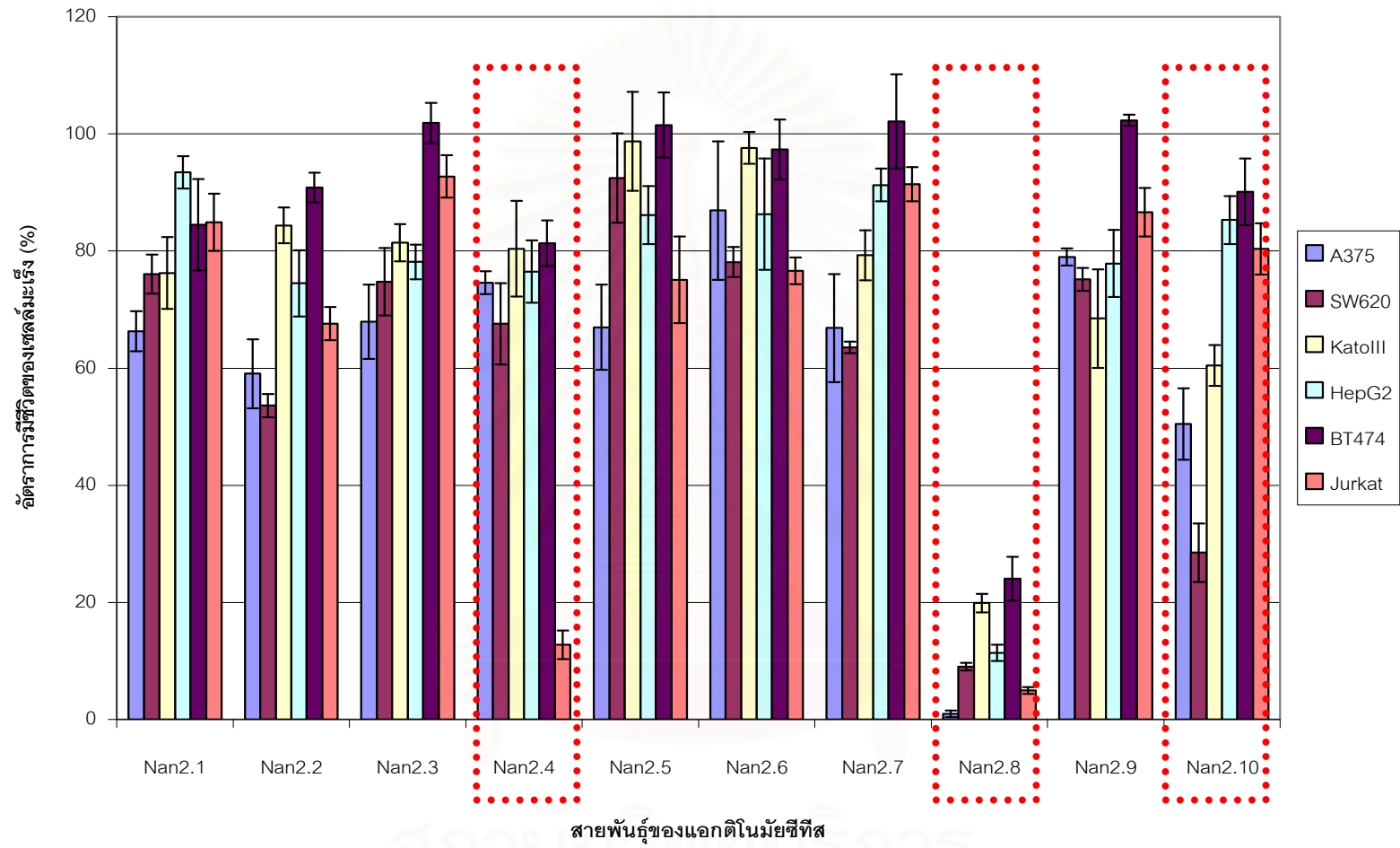
A375	(Human malignant melanoma)	ATCCno.CRL-1619
SW620	(Human colorectal adenocarcinoma)	ATCCno.CCL-227
KatoIII	(Human gastric carcinoma)	ATCCno.HTB-103
HepG2	(Human hepatocellular carcinoma)	ATCCno.HB-8065
BT474	(Human ductal carcinoma)	ATCCno.HTB-20
Jurkat	(Human acute T cell leukemia)	ATCCno.CRL-2063

พบว่าแอกติโนมัยซีทีสแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.18

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

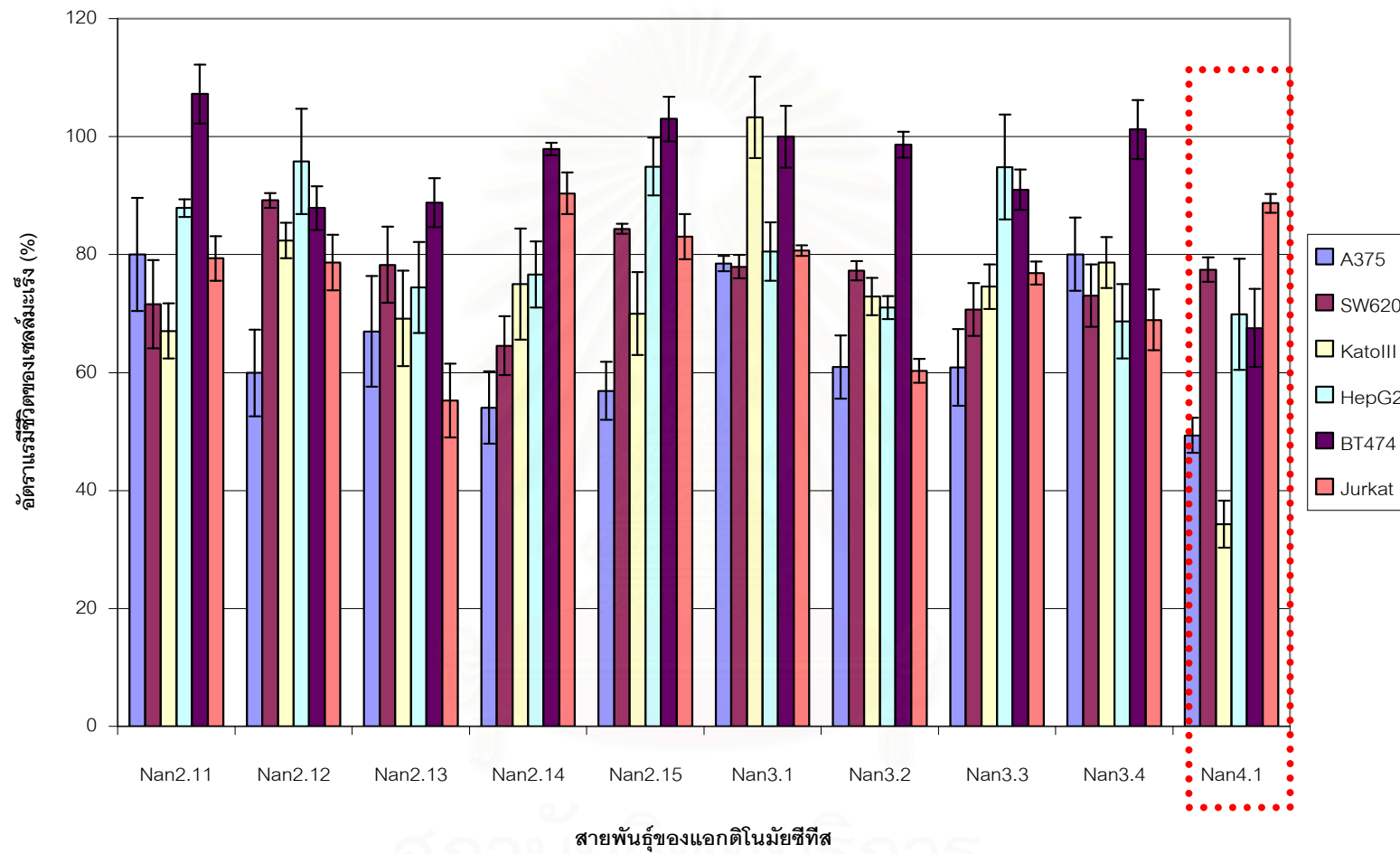


รูปที่ 4.18 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ต่าง ๆ

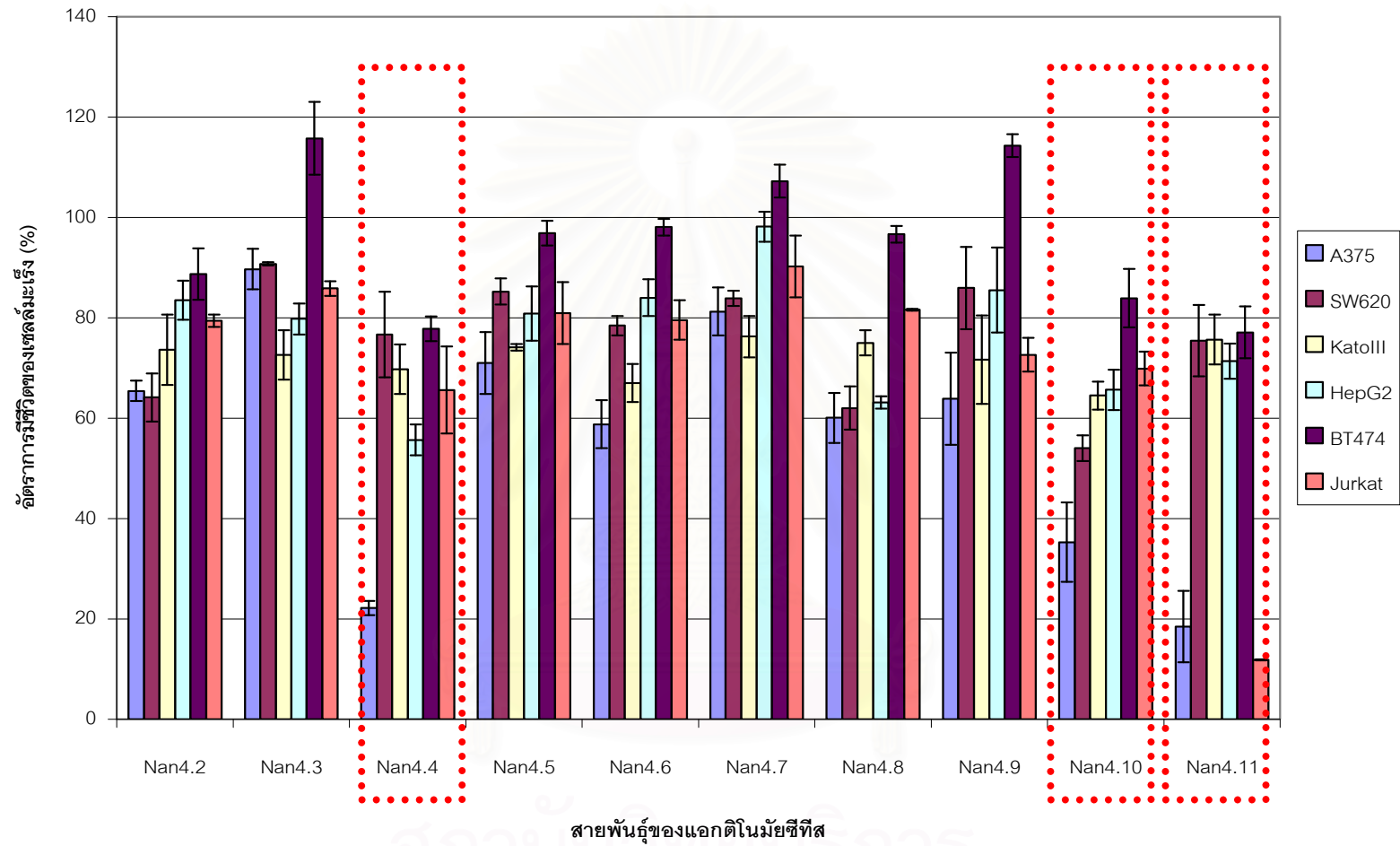


รูปที่ 4.18 (ต่อ)

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

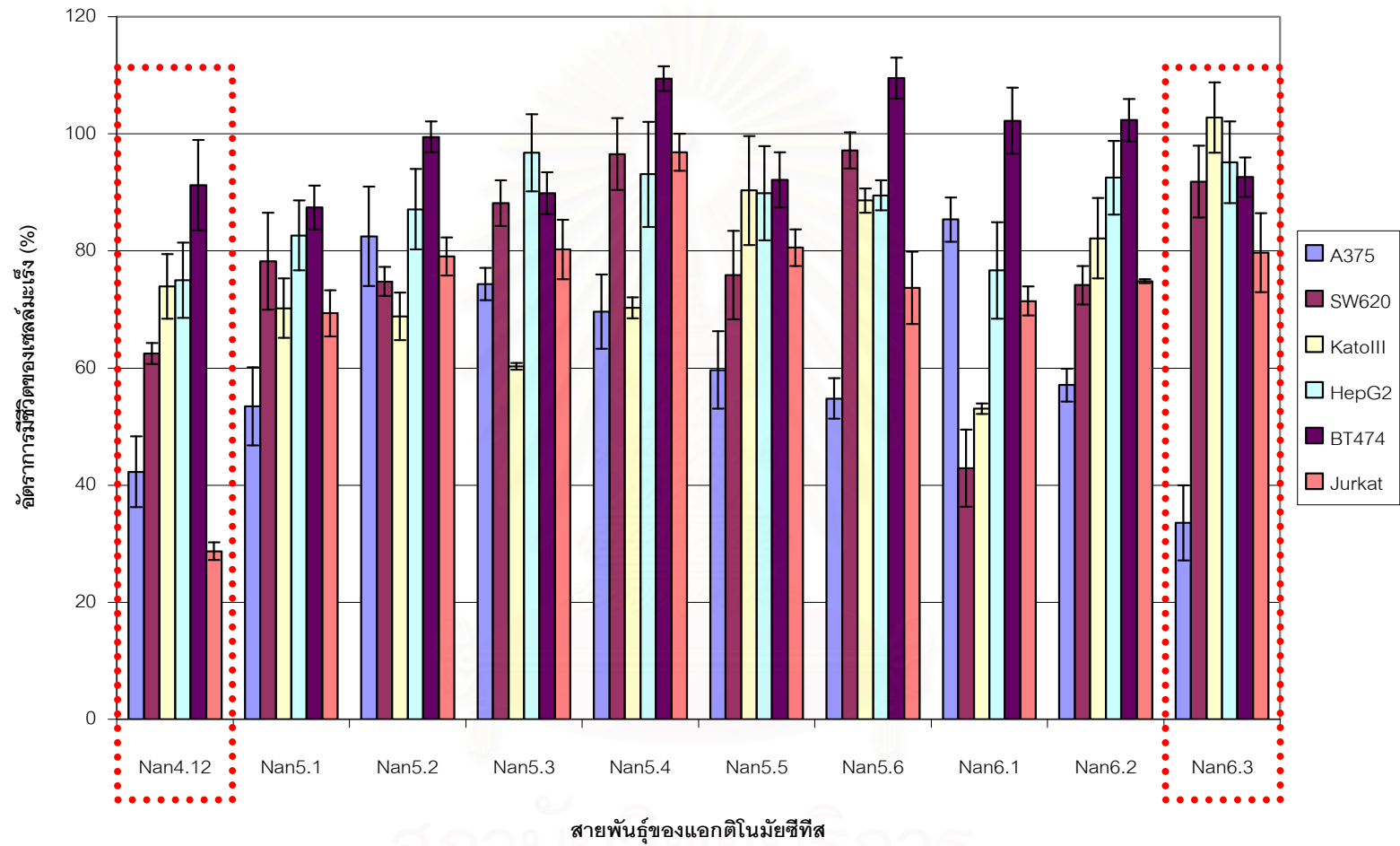


รูปที่ 4.18 (ต่อ)



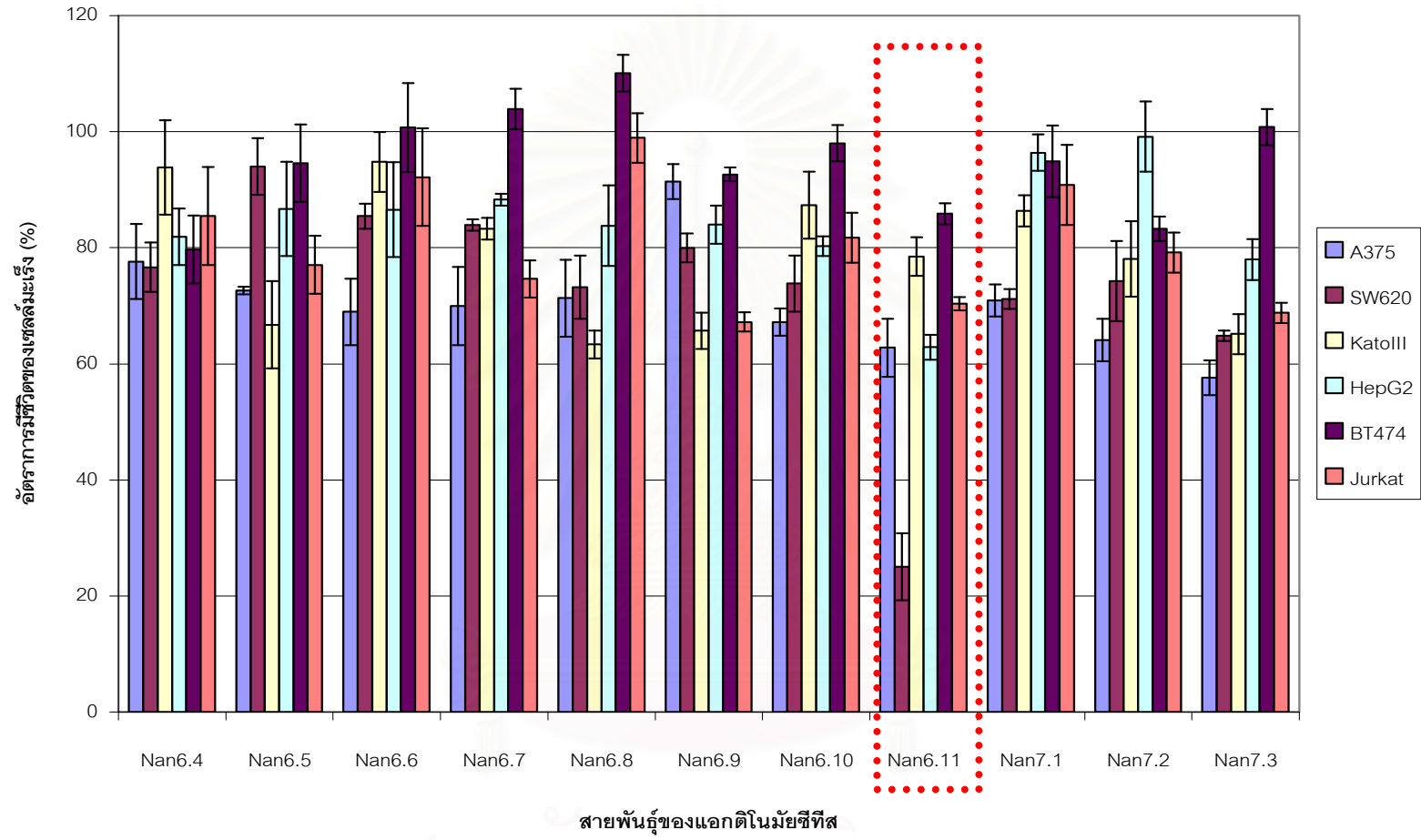
รูปที่ 4.18 (ต่อ)

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 (ต่อ)

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 (ต่อ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.10 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

จากการทดสอบการสร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ของแอกติโนมัยซีทีสทั้งหมด 61 สายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยซีทีสตามความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก คือ สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่สอง คือ สายพันธุ์ที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงการจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสที่นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

ขอบเขตความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีส	รวม	%
ทำให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์	Nan 1.3, Nan 1.6, Nan 1.10, Nan 2.4, Nan 2.8, Nan 2.10, Nan 4.1, Nan 4.4 Nan 4.10 Nan 4.11, Nan 4.12, Nan 6.3, Nan 6.11	13	21.31
ทำให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการมีชีวิตมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์	Nan 1.1, Nan 1.2, Nan 1.4, Nan 1.5, Nan 1.7, Nan 1.8, Nan 1.9, Nan 2.1, Nan 2.2, Nan 2.3, Nan 2.5, Nan 2.6, Nan 2.7, Nan 2.9, Nan2.11, Nan 2.12, Nan 2.13, Nan 2.14, Nan 2.15, Nan 3.1, Nan 3.2, Nan 3.3, Nan 3.4, Nan 4.2 Nan 4.3, Nan 4.5, Nan 4.6, Nan 4.7, Nan 4.8, Nan 4.9, Nan 5.1, Nan 5.2, Nan 5.3, Nan 5.4, Nan 5.5, Nan 5.6, Nan 6.1, Nan 6.2, Nan 6.4, Nan 6.5, Nan 6.6, Nan 6.7, Nan 6.8, Nan 6.9, Nan 6.10, Nan 7.1, Nan 7.2, Nan 7.3	48	78.69

จากตารางที่ 4.9 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนทั้งหมด 13 สายพันธุ์ คิดเป็น 21.31 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้ ซึ่งในการทดลองนี้สนใจสายพันธุ์ในกลุ่มแรก เนื่องจากเป็นกลุ่มที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในระดับสูง นำเอกติโนมัยซีทีในกลุ่มแรกนี้มาจัดกลุ่มโดยแบ่งตามการออกฤทธิ์ต่อชนิดของเซลล์มะเร็ง ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 สรุปจำนวนสายพันธุ์ของเอกติโนมัยซีทีในกลุ่มที่สร้างสารที่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ โดยทำให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มสารสกัดกับเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตามชนิดของเซลล์มะเร็ง (ค่าเฉลี่ย \pm SD)

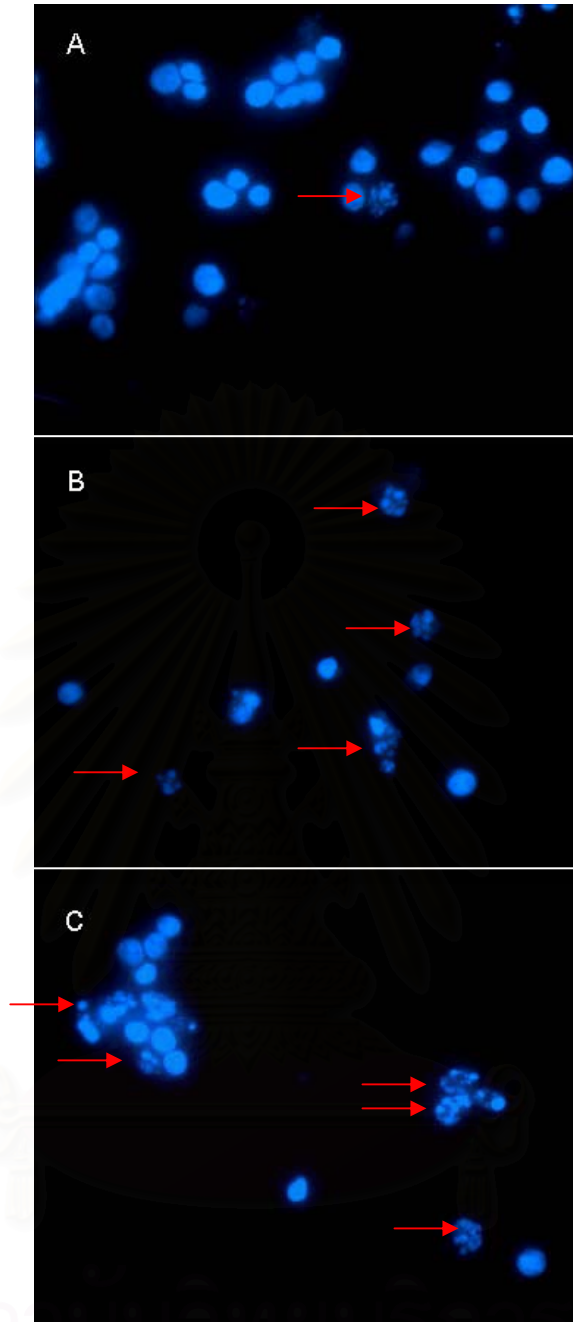
สายพันธุ์เอกติโนมัยซีที	อัตราการมีชีวิตของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ (เปอร์เซ็นต์)					
	A375 Malignant	SW620 Colorectal	KatoIII Gastric	HepG2 Liver	BT474 Breast	Jurkat T cell
Nan 1.3	> 40	38.21 \pm 5.70	> 40	> 40	> 40	28.98 \pm 1.80
Nan 1.6	31.85 \pm 3.32	39.03 \pm 8.06	> 40	> 40	> 40	> 40
Nan 1.10	> 40	28.43 \pm 9.18	> 40	> 40	> 40	> 40
Nan 2.4	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	12.77 \pm 2.44
Nan 2.8	0.99 \pm 0.55	9.01 \pm 0.66	19.87 \pm 1.56	11.38 \pm 1.40	24.05 \pm 3.75	4.95 \pm 0.54
Nan 2.10	> 40	28.49 \pm 5.00	> 40	> 40	> 40	> 40
Nan 4.1	> 40	> 40	34.28 \pm 3.95	> 40	> 40	> 40
Nan 4.4	22.16 \pm 1.41	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
Nan 4.10	35.28 \pm 7.93	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
Nan 4.11	18.49 \pm 7.14	> 40	> 40	> 40	> 40	11.85 \pm 0.10
Nan 4.12	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	28.69 \pm 1.49
Nan 6.3	33.53 \pm 6.43	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
Nan 6.11	> 40	25.04 \pm 5.75	> 40	> 40	> 40	> 40

จากตารางที่ 4.10 สารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan2.8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ทั้ง 6 ชนิด นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้มากกว่าชนิดเดียว เช่น สายพันธุ์ Nan4.11 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งผิวหนัง (Malignant : A375) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (T cell : Jurkat) เป็นต้น

แต่คุณสมบัติของการเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ได้นั้น ควรที่จะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แบบจำเพาะ จากตารางที่ 4.10 มีสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งชนิดเดียวถึง 9 สายพันธุ์ คิดเป็น 14.75 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้ทั้งหมด โดยสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แบบจำเพาะและออกฤทธิ์ยับยั้งได้ในระดับสูงสุด คือ สายพันธุ์ Nan 2.4 โดยทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 12.77 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์นี้ เพื่อนำไปศึกษาต่อการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis ต่อไป

4.11 การศึกษาผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342

เพื่อศึกษาว่าสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ทำลายเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิสหรือไม่ จึงทำการศึกษาผลของสารสกัดต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat ATCCno.CRL-2063) พบว่าสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิส โดยมีเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิส 72.29 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลดังรูปที่ 4.19 และ 4.20

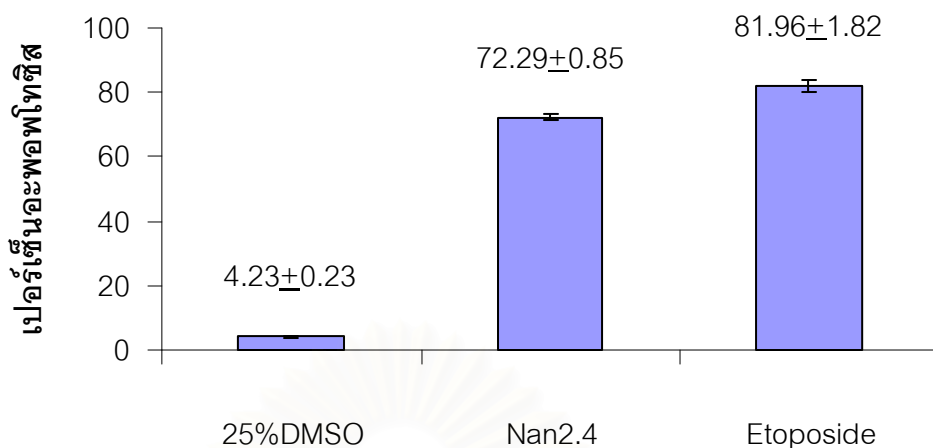


รูปที่ 4.19 ผลของสารสกัดจากแอคติโนมัซซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ Jurkat ATCCno.CRL-2063 เมื่อบ่มสารสกัดกับเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 200 เท่า

A. เดิมสารละลาย 25%DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นชุดเซลล์ผลลบควบคุม

B. เดิมสารสกัดจากแอคติโนมัซซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

C. เดิม Etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นชุดเซลล์ผลบวกควบคุม [เครื่องหมายลูกศรชี้ (—→) คือเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส]



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงผลของสารสกัดจากแอนติโนมัยซีที่สลายพันธุ์ Nan 2.4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง Jurkat เปรียบเทียบกับ สาร Etoposide เป็นชุดควบคุมบวก และสารละลาย 25%DMSO เป็นชุดควบคุมลบ (ค่าเฉลี่ย \pm SD)

จากรูปที่ 4.19 สารสกัดจากแอนติโนมัยซีที่สลายพันธุ์ Nan 2.4 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิส สังเกตได้จากนิวเคลียสภายในเซลล์แยกออกเป็น ส่วน ๆ ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งได้รับการกระตุ้นจากสารสกัดที่ทดสอบแล้วเซลล์เกิดการหดตัวจนนิวเคลียสแตก หากเพิ่มระยะเวลาการทดสอบนานขึ้น เซลล์จะเข้าสู่ระยะอะพอพโทซิสช่วงปลาย (late apoptosis) ซึ่งหลังจากนั้นเซลล์จะเกิดการสลายตัว (lysis)

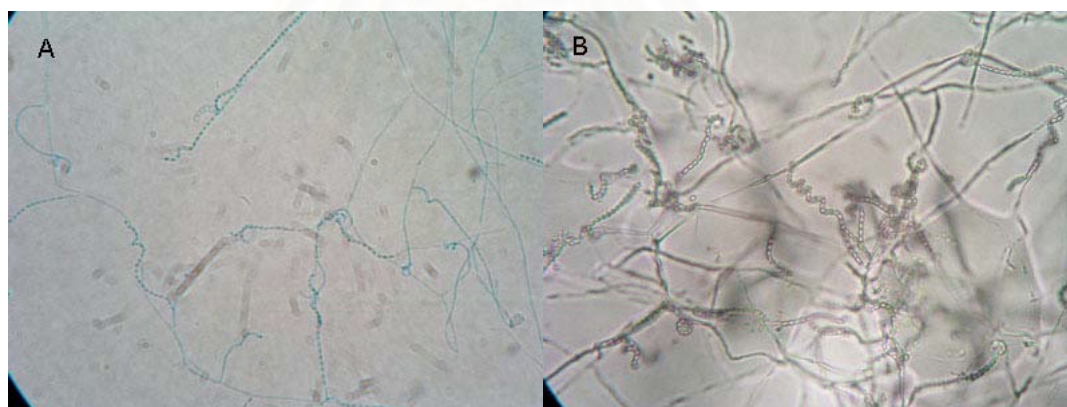
จากผลการทดลองข้างต้นสามารถคัดเลือกแอนติโนมัยซีที่ได้ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Nan 2.4 ซึ่งแสดงผลการยับยั้งสูงสุดและจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat ATCCno.CRL-2063) และสายพันธุ์ Nan 6.2 ซึ่งมีขอบเขตการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบได้มากที่สุดและยังออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดได้ในระดับสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ นำแอนติโนมัยซีทั้งสองสายพันธุ์นี้ไปศึกษาต่อถึงลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และสัณฐานวิทยา เพื่อการจัดจำแนกต่อไป

4.12 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

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

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

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาทำ slide culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 พบว่าสายพันธุ์ Nan 2.4 มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศที่มีลักษณะค่อนข้างเป็นเส้นตรงยาวปลายโค้งงอ มีการสร้างสายสปอร์บนเส้นใย สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สายสปอร์มีลักษณะยาวและปลายสายสปอร์มีลักษณะเป็นวงเปิด โดยเริ่มขดเป็นเกลียวหนึ่งถึงสองชั้น ส่วนสายพันธุ์ Nan 6.2 มีการสร้างสายสปอร์ยาวมีลักษณะขดม้วนเป็นเกลียวอย่างชัดเจน ดังรูปที่ 4.21



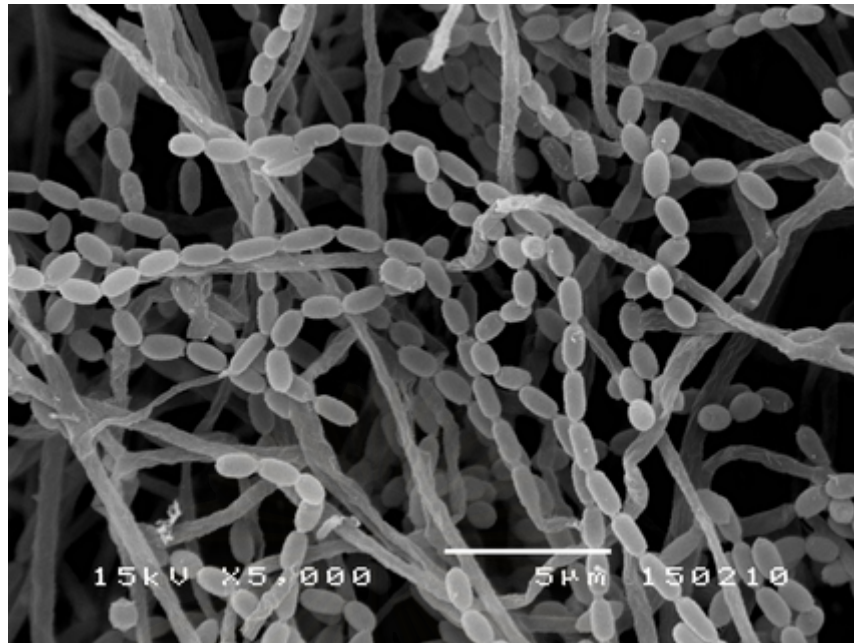
รูปที่ 4.21 ภาพเส้นใยและสายสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

จากกล้องจุลทรรศน์

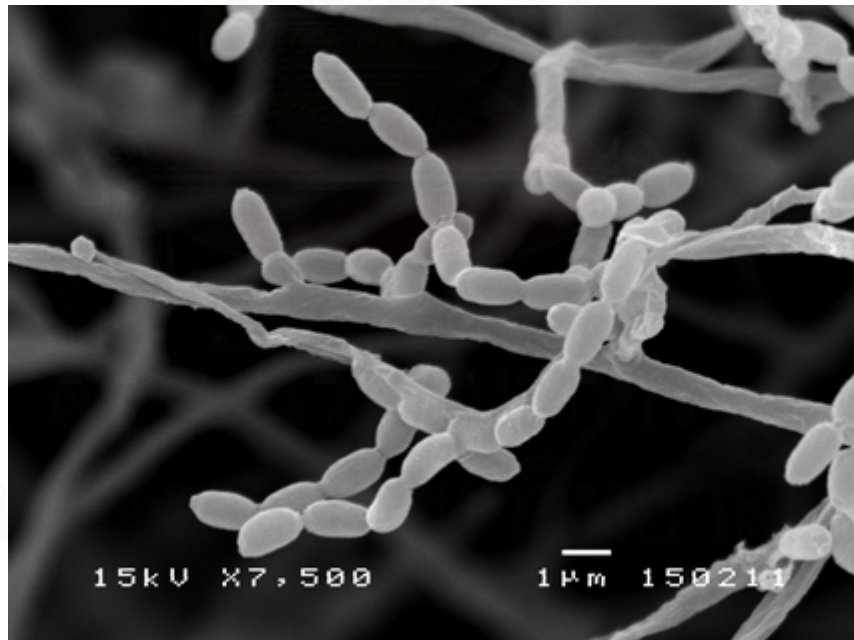
รูป A เส้นใยและสายสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 อายุ 4 วัน เส้นใยไม่หนาแน่น สายสปอร์ส่วนปลายเริ่มขดเป็นเกลียว กำลังขยาย 100 X

รูป B เส้นใยและสายสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 อายุ 4 วัน เส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นหนา สายสปอร์มีการขดม้วนเป็นเกลียว กำลังขยาย 100 X

ทำการศึกษาลักษณะเส้นใย สปอร์และสายสปอร์เพิ่มเติมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.22 - 4.26



รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใยของแบคทีเรียในนมยี่ที่สลายพันธุ์ Nan 2.4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 4 วัน กำลังขยาย 5,000 X



รูปที่ 4.23 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใยของแบคทีเรียในนมยี่ที่สลายพันธุ์ Nan 2.4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน กำลังขยาย 7,500 X

จากรูปที่ 4.22 และ 4.23 ลักษณะสปอร์และสายสปอร์เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าสายสปอร์ของแอกติโนมายซีที่สายพันธุ์ Nan 2.4 มีลักษณะค่อนข้างตรงยาว สปอร์มีลักษณะเป็นวงรียาว เรียงต่อกันเป็นสายยาว สปอร์มีผิวเรียบ

ส่วนในสายพันธุ์ Nan 6.2 พบว่ามีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศหนาแน่น เส้นใยมีการแตกแขนงจำนวนมาก สายสปอร์เป็นสายยาวและขดม้วนเป็นเกลียวเมื่อเจริญเต็มที่ สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สปอร์มีรูปร่างรี ผิวสปอร์เป็นริ้วลาย แสดงดังรูปที่ 4.24 - 4.26

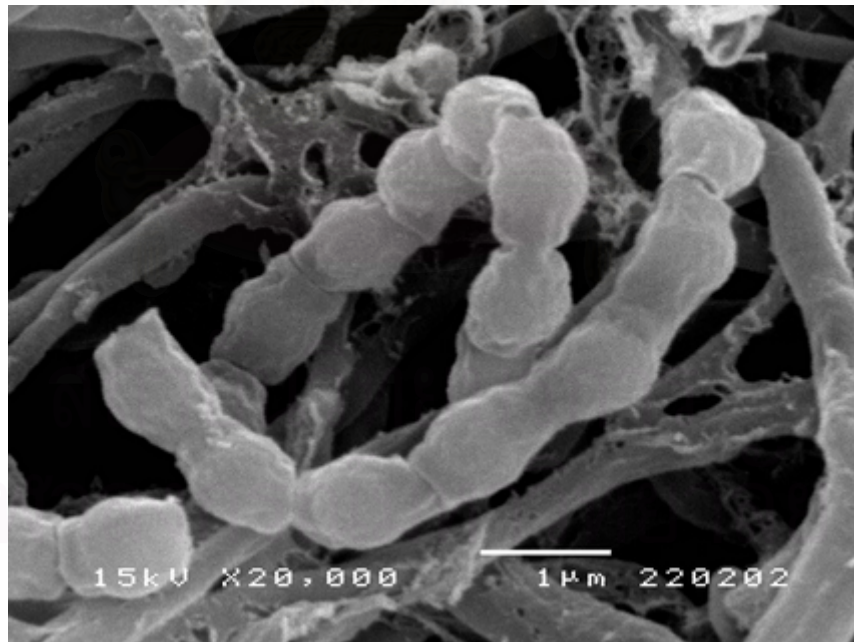


รูปที่ 4.24 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใยของแอกติโนมายซีที่สายพันธุ์ Nan 6.2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน กำลังขยาย 5,000 X

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.25 ภาพถ่ายกำลังสูงจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์ชนิดเป็นเกลียวของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ที่เจริญเต็มที่ อายุ 6 วัน กำลังขยาย 15,000 X



รูปที่ 4.26 ภาพถ่ายกำลังสูงจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะพื้นผิวสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 20,000 X

ภาพถ่ายโครงสร้างของแอกติโนมัยซีทีสที่ได้คัดเลือกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* และสกุลที่เกี่ยวข้อง เพราะพบการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศจำนวนมาก ลักษณะสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว เมื่อสายสปอร์แก่จะแตกออกจากเส้นใยหลักเป็นสายสปอร์เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่มของสายสปอร์ สายพันธุ์ Nan 2.4 สายสปอร์มีลักษณะค่อนข้างตรง ส่วนปลายโค้งงอหรือม้วนเป็นเกลียว สายสปอร์ยาวมากโดยแตกออกจากส่วนปลายของเส้นใยหลัก สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ ผิวสปอร์เรียบ สปอร์รูปร่างรียาว ส่วนสายพันธุ์ Nan 6.2 สปอร์รูปวงรี สายสปอร์มีลักษณะม้วนเป็นเกลียว เมื่อเจริญเต็มที่เกลียวจะมีลักษณะม้วนเป็นวงหลายชั้น เป็นแบบขดเป็นเกลียว (spiral) สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ ผิวสปอร์เป็นริ้วลายไม่เรียบ ซึ่งลักษณะต่างๆ ดังกล่าวเป็นลักษณะโครงสร้างที่พบเด่นชัดใน สกุล *Streptomyces* การศึกษาทางสรีระวิทยาเพิ่มเติมและการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA จะทำให้ทราบถึงสกุล และสปีชีส์ที่แน่นอนของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ต่อไป

4.12.2 การศึกษาการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project (ISP) media

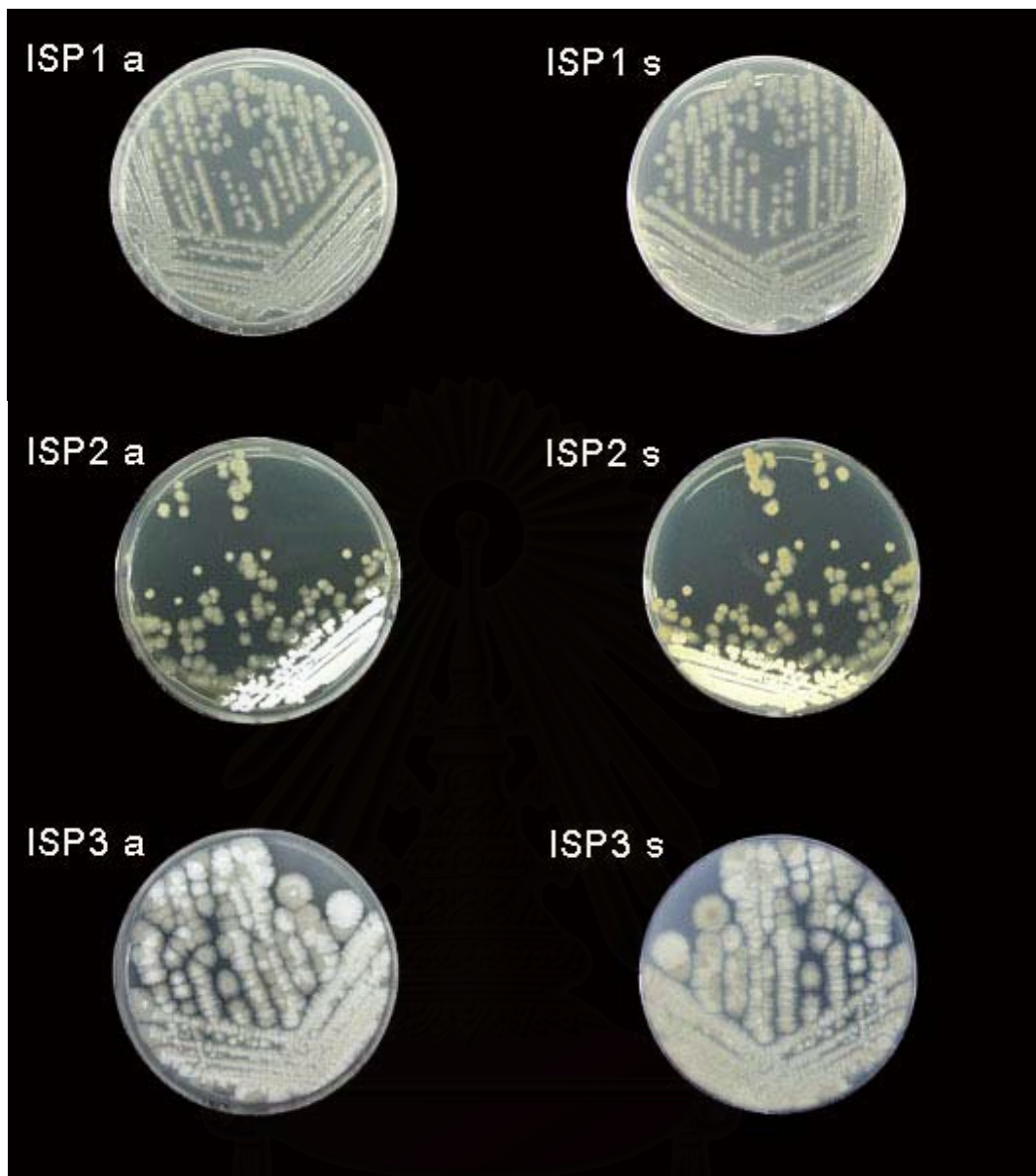
จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 6 ชนิด คือ

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

ลักษณะการเจริญ ลักษณะของเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหาร สปอร์ และรงควัตถุที่ละลายน้ำ แสดงในตารางที่ 4.11 และ รูปที่ 4.27 – 4.28

ตารางที่ 4.11 แสดงการเจริญของแอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ

อาหาร	ลักษณะ				
	การเจริญ	ปริมาณและสีเส้นใยอาหาร	ปริมาณและสีเส้นใยอากาศ	จำนวนและสีสปอร์	รงควัตถุที่ละลายน้ำ
แอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ Nan 2.4					
ISP1 (Tryptone-yeast extract agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	น้อย, สีน้ำตาล	น้อย, สีขาว	ไม่สร้าง
ISP2 (Yeast-malt extract agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	ปานกลาง, สีขาว	มาก, สีขาว	ไม่สร้าง
ISP3 (Oat meal agar)	มาก	มาก, สีเหลือง	มาก, สีขาว	มาก, สีขาวเทา	ไม่สร้าง
ISP4 (Inorganic salts starch agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	ปานกลาง, สีขาว	ปานกลาง, สีขาว	ไม่สร้าง
ISP5 (Glycerol asparagines agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar)	ปานกลาง	น้อย	น้อย	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
แอกติโนมัยซีทีที่สลายพันธู์ Nan 6.2					
ISP1 (Tryptone-yeast extract agar)	มาก	มาก, สีครีมเหลือง	มาก, สีขาว	มาก, สีเทาขาว	ไม่สร้าง
ISP2 (Yeast-malt extract agar)	มาก	มาก, สีเหลือง	มาก, สีครีม	มาก, สีเทา	ไม่สร้าง
ISP3 (Oat meal agar)	มาก	มาก, สีเทา	มาก, สีเทา	มาก, สีเทาดำ	ไม่สร้าง
ISP4 (Inorganic salts starch agar)	มาก	มาก, สีครีมเหลือง	มาก, สีขาว	มาก, สีขาว	ไม่สร้าง
ISP5 (Glycerol asparagines agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีครีมเหลือง	ปานกลาง, สีครีม	ปานกลาง, สีขาว	ไม่สร้าง
ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar)	ปานกลาง	ปานกลาง, สีเหลือง	ปานกลาง, สีขาว	น้อย, สีขาว	ไม่สร้าง

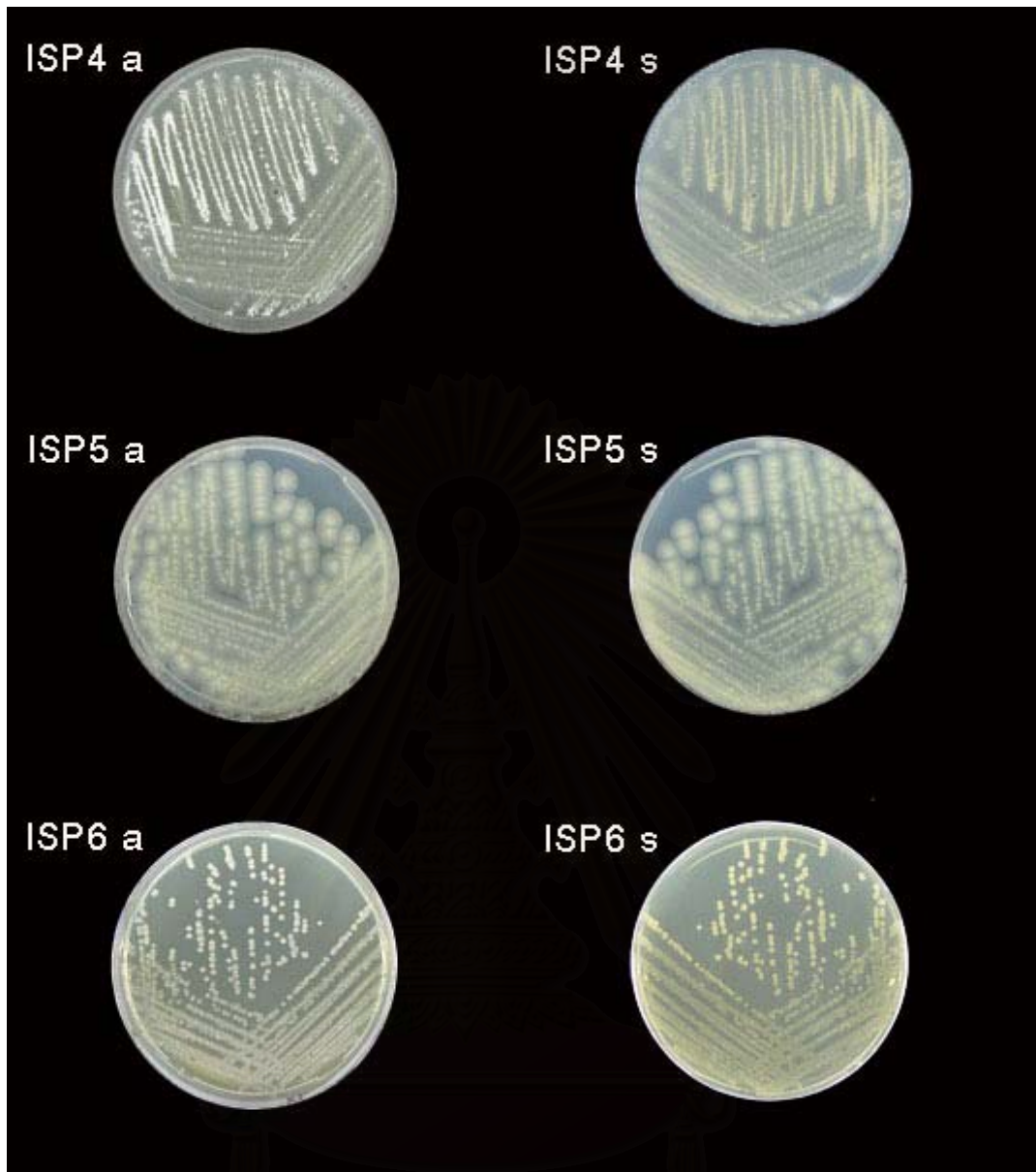


รูปที่ 4.27 ลักษณะโคโลนีของแอสเพอริลลัสที่สลายแป้ง Nan 2.4 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ

a ลักษณะเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

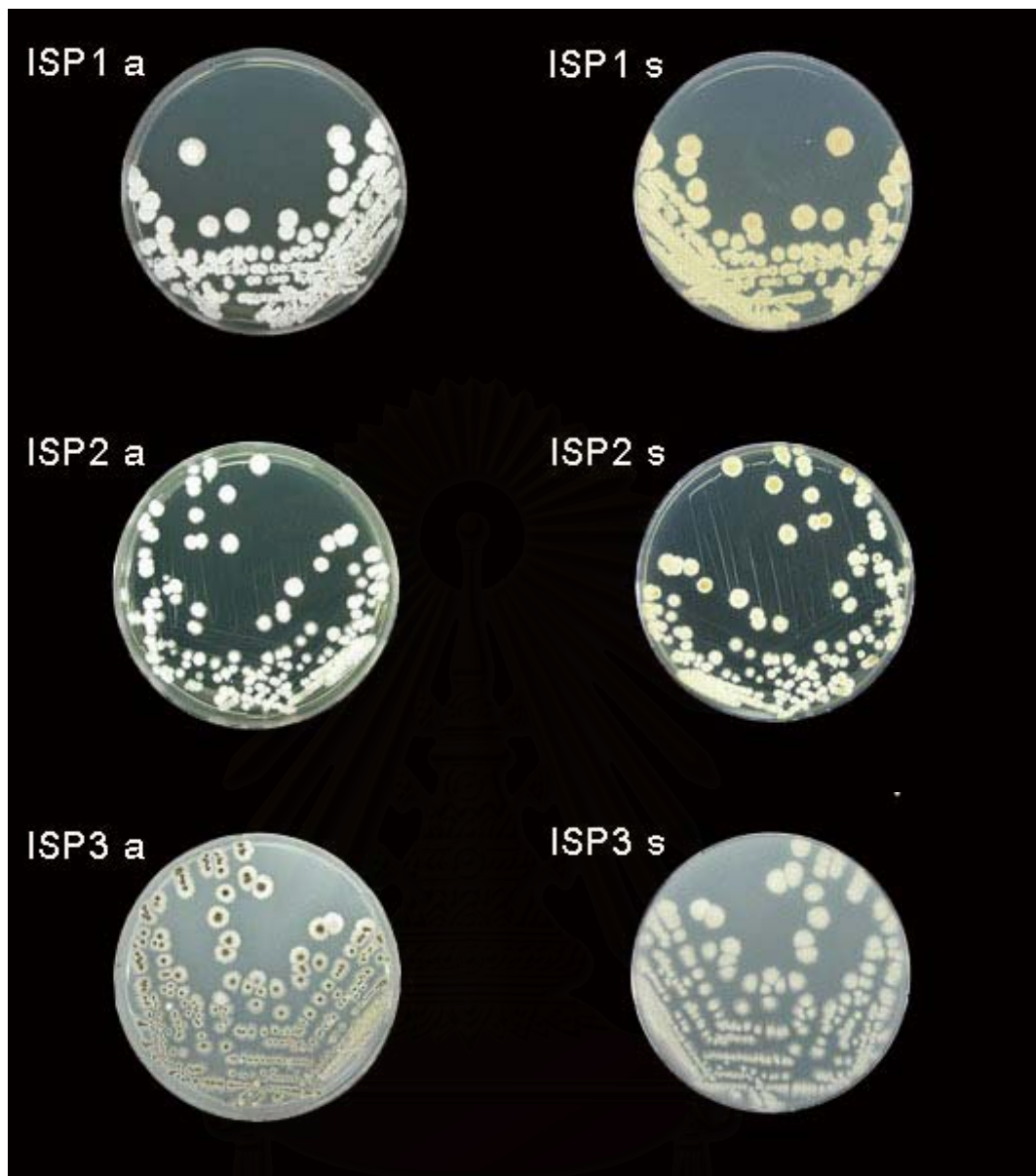
s ลักษณะเส้นใยอาหาร (substrate mycelium)

หมายเหตุ ISP ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ISP1 (Tryptone-yeast extract agar), ISP2 (Yeast-malt extract agar), ISP3 (Oat meal agar), ISP4 (Inorganic salts starch agar), ISP5 (Glycerol asparagines agar) และ ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar)



รูปที่ 4.27 (ต่อ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

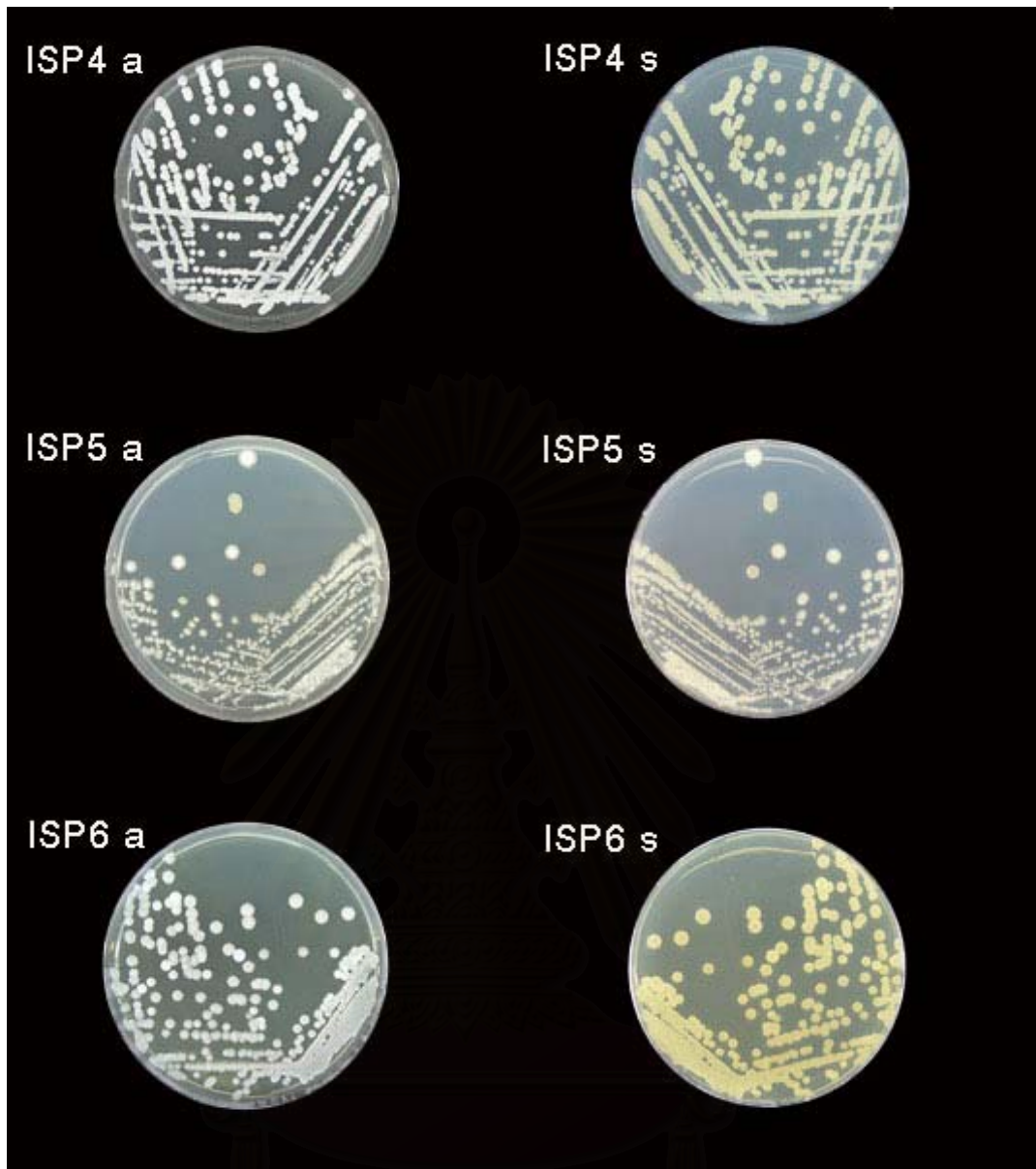


รูปที่ 4.28 ลักษณะโคโลนีของแอสเพอริลลัสที่สลายพันธู์ Nan 6.2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ

a ลักษณะเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

s ลักษณะเส้นใยอาหาร (substrate mycelium)

หมายเหตุ ISP ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ISP1 (Tryptone-yeast extract agar), ISP2 (Yeast-malt extract agar), ISP3 (Oat meal agar), ISP4 (Inorganic salts starch agar), ISP5 (Glycerol asparagines agar) และ ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar)



รูปที่ 4.28 (ต่อ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.12.3 การศึกษาการสร้างรงควัตถุเมลานิน

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเยือก Peptone Yeast Extract Iron Agar และอาหารวุ้นเยือก Tyrosine Agar สามารถตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน จากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร Peptone Yeast Extract Iron Agar ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งในสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 แต่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเจริญบนอาหาร Tyrosine agar ในสายพันธุ์ Nan 2.4 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีดำบริเวณที่โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสเจริญอยู่

4.12.4 การรีดิวส์ไนเตรท

จากการแทง (stab) แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate Agar สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อหยดด้วยสารละลาย A และ B แสดงว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถรีดิวส์ไนเตรทได้

4.12.5 การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

จากการขีด (streak) แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนผิวหน้าอาหารวุ้นเยือก Peptone Yeast Extract Iron Agar ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อของทั้งสองสายพันธุ์ แต่สีของอาหารวุ้นเยือก TSI เปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม แสดงว่ามีการสร้างกรด แต่ไม่มีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ คุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงความสามารถในการสร้างรงควัตถุเมลานิน, การรีดิวส์ไนเตรท และการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

การทดสอบ	ผลการทดสอบของแอกติโนมัยซีทีส	
	สายพันธุ์ Nan 2.4	สายพันธุ์ Nan 6.2
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	+	-
การรีดิวส์ไนเตรท	+	+
การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	-

หมายเหตุ + : ผลการทดสอบเป็นบวก - : ผลการทดสอบเป็นลบ

4.12.6 การศึกษาสมบัติการย่อยสลาย

จากการนำแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar ที่เติมสารที่ต้องการตรวจสอบการย่อยสลายสารแต่ละชนิดลงไป ผลแสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบของแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

สารทดสอบ	ผลการย่อยสลายสารโดยแอกติโนมายซีทีส	
	สายพันธุ์ Nan 2.4	สายพันธุ์ Nan 6.2
Adenine	+	+
Tyrosine	+	+
Xylan	+	+
Xanthine	+	+
Casein	+	+
Gelatin	+	+
Starch	+	+

หมายเหตุ + : ย่อย - : ไม่ย่อย

4.12.7 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการนำแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4 10 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส และตรวจสอบการเจริญ ได้ผลการเจริญแสดงดังตารางที่ 4.14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	สายพันธุ์ Nan 2.4	สายพันธุ์ Nan 6.2
4	-	-
10	-	-
37	+	+
45	-	+
55	-	-

หมายเหตุ + : เจริญ - : ไม่เจริญ

4.12.8 การตรวจสอบการเจริญที่พีเอชต่าง ๆ

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4 4.5 5 5.5 6 8 8.5 และ 9 ผลการเจริญแสดงดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 แสดงความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ที่พีเอชต่าง ๆ

สายพันธุ์ \ พีเอช	4	4.5	5	5.5	6	8	8.5	9
Nan 2.4	+	+	+	+	+	+	+	+
Nan 6.2	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + : เจริญ - : ไม่เจริญ

4.12.9 การตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่เติมแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้ไนโตรเจน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมบวกรืออาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่เติมแอสปารากีน ผลแสดงดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์

Nan 2.4 และ Nan 6.2

แหล่งไนโตรเจน	การเจริญของแอกติโนมัยซีทีส	
	สายพันธุ์ Nan 2.4	สายพันธุ์ Nan 6.2
<i>L</i> -arginine	+	+
<i>L</i> -histidine	+	+
<i>L</i> -methionine	+	+
Potassium nitrate	-	+
<i>L</i> -theonine	+	+
<i>L</i> -valine	+	+
<i>L</i> -alanine	-	+
<i>L</i> -glutamine	+	+

หมายเหตุ + : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ

(ชุดควบคุมบวกเติม *L*- asparagines เป็นแหล่งไนโตรเจน)

(ชุดควบคุมลบไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)

4.12.10 การตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่เติมแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้คาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลแสดงดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์

Nan 2.4 และ Nan 6.2

แหล่งคาร์บอน	การเจริญของแอกติโนมัยซีทีส	
	สายพันธุ์ Nan 2.4	สายพันธุ์ Nan 6.2
<i>L</i> -arabinose	-	+
Dextran	+	+
<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)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.13 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

จากการจำแนกสกุลของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan2.4 และ Nan6.2 ตามหลักการจำแนกอ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 9..(Williams และคณะ, 1994) พบว่าแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan2.4 และ Nan6.2 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* จากผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ที่แน่ชัดได้

เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ในระดับชีวโมเลกุลของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 กับแอกติโนมัยซีทีสที่มีอยู่ใน GenBank จึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA โดยให้ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.29 และ รูปที่ 4.30 ตามลำดับ

```
5'CGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAA
CACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTC
TAATACCGGATACGAGCCTCCAAGGCATCTTGGAGGTTGGAAAGCTCCGG
CGGTGAAGGATGAGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCT
CACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGAC
GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGG
TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
CGGCTTGTCACGTCGATTGTGAAAGCCCCGAGGCTTAACCTCGGGTCTGCA
GTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGG
ATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC
AGGATTAGATATCCTGGTAGTCCACGTCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGT
TGCGGACATTCACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCG
CTTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCT
TGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGC
ATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGG3'
```

รูปที่ 4.29 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์

Nan 2.4 จำนวน 1,083 เบส

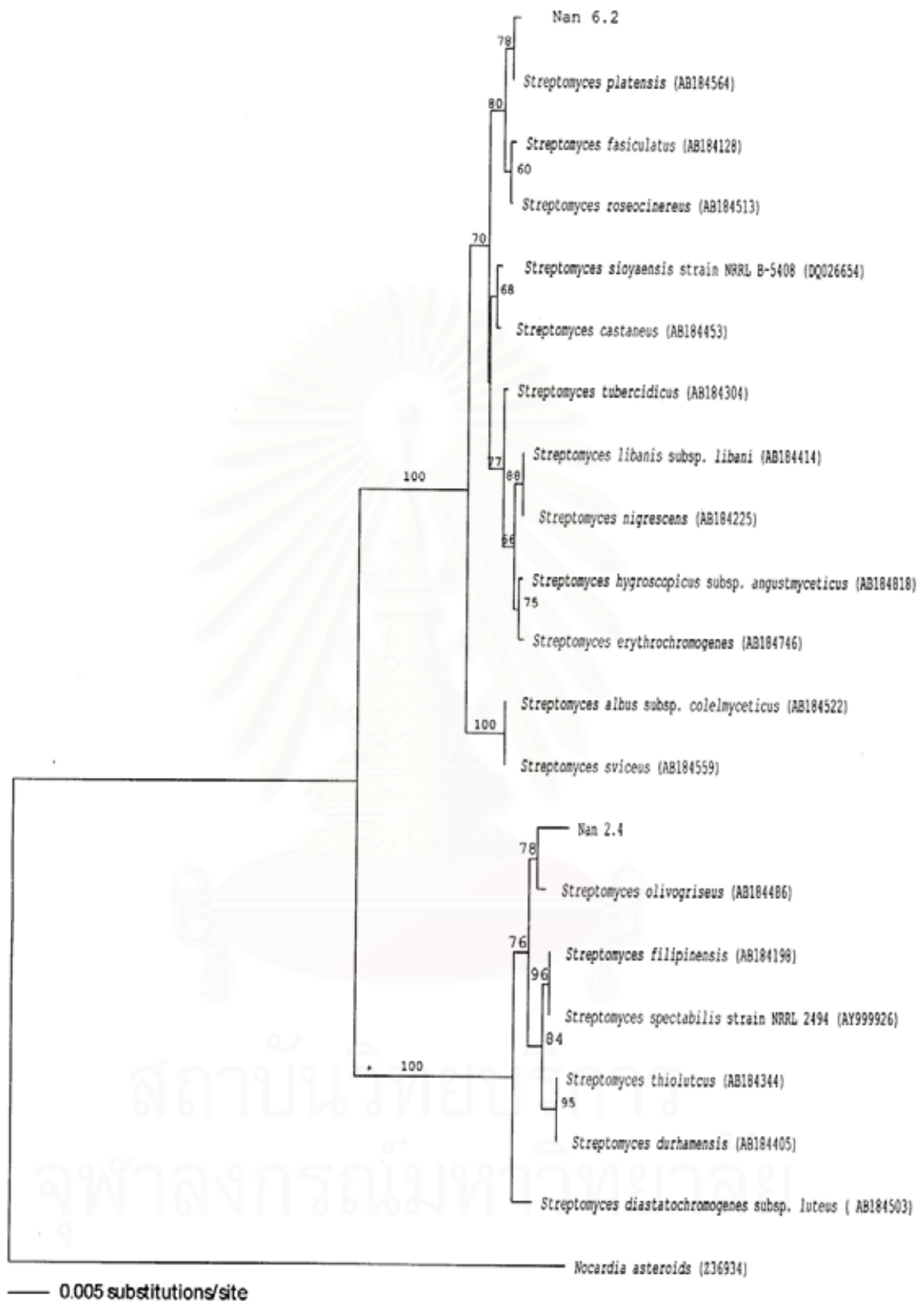
5'CGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGG
TCTAATACCGGATATGACGCGCGACCGCATGGTCTGTGCGTGAAAGCTC
CGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATG
GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGA
CGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
AGGCGGCTTGTGCGGTGCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCT
GCATTTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGG
CGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGG
TGTGGGCGACATTCCACGTCGTCGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCC
CTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAG
CATGCCTTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTC
GGA3'

รูปที่ 4.30 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์

Nan 6.2 จำนวน 1,097 เบส

จากการนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่บันทึกและรวบรวมไว้ใน GenBank DNA database พบว่าลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 คล้ายกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ *Streptomyces* มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ ที่ระดับความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลำดับเบส 16S rRNA คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces* มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ที่ระดับความเหมือนที่ 99 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงนำเอาข้อมูลลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่ได้มาทำการศึกษาความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสที่ได้จาก GenBank กับแอกติโนมัยซีทีสที่ได้ศึกษาครั้งนี้โดยการทำให้ผลแสดงดังรูปที่ 4.31

NJ



รูปที่ 4.31 Phylogenetic tree แสดงการจัดความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสที่ได้จาก GenBank กับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ

จากรูปที่ 4.31 การทำ phylogenetic tree สามารถจัดแอกติโนมัยซีทีสทั้งสองสายพันธุ์เข้ากับกลุ่มของ *Streptomyces* ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดได้ โดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces olivogriseus* มากที่สุด และแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces platensis* มากที่สุด เมื่อนำข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยามาพิจารณา ร่วมกับกับข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์ในการจำแนกระดับสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีส การเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ดังกล่าวระหว่างแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 กับ *Streptomyces platensis* แสดงในตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces platensis*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีส	
	Nan 6.2	<i>Streptomyces platensis</i>
สีของสายใยอาหาร	ครีม, เหลือง	เหลือง, เทา
สีของสายใยอากาศ	ขาว	ขาว, เหลือง, เทา
รูปร่างสปอร์	รูปวงรี	รูปวงรี (elliptical)
ลักษณะผิวสปอร์	เป็นริ้วลายไม่เรียบ	ไม่เรียบ (ridge)
ลักษณะสายสปอร์	เกลียว	เกลียว
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	-	-
การสร้างรงควัตถุ	-	-
<u>การย่อยสลาย</u>		
ไทโรซีน	+	+
แซนทีน	+	+
แป้ง	+	+
<u>การใช้แหล่งคาร์บอน</u>		
L-อะราบิโนส	+	+
L-แรมโนส	+	-
D-ฟรุกโตส	+	+
D-กาแลคโตส	+	+
ซูโครส	+	+
ไซโลส	+	+
เดกซ์แทรน	+	+

ตารางที่ 4.18 (ต่อ)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา	สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีส	
	Nan 6.2	<i>Streptomyces platensis</i>
D-แมนนิทอล	+	+
Na acetate	-	-
Na citrate	-	+
<u>ลักษณะบนอาหาร ISP</u>		
ISP1	สีขาว	สีขาว
ISP2	สีครีม	สีเหลือง,เทาครีม
ISP3	สีเทา	สีเทาขาว
ISP4	สีขาว	สีเหลืองเทา
ISP5	สีครีม	สีขาวเหลือง
ISP6	สีขาว	สีขาว

หมายเหตุ + : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

ที่มา : United States Patent (DeBoer และคณะ, 1975)

ส่วนข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะต่าง ๆ ของ *Streptomyces olivogriseus* ยังมีรายงานออกมายน้อยมาก มีเพียงการอ้างอิงในสิทธิบัตรถึงความสามารถในการสร้างสาร SS-70A และ B แต่ไม่มีการตีพิมพ์รายงานออกมา และยังไม่เคยมีรายงานถึงความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งออกมาอีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการแยกแอกติโนมัยซีทีสจากตัวอย่างดินในพื้นที่ 7 อำเภอของจังหวัดน่าน จำนวน 15 ตัวอย่าง สามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้ 61 สายพันธุ์ เมื่อนำแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และนำสารสกัดมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์โดยทดสอบด้วยวิธี Agar well พบว่ามีแอกติโนมัยซีทีสจำนวน 75.41 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ และจำนวน 24.59% เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยกลุ่มแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แบ่งเป็น กลุ่มยับยั้งแบคทีเรียและรา 6.56 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดี่ยว 68.85 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ทราบว่าประชากรส่วนใหญ่ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก

แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินจากโรงเรียนแม่จริม อำเภอแม่จริม จังหวัดน่าน เป็นสายพันธุ์ที่มีขอบเขตการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบได้มากที่สุดถึง 6 ชนิด ได้แก่ *B. cereus* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *C. albicans* ATCC 10231 *S. cerevisiae* ATCC 5169 และออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อนกับ *A. niger* ATCC 6275 และยังออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดได้ในระดับสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราทดสอบเพิ่มเติมโดยวิธี Dual culture โดยทำการทดสอบกับราทดสอบชนิดใหม่อีก 6 ชนิด ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช และทดสอบกับราชนิดเดิม คือ *A. niger* เพิ่มเติม ปรากฏผลการยับยั้งราทดสอบทั้ง 7 ชนิดเห็นผลได้อย่างชัดเจน คือราทดสอบไม่สามารถเจริญได้บริเวณรอบ ๆ โคลินีของแอกติโนมัยซีทีส และเมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เล็กตรอนแบบส่องกราด เปรียบเทียบระหว่างลักษณะราทดสอบในชุดควบคุมกับราทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยลักษณะเส้นใยส่วนปลายของโคลินีราทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีการเจริญในลักษณะที่เส้นใยแผ่ออกไม่เต็มที่ เส้นใยมีลักษณะหึ่งงอเป็นกระจุกรวมกัน เนื่องจากถูกจำกัดพื้นที่ในการเจริญ เพราะแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งราทดสอบแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งออกมา ทำให้ราทดสอบไม่สามารถเจริญในบริเวณนี้ได้ เหตุผลที่การทดสอบด้วยวิธีนี้เห็นผลการยับยั้งได้อย่างชัดเจนเนื่องจาก การทดสอบด้วยวิธีนี้เป็นเพราะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ร่วมกับราทดสอบโดยตรง ทำให้สารทุกชนิดที่แอกติโนมัยซีทีสผลิตออกมาสามารถแพร่ไปในวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้งหมดซึ่ง

รวมไปถึงสารปฏิชีวนะที่ผลิตออกมาด้วย แต่การทดสอบด้วยวิธี Agar well เป็นการนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบซึ่งปัจจัยต่าง ๆ ในการสกัด เช่น ตัวทำละลาย วิธีการ หรือระยะเวลาในการสกัด อาจมีผลทำให้สูญเสียสารบางชนิดไประหว่างการสกัด ซึ่งอาจจะเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบก็ได้ ดังนั้นการจะสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสเพื่อนำไปใช้ จึงต้องมีการหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารสกัดออกมามีฤทธิ์การยับยั้งในระดับสูงที่สุด

อาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ ในงานวิจัยนี้พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 คือ SSB รองลงมาคือ MEB และ ISP2 ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB SCYB และ NB ไม่ช่วยกระตุ้นให้แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์นี้สร้างสารปฏิชีวนะ

จากการทดสอบเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารปฏิชีวนะจากสายพันธุ์นี้ ทำให้ทราบว่า เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด รองลงมาคือ เอทิลแอลกอฮอล์ ส่วนเฮกเซน ไม่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ออกมาได้เลย และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะพบว่า การเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์นี้ 4 วันแรกเป็นระยะ log phase จากนั้น เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากวันที่ 4 เป็นต้นไป การสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรียทดสอบส่วนใหญ่ สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 4 สำหรับสารยับยั้ง *E coli* เริ่มสร้างหลังวันที่ 4 เป็นต้นไป และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงประมาณวันที่ 10 ซึ่งมีปริมาณสูงสุดและจะคงที่เรื่อยไป การที่สารปฏิชีวนะสร้างออกมาในช่วงระยะ stationary phase แสดงว่า สารปฏิชีวนะที่สร้างเป็นสาร secondary metabolite

จากข้อมูลที่ศึกษาทั้งหมดทำให้ทราบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้สูง คือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Soluble Starch Broth (SSB) ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงอย่างน้อย 10 วัน และใช้ตัวทำละลาย เมทานอล ในการสกัดสาร จากที่ Gesheva และคณะ (2004) เคยรายงานไว้ว่าการใช้ แล็กโทส หรือ กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส เดิมแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมจากแหล่งเดิมคือกากถั่วเหลือง เดิมแร่ธาตุที่จำเป็นในปริมาณน้อย ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเป็น 6 เท่า จากอาหารสูตรเดิม เมื่อพิจารณาจากสูตรอาหาร SSB (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) พบว่า นอกจากแป้ง และ สารสกัดจากยีสต์แล้ว ก็ยังมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส และมีสารประกอบของแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมจากแหล่งไนโตรเจนหลักคือ สารสกัดจากยีสต์ ในสูตรอาหารอีกด้วย ซึ่งในงานวิจัยนี้ให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามชนิดของอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารปฏิชีวนะยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสอีกด้วย

จากการแยกสารปฏิชีวนะเบื้องต้นด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี ปรากฏตำแหน่งของสารออกมา 4 ตำแหน่ง มีค่า Rf เท่ากับ 0.38 0.43 0.51 และ 0.82 เมื่อนำแผ่น TLC ที่แยกสารได้ไปทดสอบหาตำแหน่งของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่าบริเวณของ Rf 3 ตำแหน่ง เท่านั้น คือ 0.38 0.43 0.51 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยยับยั้ง *B. cereus* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *C. albicans* ATCC 10231 *S. cerevisiae* ATCC 5169 และ *A. niger* ATCC 6275 จากการทดลองนี้สารที่แยกได้ยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจาก การใช้ TLC ในการแยกสาร ยังมีข้อจำกัดอีกหลายประการ เช่น ถ้าสารสกัดที่ได้มีสารหลายชนิดที่มีสมบัติใกล้เคียงกันมาก ๆ เช่น มีขั้วใกล้เคียงกันมาก การใช้วิธีนี้จะไม่สามารถแยกสารแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการแยกสารสกัดในขั้นตอนนี้เป็นเพียงการแยกสารขั้นต้นเท่านั้น ต้องการแยกสารในส่วนที่เป็นสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ออกจากสารอื่น ๆ ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ดังจะเห็นได้จากผลคือ สามารถแยกสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.82 ซึ่งไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบออกไปได้ จากการแยกสารในระบบนี้ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลในอัตราส่วน 3:2 จึงสามารถดึงสารส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ขึ้นมาจากจุดเริ่มต้นได้ แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะในส่วนนี้เป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างสูง เพราะต้องให้เมทานอลถึง 40 เปอร์เซ็นต์ จึงจะสามารถแยกพาสารขึ้นมาที่ตัวระเหิดได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น คือ เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่สกัดสารปฏิชีวนะออกมาได้มากที่สุด และเอทิลแอลกอฮอล์ให้ผลรองลงมา ในขณะที่เฮกเซน ซึ่งเป็นสารขั้วต่ำไม่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ออกมาได้เลย ดังนั้นการจะแยกสารให้ได้ผลชัดเจนกว่านี้ จำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น การแยกสารโดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย ซิลิกาเจล และทำการแปรผันอัตราส่วนของตัวระเหิด จะทำให้ประสิทธิภาพการแยกสารสกัดได้ดีขึ้น อาจทำให้ได้สารสกัดที่บริสุทธิ์เลยก็เป็นได้

จากการทดสอบการสร้างสารยับยั้งเซลล์โคมะเร็งมนุษย์ของแอกติโนมัยซีทีสทั้งหมด 61 สายพันธุ์ มีสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าการยับยั้งระดับสูง อยู่ 13 สายพันธุ์ โดยในจำนวนนี้แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ทั้ง 6 ชนิด และให้ผลการยับยั้งในระดับสูงมาก ซึ่งเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากสายพันธุ์นี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ คุณสมบัติของการเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีนั้น ควรที่จะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แบบจำเพาะกับเซลล์ใดเซลล์หนึ่งและสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอโทซิส จากการทดสอบสามารถคัดเลือกได้แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินจากป่าชุมชน อำเภอสันติสุข จังหวัดน่าน โดยสายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในระดับสูง และจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat ATCCno.CRL-2063) โดยทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด

ขามีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 12.77 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิส โดยมีเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิส 72.29 เปอร์เซ็นต์

ในการจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยศึกษาโครงสร้างจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่ใน สกุล *Streptomyces* แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยายังไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ถึงระดับสปีชีส์ได้ ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาร์ไอวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA และเมื่อนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตทั้งสองสายพันธุ์มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ที่บันทึกไว้ใน GenBank DNA database พบว่าลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Nan 2.4 และสายพันธุ์ Nan 6.2 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของสกุล *Streptomyces* โดยมีระดับความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์เหมือนกันมากกว่า 1 สายพันธุ์ เนื่องจากยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ในแอกติโนมัยซีตสกุล *Streptomyces* มีลำดับเบสที่เป็นบริเวณอนุรักษ์อยู่มาก จึงทำให้พบหลายสายพันธุ์ที่ระดับความเหมือนเดียวกันนี้ ซึ่งการทำ Phylogenetic tree ทำให้ทราบได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้นว่า แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Nan 2.4 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces olivogriseus* มากที่สุด และแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Nan 6.2 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces platensis* มากที่สุด อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีระวิทยายังคงมีความสำคัญและจำเป็นที่จะนำมาใช้ร่วมกันกับข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์ในการจำแนกและจัดลำดับความสัมพันธ์ระดับสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีต

จากการศึกษาและค้นคว้าหาข้อมูลเพิ่มเติมทราบว่า *Streptomyces platensis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ Platensimycin ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก มีรายงานว่า Platensimycin สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ติดเชื้อในหนูได้ โดยไม่มีพิษต่อหนู (Wang และคณะ, 2006) โดย Platensimycin จะเข้าไปยับยั้ง beta-ketoacyl synthases (FabF/B) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสร้างกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ในแบคทีเรีย (Manallack และคณะ, 2008)

ส่วนการศึกษาและค้นคว้าหาข้อมูลของ *Streptomyces olivogriseus* พบว่ามีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ แอกติโนมัยซีตสายพันธุ์นี้น้อยมาก มีเพียงการอ้างอิงในสิทธิบัตรถึงความสามารถในการสร้างสาร SS-70A และ B แต่ไม่มีการตีพิมพ์รายงานออกมา และยังไม่เคยมีรายงานถึงความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งออกมาอีกด้วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์. 2547. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- นางลักษณ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2541. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ยุวดี มหาศักดิ์ศิริ. 2546. การแยกแอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินร้งปลวกในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิจิตรา อนันต์ศิริวัฒนา. 2545. การพิสูจน์เอกลักษณ์ และฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอกติโนมัยซีดส์จากดินบริเวณเกาะเสม็ด. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร. 2544. สัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอกติโนมัยซีดส์ที่ไม่ติดเชื้อแอกติโนมัยซีด. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สายพิน สุวรรณจณี. 2549. ผลของสารยับยั้งแกมมาซีโคริเทสต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ มะเร็งของมนุษย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Adam, D. Richardson and Chris, M. Ireland. 2004. A profile of the in vitro antitumor activity of lissoclinolide. Toxicol. Appl. Pharmacol. 195: 55-61.
- Aghighi, S., Shahidi Bonjar, G. H., Rawashdeh, R., Bataynch S. and Saadoun, I. 2004. First Report of Antifungal Spectra of Activity of Actinomycetes Strains Against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Asian J. Plant Sci. 3. 4: 463-471.

- Alejandro M.S. Mayer and Kirk R. Gustafson. 2006. Marine pharmacology in 2003–2004: Anti-tumour and cytotoxic compounds. Euro. J. of cancer. 42: 2241-2270.
- Anisuzzaman, A. S. M., Sugimoto Naoki, Bhuiyan, M. S. A., Sadik Golam and Gafur, M. A., 2001. Toxicological studies of two novel compounds isolated from *Streptomyces* species. The Sci. 6: 368-371.
- Benveniste, R. and Davies, J., 1973. Aminoglycoside antibiotic- inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic resistant bacteria. NAS. 70: 2276- 2280.
- Bibb, J. M. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. Curr. Opin. Microbiol. 8: 208- 215.
- Brock, T. D., Smith, D. W., and Madigan, M. T. 1984. Biology of Microorganisms. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall.
- Burkhard Haefner. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. DDI. 8: 536-544.
- Caccavo, F. 1999. Protein-mediated adhesion of the dissimilatory Fe(III) reducing bacterium *Shewanella alga* BrY to hydrous ferric oxide. Appl. Env. Microbiol. 65:5017-5022.
- Castillo, M.A., Felis, N., Aragón, P., Cuesta, G. and Sabater, C., 2006. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. Inter. Biodeter. Biodegra. 58: 196- 202.
- Cohn, J. E. 1943. The pigment production of *Actinomyces coelicolor* and *A. violaceusruber*. J. Gen. Microbiol. 115: 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.
- Connell, N. D., 2001. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 446- 449.
- Coombs, J. T., Franco, C. M. M. and Loria, R., 2003. Complete sequencing and analysis of pEN2701, a novel 13-kb plasmid from an endophytic *Streptomyces* sp. Plasmid. 49: 86- 92.
- Cross, T., and Goodfellow, M. 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. London: Academic Press

- DeBoer, C. and Bannister, B. 1975. Process for producing the antibiotic U-44,590. United States Patent. 541,346.
- 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 Biol. Biochem. 38: 1505 -1520.
- Federica Sponga, Linda Cavaletti, Ameriga Lazzarini, Angelo Borghi, Ismaela Ciciliato, D. Losi and Flavia Marinelli, 1999. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. J. Biotechnol. 70: 65-69.
- Fernando Peláez. 2006. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products- Can history repeat? Biochem. Pharmacol. 71: 981-990.
- Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S. and Mellouli, L. 2004. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res. in Micro. 156:341-347.
- Gesheva, V., Ivanova, V. and Gesheva, R. 2004. Effects of nutrients on production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *streptomyces hygrosopicus*. Microbiol. Res. 160:243 248.
- Glodman, D. A., Weinstein, R. A., Wenzel, R. P., Tablan, O. C., Duma, R. J., Gaynes, R. P., Schlosser, J. and Martone, W. J., 1996. Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial resistant microorganisms in hospitals: a challenge to hospital leadership. JAMA. 275: 234-240.
- Hadjira Boudjella, Karima Bouti, Abdelghani Zitouni, Florence Mathieu, Ahmed Lebrihi and Nasserline Sabaou. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. Microbiol. Res. 161: 288-298.
- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P. and Stackebrandt, E. 2004. Cryptoendolithic Actinomycetes from Antarctic Sandstone Rock Samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two Isolates Related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. Syst. Appl. Microbiol. 27:166-174.
- Holt, J. G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. U.S.A.: The Williams and Wilkins.

- Ignacio González, Angel Ayuso-Sacido, Annaliesa Anderson and Olga Genilloud. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. FEMS Microbiol. Eco. 54 : 401-415.
- Igarashi, Y., 2003. Secondary metabolites of endophytic actinomycetes. The international society for the biology of Actinomycetes 13th symposium and world federation of culture collections. Technical report 8:34.
- 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: William, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds) Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol 4. pp. 2442-2450. Baltimore: The William and Wilkins.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. and Hopwood, D. A. 2000. Practical Streptomyces Genetics. Norwich: John Innes Foundation.
- Kutzner, H. J., 1981. The family Streptomycetaceae. In: Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A and Schlegel H (Eds) The Prokaryotes: a hand book on habitants, Isolation and Identification of Bacteria. pp 2028-2092. Berlin: Springer-Verlag.
- 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. Res. in Microbiol. 156: 755- 762.
- Lederberg, J., Krsek, M., Morris, N., Egan, S. M. H. and Wellington, E. 2000. Encyclopedia of Microbiology. 2nd vol 1. New York: The Rockefeller University.
- Lee, J. Y. and Hwang. B. K., 2002. Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol. 48: 407-417.
- Lilia Fourati-Ben Fguira, Serge Fotso. Raoudha Ben Ameer-Mehdi, Lotfi Mellouli and Hartmut Laatsch. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res. in Microbiol. 156: 341-347.
- Lixiang Cao, Zhiqi Qui, Jianlan You, Hongming Tan and Shining Zhou, 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium

- wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiol. Letters. 247 : 147-152.
- McCarthy, A. J., 1989. Genus *Thermomonospora*, In: William, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds) Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol 4. pp. 2562-2568. Baltimore: The William and Wilkins.
- Maddison, D. R. and Maddison, W. P., 2001. MacClade 4. Analysis of phylogeny and character evolution version 4.03. Sunderland, M.A., U.S.A.: Sinauer Associates.
- Manallack, D. T., Crosby, I. T., Khakham, Y. and Capuano, B., 2008. Platensimycin: a promising antimicrobial targeting Fatty Acid synthesis. Curr. Med. Chem. 15 7:705-10.
- Mellouli, L., Ameer-Mehdi, R. B., Sioud, S., Shlem, M. and Bejar, S., 2003. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. Res. in Micro.154:345-352.
- Miyadoh, S., 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganisms approach. Actinomycetologia. 9:100–106.
- Okazaki, T., 2003. Actinomycetes isolated from plant leaves and their antibiotic substances. The international society for the biology of Actinomycetes 13th symposium and world federation of culture collections. Technical report 8:34.
- Oliveira, R.S., Castro, P.M.L., Dodd, J.C. and Vosátka, M., 2005. Synergistic effect of *Glomus intraradices* and *Frankia* spp. on the growth and stress recovery of *Alnus glutinosa* in an alkaline anthropogenic sediment. Chemosphere. 60: 1462- 1470.
- Palaga, T., Kataoka, T., Woo, JT. and Nagai, K. 1996. Suppression of apoptotic cell death of IL-3-dependent cell line by ER/ SR Ca²⁺-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. 107-114.

- Raoudha Ben Ameer Mehdi, Samiha Sioud, Lilia Fourati Ben Fguira, Samir Bejar and Lotfi Mellouli. 2006. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. Process Biochem. 41: 1506-1513.
- 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.
- Saito, A., Miyashita, K., Biukovi, G. and Schrempf, H. 2001. Characteristics of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) extracellular protein targeting chitin and chitosan. Appl. Env. Micro. 67:1268-1273.
- Salas, J. A. and Méndez, C., 1998. Genetic manipulation of antitumor- agent biosynthesis to produce novel drugs. Tibtech November. 16: 475- 482.
- Shih, H. D., Lui, Y. C., Hsu, F. L., Mulabagal, V., Dodda, R. and Hauang, J. W., 2003. Fungichomin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizotonia solani*. J. Agri. Food. Chem. 51: 95-99.
- Shirling, E. B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol 16: 313-340.
- Strohl, W. R., 1997. Industrial antibiotics : today and the future, In : Strohl Wr (ed). Biotechnology of antibiotics, 2nd end. pp. 1-47. New York: Marcel Dekker.
- Sujatha, P. et al., 2004. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Res.160:119-126.
- Swofford, D. L., 1999. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony(and other methods), Version 4.08b8. Sunderland, M.A., USA: Sinauer Associates.
- Sykes, G., and Skinner, F. A., 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical importance. New York: Academic Press.
- The Society for Actinomycetes Japan 1997. Atlas of actinomycetes, Japan: Asakura Publishing.
- Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T., and Kataoka, M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. J. Bacteriol. 181:78-82.

- 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. 8th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
- 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. Bacteriol. 40: 609.
- Wang, J., Stephen, M., Soisson, K., Young, W. and Shoop, S. 2006. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. Nature. 441:358-361.
- Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A. and Wohlleben, W., 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. J. Biotechnol. 106: 221- 232.
- Williams, S. T., Goodfellow, M. and Alderson, G., 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. U.S.A.: The Williams and Wilkins.
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Huang, Y. and Yuen, K., 2006. Genomic evidence for antibiotic resistance gene of actinomycetes as origins of antibiotic resistance gene in pathogenic bacteria simply because actinomycetes are more ancestral than pathogenic bacteria. Medical Hypotheses. 67: 1297- 1304.
- Zhonghui Zheng, Wei Zeng, Yaojian Huang, Zhiyuan Yang, Jun Li, Huirong Cai and Wenjin Su. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. FEMS Microbiol. Letters. 188: 87- 91.



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. โซเดียม เคซีเนต บรอก (Sodium Caseinate Broth)

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
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

3. นิวเทรียนท์ อการ์ (Nutrient Agar)

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

4. นิวเทรียนท์ บรอก (Nutrient Broth)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตเน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

5. 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 เติมวุ้นผง แล้วนำไปต้มจนเดือดอีกครั้ง นึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

6. โซลูเบิล สตาร์ช บรอก (Soluble Starch Broth)

แป้ง (Soluble Starch)	10.0	กรัม
กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH ₄) ₂ SO ₄)	3.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

7. 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
เฟอร์รึคลอไรด์ ($FeCl_3$)	0.01	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นี้่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

8. ทริปติก ซอย อการ์ (Tryptic Soy Agar)

กลูโคส	2.5	กรัม
แบคโต ทริปโตน (Bacto tryptone)	17.0	กรัม
แบคโต ซอยโทน (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

นี้่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

9. ทริปติก ซอย บรอก (Tryptic Soy Broth)

แบคโต ทริปโตน (Bacto tryptone)	17.0	กรัม
แบคโต ซอยโทน (Bacto soy tone)	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นี้่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

10. แชนบรอกท อการ์ (Sabouraud Agar)

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

11. 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		

12. 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		

13. กลูโคส ยีสต์ มอลท์ เอกซ์แทรกท อการ์ (Glucose Yeast Malt Extract agar)

กลูโคส	4.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.0	กรัม
สารสกัดจากมอลท์	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)	2.0	กรัม
วุ้นผง	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

14. โซเดียม เคซีนต ยีสต์ เอกซ์แทรกท อการ์ (Sodium Caseinate Yeast Extract Agar)

โซเดียมเคซีนต (Sodium caseinate)	2.0	กรัม
ไดโพเทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2	กรัม
เฟอร์รึคลอไรด์ (FeCl_3)	0.01	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

15. ISP1 ทริปโตเนน ยีสต์ เอกซ์แทรกท อการ์ (Tryptone-Yeast Extract Agar)

ทริปโตเนน (Tryptone)	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

16. ISP2 ยีสต์ มอลท์ เอกซ์แทรก อการ์ (Yeast-Malt Extract Agar)

สารสกัดจากมอลท์ (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

นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

17. ISP3 โยต์ มิล 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 นิ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (*ภาคผนวก ก หมายเลข 26)

18. ISP4 อินออร์แกนิก ซอลล์ สตาร์ช อการ์ (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 ซอลล์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

*ภาคผนวก ก. หมายเลข 26

19. ISP5 กลีเซอรอล แอสปาราจีน อการ์ (Glycerol Asparagines Agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	10.0	กรัม
แอล แอสปาราจีน (L-asparagine)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
*สารละลาย เทรซ ซอลล์ (Trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 ซ์ และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

*ภาคผนวก ก. หมายเลข 26

20. ISP6 เปปโตเน ยีสต์ เอกซ์แทรก ไอร์ออน อการ์ (Peptone Yeast Extract Iron Agar)

แบคโต เปปโตเน (Bacto peptone)	15.0	กรัม
โปรติโอส เปปโตเน (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

21. ไทโรซีน อการ์ (Tyrosine Agar)

กลีเซอรอล (Glycerol)	15.0	กรัม
แอล-ไทโรซีน (<i>L</i> -tyrosine)	0.5	กรัม
แอล-แอสปาราจีน (<i>L</i> -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 26

22. 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

23. โมดิไฟด์ เบนเนท อการ์ (Modifide 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

พีเอช 7.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 °C ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที

24. 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

25. คาร์บอน ยูทิลไลเซชัน อการ์ (Carbon Utilization Agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2.64	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.38	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	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 27

26. สารละลายเทรซ ซอลต์ (Trace Salts Solution)

เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$)	0.1	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm และเติมลงในอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 45-50 °C

27. สารละลายเทรซ ซอลล์ของ Pridham และ Gottlieb

(Pridham and Gottlieb trace salt solution)

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

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

28. กลูโคส ยีสต์ มอลท์ เอกซ์แทรก บรอก (Glucose Yeast Malt Extract Broth)

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

ปรับ pH เท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

29. มอลท์ เอกซ์แทรก บรอก (Malt Extract Broth)

สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract)	2.0	กรัม
แบคโต เปปโตน (Bacto peptone)	1.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 – 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

30. ยีสต์ มอลท์ แยกซ์แทรก อการ์ (Yeast-Malt Extract Broth)

สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	4.0	กรัม
กลูโคส	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

31. 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 ลงในขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากเชื้อขวดละ 90 มิลลิลิตร ปิดฝาและพันพาราฟิล์ม เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

32. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี Fetal Bovine Serum ความเข้มข้น 10% (complete media)

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

33. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 สำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง

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

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 0.5 McFarland Standard

BaCl ₃ .2H ₂ O	1.175	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย BaCl₃.2H₂O 1.175 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลาย BaCl₃.2H₂O ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย 1% H₂SO₄ ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร จะได้สารแขวนลอยที่มีลักษณะขุ่น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

2. บัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS, Ca²⁺, Mg²⁺ free) ความเป็นกรด-ด่าง 7.4

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaHPO ₄	1.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม

นำแต่ละส่วนละลายในน้ำปลอดประจุ 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4 ด้วย HCL เข้มข้น 1N หรือ NaOH เข้มข้น 1N ปรับปริมาตรด้วยกระบอกตวงจนครบ 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอ 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 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 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) จนได้ปริมาตรเป็น 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

เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจนได้ปริมาตรเป็น 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

ภาคผนวก ค

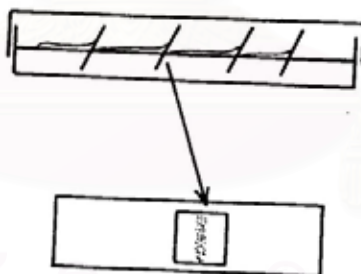
วิธีการทดลอง

1. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างดิน

ชั่งตัวอย่างดินตัวอย่าง 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

ขีดแอกติโนมายซีที่สบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแผ่นปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว มาเสียบเป็นมุม เอียงลงบนรอยขีด 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. 9th 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 ตัดชิ้นวุ้นที่มีโคโลนีของแอติโนมัยซีดเจริญอยู่เป็นชิ้นสี่เหลี่ยม มีพื้นที่ประมาณ $5 \times 5 \text{ mm}^2$ นำชิ้นวุ้นไปอบด้วยไอของ 1% ออสเมียมเตตระออกไซด์ (Osmium tetroxide, OsO_4) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายใต้ตู้ควีน

4.2 ขจัดน้ำออก (dehydration) จุ่มตัวอย่างในเอทานอลความเข้มข้น 30 50 70 90 และ 100% ขึ้นตอนละ 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 : ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายวรปรัชญ์ ศรีสุขคำ เกิดเมื่อวันที่ 17 สิงหาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดน่าน สำเร็จ การศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนศรีสวัสดิ์วิทยาคาร จังหวัดน่าน สำเร็จการศึกษาระดับ วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตร จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย