สัณฐานวิทยา และ สรีรวิทยาของแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่ติดเชื้อแอคติโนฟาจ

นายวีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-17-0103-9
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY OF NON-ACTINOPHAGE INFECTED ACTINOMYCETES

Mr. Weerawat Piyakriengkrai

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2001
ISBN 974-17-0103-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สัณฐานวิทยา และ สรีรวิทยาของแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่ติดเชื้อแอคติโนฟาจ
โดย	นายวีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... รองคณบดีฝ่ายบริหาร
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ การเที่ยง) รักษาราชการแทนคณบดี
คณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.มังกร โรจน์ประภากร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร : สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่ติดเชื้อแอคติโนฟาจ (MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY OF NON-ACTINOPHAGE INFECTED ACTINOMYCETES) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร.สุรีนา ชวนิชย์ 102 หน้า. ISBN 974-17-0103-9.

จากตัวอย่างดินจำนวน 32 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในประเทศ สามารถแยกแอคติโนมัยซิทีสได้จำนวน 117 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อฮิวมิค แอซิด วิตามิน อการ์ เมื่อนำมาคัดเลือกหาแอคติโนมัยซิทีสที่สามารถต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจจำนวน 30 ชนิด ด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น พบว่าสามารถคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิด ได้ 4 สายพันธุ์ คือ Ac1.1, Ac2.2, Ac25.4 และ Ac26.4 ซึ่งบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบและสร้างเอนไซม์บางชนิดได้ในขั้นต้น

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซิทีสทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ พบว่าลักษณะของสปอร์เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด จะมีการเรียงตัวเป็นสายยาวโค้งเป็นลอน เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี พบว่าผนังเซลล์ของทั้ง 4 สายพันธุ์ประกอบไปด้วยไอโซเมอร์ชนิด LL ของ 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแอคติโนมัยซิทีส สกุล *Streptomyces* และเมื่อตรวจสอบลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ16S rRNA พบว่า Ac1.1, Ac2.2, Ac25.4 และ Ac26.4 คือ *S. maritimus*, *S. lipmanii*, *S. aureofaciens* และ *S. venezuelae* ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	-

2449223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : ACTINOMYCETES / ACTINOPHAGE / STREPTOMYCES / PLAQUE

WEERAWAT PIYAKRIENGKRAI : MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY OF NON-ACTINOPHAGE INFECTED ACTINOMYCETES.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.SURINA CHAVANICH, Ph.D., 102 pp. ISBN 974-17-0103-9.

Thirty-two soil samples collected from different sources of Thailand were used for isolation and characterization of non-actinophage infected actinomycetes. One hundred and seventeen isolates of actinomycetes were obtained by using humic acid vitamin agar medium. They were then used as host cells for infecting of 30 actinophages by using double layer agar technique. Non-actinophage infected strains were selected from non-plaque formation appearance. Four strains: Ac1.1, Ac2.2, Ac25.4 and Ac26.4 were found as non-actinophage infected actinomycetes. Moreover, under primary screening conditions, certain strains were capable of expression some antimicrobial and enzyme activities.

Morphology and physiology of these four strains were examined. To observed under scanning electron microscopy, all strains had flexible long chain spores. Furthermore, determination of cell wall compositions by thin-layer chromatography, LL isomer of 2,6-diaminopimelic acid was found in these strains. Therefore, they were recognized as *Streptomyces* species. From partial sequencing of 16S ribosomal RNA genes of Ac1.1, Ac2.2, Ac25.4 and Ac26.4, they were identified as *S. maritimus, S. lipmanii, S. aureofaciens* and *S. venezuelae*, respectively.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology Student's signature .....

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature .....

Academic year 2001 Co-advisor's signature -

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือ และความกรุณาอย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัยด้วยดีตลอด และ ยังได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าจึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ อาจารย์ ดร.มังกร โรจน์ประภากร ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ในการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษานี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ และ Prof. Dr. Seiya Ogata ที่อนุเคราะห์แอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิง

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.ประณัฐ โพธิยะราช ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจอย่างดีในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ

ขอขอบคุณ คุณอรอนงค์ พริ้งศุลกะ คุณธีรพัฒน์ เวชชประสิทธ์ คุณอุรัจฉวี อุณหเลขกะ คุณปวีณา รัตนเสนา ที่เป็นที่ปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบคุณ คุณอภิรักษ์ วิเศษศรีพงษ์ คุณสุนัดดา โยมญาติ คุณนพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจอย่างดี ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดหลักสูตรการศึกษานี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังสำคัญที่สุดที่ช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ฌ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. วารสารปริทรรศน์..... 4

3. อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการวิจัย..... 19

4. ผลการวิจัย..... 35

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 68

รายการอ้างอิง..... 77

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก..... 83

ภาคผนวก ข..... 93

ภาคผนวก ค..... 95

ภาคผนวก ง..... 97

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 102

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 ปริมาณโดยประมาณของสารทุติยภูมิที่ถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายกลุ่ม อ้างอิงในปี 1994..... 15

3.1 ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ..... 34

4.1 แหล่งที่มา ลักษณะทั่วไป และ พีเอชของตัวอย่างดิน..... 36

4.2 สายพันธุ์ของแอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 32 ตัวอย่าง..... 37

4.3 ความสามารถในการติดเชื้อของแอคติโนฟาจ กับแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิง..... 39

4.4 ความสามารถในการติดเชื้อของแอคติโนฟาจ กับแอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้..... 42

4.5 ขอบเขตของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ..... 46

4.6 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติโอไลติค และ ไลโพไลติค บนอาหารเลี้ยงเชื้อสคิม มิลค์ อการ์ และ ไตรบิวทิริน อการ์ ตามลำดับ..... 47

4.7 ความสามารถในการสร้างเลซิติเนส เพคติเนส และ ไคติเนส บนอาหารเลี้ยงเชื้อเอค โยค อการ์ เพคติน อการ์ และ คอลลอยดัล ไคติน อการ์ ตามลำดับ..... 48

4.8 ค่า R_f ของสารสกัด และ สารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค..... 49

4.9 สีของสายใยอาหารและสปอร์ของสายแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือก..... 50

4.10 ลักษณะรูปร่าง ผิวของสปอร์ และ สายสปอร์ของสายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส..... 50

4.11 การสร้างรงควัตถุเมลานินบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นเอียง..... 57

4.12 การสร้างรงควัตถุที่สามารถแพร่กระจายได้..... 57

4.13 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรทและสร้างก๊าซไฮโดรเจน..... 60

4.14 ความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบ..... 60

4.15 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ..... 61

4.16 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน..... 62

4.17 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน..... 63

5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดผนังเซลล์และน้ำตาลภายในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีส 71

5.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ความสามารถของการเจริญที่อุณหภูมิและพีเอช ของสายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกได้..... 73

5.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์Ac2.2, Ac25.4 และ Ac26.4 เปรียบเทียบกับ *S. lipmanii, S. aureofaciens* และ *S. venezuelae* ตามลำดับ..... 75

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ		หน้า
2.1	ลักษณะโคโลนีและสายใยของแอคติโนมัยซิทีส.....	5
2.2	ลักษณะการสร้างสปอร์แบบสร้างภายในสายใย.....	8
2.3	ลักษณะการสร้างสปอร์แบบสร้างภายนอกสายใย.....	8
2.4	ส่วนประกอบต่างๆของอนุภาคฟาจ.....	16
2.5	ไลติคไซเคิลของแอคติโนฟาจ.....	17
2.6	การเพาะเลี้ยงฟาจด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น.....	18
3.1	ไดอะแกรมการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA.....	34
4.1	โครมาโทแกรมแสดงแถบของสารสกัดด้วยจากวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	49
4.2	สีของสายใยอาหาร (a) และสีสปอร์ (b) ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1.....	51
4.3	สีของสายใยอาหาร (a) และสีสปอร์ (b) ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2.....	51
4.4	สีของสายใยอาหาร (a) และสีสปอร์ (b) ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4.....	52
4.5	สีของสายใยอาหาร (a) และสีสปอร์ (b) ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4.....	52
4.6	ลักษณะรูปร่างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500 เท่า.....	53
4.7	ลักษณะรูปร่างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500 เท่า.....	53
4.8	ลักษณะรูปร่างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500 เท่า.....	54
4.9	ลักษณะรูปร่างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500เท่า.....	54
4.10	ลักษณะสายสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า.....	55
4.11	ลักษณะสายสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า.....	55
4.12	ลักษณะสายสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า.....	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

4.13 ลักษณะสายสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า..... 56

4.14 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรก ไอรอน อการ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน..... 58

4.15 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไทโรซีน อการ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน..... 58

4.16 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อกลีเซอรอล-แอสปาราจีน อการ์เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน 59

4.17 ชิ้นดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1, Ac2.2, Ac25.4, Ac26.4 และ *S. coelicolor* เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน100 เบสแพร์ ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ + 1.5 กิโลเบสแพร์..... 64

4.18 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1..... 65

4.19 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2..... 65

4.20 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4..... 66

4.21 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4..... 66

5.1 แผนภูมิแสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ..... 69

5.2 กราฟเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ..... 71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

แอคติโนมัยซิทีส (actinomycetes) จัดเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในอันดับ แอคติโนมัยเซทาเลส (Order Actinomycetales) มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างแบคทีเรียและรา โดยลักษณะที่คล้ายกับรา คือมีสายใยแตกแขนงออกเป็นเส้นเล็กๆ (Alexander, 1977) นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะมีลักษณะเป็นก้อน (pellet) คล้ายกับรา ส่วนลักษณะที่คล้ายกับแบคทีเรียคือ เป็นเซลล์แบบโพรคาริโอต ไม่มีเมมเบรนห่อหุ้มนิวเคลียส ไม่มีไมโตคอนเดรีย มีไรโบโซมเป็น 70S และมีผนังเซลล์เป็นเปปทิโดไกลแคน เป็นต้น นอกจากนี้แอคติโนมัยซิทีสยังมีความไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดที่ฆ่าแบคทีเรียแต่ไม่มีความไวต่อสารปฏิชีวนะที่ฆ่ารา ลักษณะสายใยของแอคติโนมัยซิทีส มี 2 ชนิด คือ สายใยที่ชูขึ้นไปบนอากาศเรียกว่า สายใยอากาศ (aerial mycelium) และสายใยที่เจริญลึกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเรียกว่า สายใยอาหาร (substrate mycelium) ที่ปลายสายใยมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่มีผนังบางเรียกว่า โคนิเดีย (conidia) ถ้า สปอร์อยู่ในอับสปอร์ (sporangium) จะเรียกว่าสปอแรงจิโอสปอร์ (sporangiospores) ลักษณะของสปอร์จะแตกต่างกันไปตามกลุ่มของแอคติโนมัยซิทีส โคโลนีของแอคติโนมัยซิทีสอาจเกิดขึ้นจาก สปอร์ หรือ โคนิเดีย หรือ สายใยก็ได้ ซึ่งทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าโคโลนีที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจาก สปอร์ หรือ กลุ่มของสปอร์ หรือ 1 เซลล์ของสายใย หรือ ชิ้นส่วนของสายใย (หลายเซลล์) จึงยากต่อการหาจำนวนแอคติโนมัยซิทีสที่แน่นอน (Labeda and Shearer, 1990)

เนื่องจากสปอร์หรือโคนิเดียของแอคติโนมัยซิทีสสามารถทนความร้อนได้มากกว่าสายใย ทำให้สปอร์ หรือ โคนิเดียสามารถอยู่ในดินที่แห้งแล้งเป็นเวลาหลายปี อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญแอคติโนมัยซิทีสคือ พีเอชหรือค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน แอคติโนมัยซิทีสมักเจริญได้ดีในดินที่มีพีเอชเป็นกลาง ส่วนใหญ่ไม่ทนต่อพีเอชต่ำโดยเฉพาะถ้าพีเอชน้อยกว่า 4 จะพบได้น้อยมาก แต่มีแอคติโนมัยซิทีสบางชนิดที่เจริญได้ในพีเอชที่ต่ำกว่า 5 ความชื้นของดินที่เหมาะสมสำหรับแอคติโนมัยซิทีสคือประมาณ 85% (Labeda and Shearer, 1990) ถ้าความชื้นมากกว่านี้จะพบแอคติโนมัยซิทีสน้อยเนื่องจากมีปริมาณของออกซิเจนต่ำ อุณหภูมิก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดชนิดของแอคติโนมัยซิทีส โดยส่วนใหญ่จะเป็นพวกมีโซฟายล์ (mesophile) พบในช่วงอุณหภูมิ 28 – 37 องศาเซลเซียส แต่มีบางชนิดที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงเรียกว่า เทอร์โมแอคติโนมัยซิทีส (thermoactinomycetes) ความลึกของดินเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของแอคติโนมัยซิทีส พบว่าความลึกยิ่งมากปริมาณเชื้อยิ่งลดลง (Brock *et al.*,1984)

แอคติโนมัยซิทีสพบได้ในแหล่งดินต่างๆทั่วโลกโดยพบมากเป็นอันดับ 2 รองจากแบคทีเรีย ในธรรมชาติส่วนใหญ่จะอยู่อิสระ (free living) แต่มีบางชนิดที่ก่อโรค (pathogen) ซึ่งก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ สัตว์หรือพืช จุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซิทีสมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของการผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ที่สำคัญอีกด้วย

แอคติโนฟาจ (actinophages) เป็นฟาจที่สามารถทำลายแอคติโนมัยซิทีส โดยจะเข้าไปเจริญเพิ่มจำนวนในเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีส เป็นผลให้เซลล์แตก ก่อให้เกิดบริเวณใสของเซลล์ที่ติดเชื้อที่เรียกว่า พล๊าค (plaque) การที่ฟาจจะเข้าสู่โฮสท์หรือเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีสชนิดใดชนิดหนึ่งและทำให้โฮสท์เกิดการติดเชื้อ ฟาจจะต้องมีความจำเพาะต่อแอคติโนมัยซิทีสชนิดนั้นๆ การเกาะติด (adsorption) ของฟาจกับรีเซพเตอร์ (receptors) บนโฮสท์จะเป็นตัวจำกัดความจำเพาะของฟาจกับสายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส ฟาจแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเข้าสู่โฮสท์เซลล์แตกต่างกัน ถ้าฟาจสามารถเข้าสู่โฮสท์ชนิดที่ต่างสายพันธุ์กันเรียกว่ามีโฮสท์-เรนจ์ (host range) กว้าง หรือถ้าฟาจเข้าสู่โฮสท์เซลล์ชนิดสายพันธุ์เดียวกันเรียกว่ามีโฮสท์-เรนจ์แคบ (Goyal *et al*., 1987) วงจรการติดเชื้อฟาจในโฮสท์เซลล์แบ่งเป็น 2 แบบ แบบแรกเรียกว่า ไลติคไซเคิล (lytic cycle) ซึ่งทำให้เซลล์ของแอคติโนมัยซิทีสแตก ฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบนี้เรียกว่า ไวรูเลนต์ฟาจ (virulent phage) เช่น ฟาจ RP2 แบบที่สองเรียกว่า ไลโสเจนิคไซเคิล (lysogenic cycle) คือไม่ทำให้เซลล์ของแอคติโนมัยซิทีสแตก แต่ดีเอ็นเอของฟาจจะสอดแทรกในโครโมโซมของโฮสท์เซลล์เรียกว่า โพรฟาจ (prophage) ฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบนี้เรียกว่า เทมเพอเรตฟาจ (temperate phage) เช่น ฟาจ ϕC31 เป็นต้น

มีรายงานกล่าวถึงแอคติโนฟาจที่ทำให้แอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะที่สำคัญหลายชนิดเกิดการแตกสลายและเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งทางอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น ฟาจ RP2 ก่อให้เกิดการติดเชื้อ *Streptomyces rimosus* ซึ่งผลิตออคซีเตตราไซคลีน (oxytetracycline) (Hranueli *et al*., 1979) ฟาจ VP1 และ CWK ก่อให้เกิดการติดเชื้อ *Streptomyces venezuelae* ซึ่งผลิตทีนามัยซิน (thienamycin) และ *Streptomyces cattleya* ซึ่งผลิตคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) ตามลำดับ (Anne *et al*., 1984) ฟาจ G3, G4 และ G5 ก่อให้เกิดการติดเชื้อ *Streptomyces erythreus* ที่ผลิตอิริโทรมัยซิน (erythromycin) (Donadio *et al*., 1986) เป็นต้น ดังนั้นถ้ามีการค้นคว้าหาแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจ เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรม ก็น่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดแยกแอคติโนมัยซิทีสจากแหล่งดินในประเทศ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจ พร้อมทั้งศึกษาสมบัติและเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ดังกล่าว

ขั้นตอนการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่เกิดการติดเชื้อแอคติโนฟาจ
2. ศึกษาสมบัติของแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่เกิดการติดเชื้อแอคติโนฟาจ
3. ตรวจสอบเอกลักษณ์ของแอคติโนมัยซิทีส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการศึกษาสมบัติและการตรวจสอบเอกลักษณ์ของแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่เกิดการติดเชื้อแอคติโนฟาจ จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานของแอคติโนมัยซิทีสที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรม และสาขาอื่นๆอีกต่อไปได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
วารสารปริทรรศน์

2.1 ประวัติการค้นพบ

แอคติโนมัยซิทีส เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะและความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียและรา โดยในอดีตที่ผ่านมาแนวทางของการจำแนกเชื้อ การบัญญัติศัพท์เฉพาะเพื่อระบุสกุล และชื่อชนิดของจุลินทรีย์นี้มีความสับสนเป็นอย่างมาก

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับแอคติโนมัยซิทีสเริ่มต้นในปี 1875 โดย Ferdinand Cohn อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) ได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ที่สร้างสายใยชนิดหนึ่ง ซึ่ง R. Foerster แยกได้จากก้อนนิ่วที่พบในท่อน้ำตาว่า *Streptothrix foersteri* โดย Cohn เน้นว่าจุลินทรีย์นี้มีความคล้ายคลึงกับ *Leptothrix* นอกจากนี้ภาพจุลินทรีย์ที่ถ่ายโดย Cohn แสดงให้เห็นสปอร์ที่เรียงกันเป็นสาย ซึ่งเป็นลักษณะของจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซิทีส ต่อมาในปี1877 Harz อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) ได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ก่อโรคในวัวที่ถูกค้นพบโดย Bollinger ว่า *Actinomyces bovis* เหตุที่ตั้งชื่อดังกล่าว เนื่องจากกลุ่มสายใยของเชื้อแผ่ออกเป็นรัศมี ซึ่งตรงกับชื่อ actinomyces ที่แปลว่า ray fungus แต่การตั้งชื่อสกุลทั้งสองแบบที่กล่าวข้างต้นไม่ได้รับการยอมรับ เนื่องจากได้มีการนำชื่อ *Streptothrix* ไปใช้ในจุลินทรีย์อื่นก่อนแล้ว และชื่อ *Actinomyces* ก็ไม่เป็นที่นิยมเช่นกัน เนื่องจากชื่อดังกล่าวไม่ได้ครอบคลุมสัณฐาน และ รูปร่างลักษณะของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ออกมาได้อีกด้วย

ภายหลังที่มีการตั้งชื่อสกุลสองชื่อแรกดังกล่าวแล้ว ได้มีการตั้งชื่อสกุลของจุลินทรีย์นี้อย่างแพร่หลาย โดยอาศัยจากแหล่งอาหารตามธรรมชาติของจุลินทรีย์ หรือจากคุณลักษณะทางกายภาพแต่ละแบบของจุลินทรีย์นั้นๆ แต่ก็เป็นชื่อที่ไม่สามารถสื่อความหมายครอบคลุมทางด้านสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ได้ครบถ้วน (Waksman, 1950)

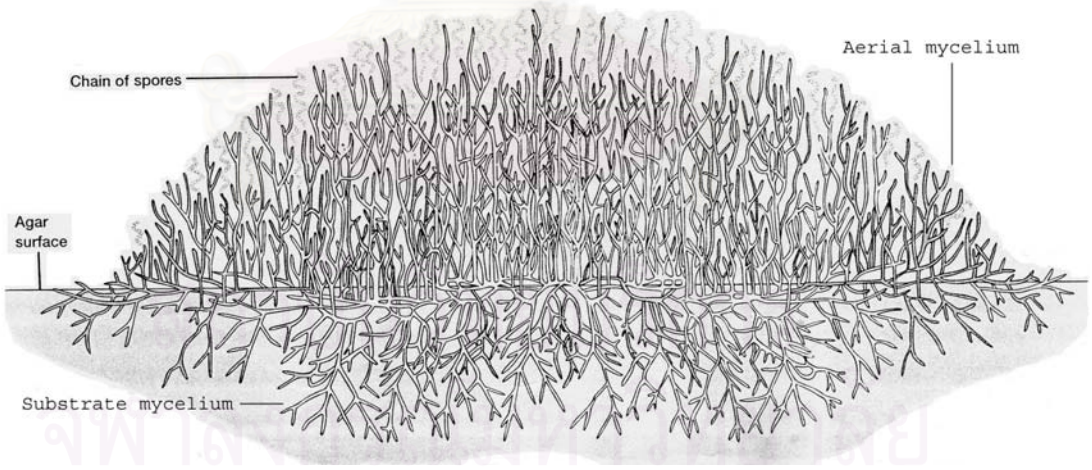
เนื่องจากจุลินทรีย์นี้สามารถแยกย่อยได้หลายพันชนิด อีกทั้งยังเป็นส่วนร่วมในกระบวนการทางธรรมชาติหลายขั้นตอน จึงมีการจัดกลุ่มจุลินทรีย์นี้ออกเป็นหมวดหมู่โดยใช้หลักการจำแนกเดียวกันคือ อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซิทีส ได้แก่ ลักษณะเฉพาะเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ ลักษณะของรงควัตถุที่สร้างขึ้น การสร้างกลิ่น การสร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ การย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ และองค์ประกอบของเซลล์แอคติโนมัยซิทีส เป็นต้น (Williams *et al.*,1989) และในปัจจุบันได้ใช้ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA เป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่มที่สำคัญด้วย (Ueda *et al.*, 1999)

2.2 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยซิทีส

แอคติโนมัยซิทีสจัดเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในอันดับแอคติโนมัยเซทาเลส ติดสีแกรมบวก ยกเว้นบางกลุ่มที่เป็นเทอร์โมฟิลิค (thermophilic) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียสจะติดสีแกรมลบ แอคติโนมัยซิทีสส่วนใหญ่ไม่มีสมบัติเป็นแอซิด ฟาสต์ (acid fast) แต่มี *Nocardia* บางชนิด โดยเฉพาะชนิดที่ก่อโรค (Kalakoutskii and Agre, 1976) มีสมบัติเป็น แอซิด ฟาสต์

2.2.1 โคโลนีของแอคติโนมัยซิทีส

การเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซิทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จะเกิดการสร้างสายใยจำนวนมาก จนเกิดการรวมกันเป็นกลุ่มก้อนเรียกว่า โคโลนี (colony) ซึ่งความหมายของโคโลนีของแอคติโนมัยซิทีสจะต่างจากโคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียจะเกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนกัน แต่โคโลนีของแอคติโนมัยซิทีสอาจเกิดจากกลุ่มของสายใยซึ่งพัฒนาจากสปอร์ หรือ สายใยอาหาร (substrate mycelium)



รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีและสายใยของแอคติโนมัยซิทีส (Brock *et al*., 1984)

2.2.2 สายใยของแอคติโนมัยซิทีส

โคโลนีของแอคติโนมัยซิทีสจะมีการสร้างสายใย 2 แบบ คือ สายใยอาหาร และ สายใยอากาศ (aerial mycelium) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยสายใยทั้ง 2 แบบจะแสดงลักษณะและหน้าที่ทางชีววิทยาที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปแอคติโนมัยซิทีสจะมีการสร้างสายใยทั้ง 2 แบบ แต่มีบางชนิดที่สร้างเฉพาะสายใยอาหาร ปกติไม่พบผนังกั้นเซลล์ในสายใย แต่ก็อาจพบได้ในช่วงแรกของกระบวนการแตกเป็นชิ้นส่วน (fragmentation) ของสายใย ซึ่งในปี 1919 Drechsler และในปี 1923 Orskov อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) รายงานว่าแอคติโนมัยซิทีสสกุล *Nocardia* และ *Streptomyces* บางชนิดมีผนังกั้นในสายใย

สายใยอาหาร คือ สายใยที่สร้างในช่วง vegetative ซึ่งการเจริญของสายใยชนิดนี้จะมีขนาด และรูปร่างแตกต่างกัน โดยช่วงแรกสีของสายใยจะเป็นสีขาวหรือครีม แต่เมื่อเจริญเต็มที่จะกลายเป็นสีเหลือง แดง ชมพู ส้ม เขียว หรือ น้ำตาล และเมื่อเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซิทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเกิดการเจริญอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-6 ชั่วโมง โดยจะมีการสร้างท่อเจริญ (germ tube) หนึ่งท่อหรือหลายท่อ ซึ่งท่อเจริญนี้จะเจริญต่อไปเป็นสายใยสายยาวแล้วพัฒนากลายเป็นสายใยที่มีความซับซ้อนยิ่งขึ้น ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของสายใยจะแตกต่างกันไปตามกลุ่มและชนิดของแอคติโนมัยซิทีส เส้นผ่านศูนย์กลางของสายใยประเภทนี้พบได้ตั้งแต่ 0.2–0.8 ไมโครเมตร บางชนิดจะตรงและยาวถึง 600 ไมโครเมตรหรือกว่านั้น บางชนิดพบสายใยลักษณะโค้งและมีการแตกแขนง มีความยาวประมาณ 50–100 ไมโครเมตร (Kalakoutskii and Agre, 1976)

โครงสร้างของสายใยจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภาวะที่เชื้อเจริญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิและสารเคมีที่มีผลต่อการเจริญ เมื่อเชื้อมีอายุมากสายใยชนิดนี้จะมีการแตกออกเป็นชิ้นส่วนสั้นๆ บางชนิดอาจมีการแตกอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง หรือเจริญในภาวะที่เป็นของเหลว หรือเกิดการติดเชื้อโดยแอคติโนฟาจ (Sykes and Skinner, 1973)

สายใยอากาศ คือ สายใยที่สร้างขึ้นด้านบนของสายใยอาหาร พบมากในแอคติโนมัยซิทีสส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในสกุลสเตรปโตมัยซิส (*Streptomyces*) ลักษณะของสายใยอากาศจะแตกต่างกันไปตามกลุ่มของแอคติโนมัยซิทีส ส่วนประกอบของอาหาร และภาวะของการเลี้ยงเชื้อ สายใยอากาศส่วนใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1–1.4 ไมโครเมตร โดยปกติสายใยชนิดนี้จะมีลักษณะสั้น ตรงหรือโค้ง และมีการแตกแขนงจำนวนมาก บางชนิดสร้างสายใยยาวและมีการแตกแขนงออกเป็นแขนงสั้นๆ มีลักษณะตรง หรือ โค้ง สายใยอากาศจะเจริญปกคลุมทั้ง

โคโลนี เมื่อสังเกตดูจะมีลักษณะคล้ายปมด้าย หรือ ฝุ่นซอล์ก อยู่บนสายใยอาหาร (Kalakoutskii and Agre, 1976)

ในปี 1947 Klieneberger รายงานการสร้างสายใยอากาศจากสายใยอาหาร โดยเกิดจากการรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนของสายใยกลายเป็นเซลล์เริ่มต้น (initial cell) ซึ่งส่วนใหญ่เริ่มเจริญจากจุดกึ่งกลางของโคโลนี แล้วแผ่ออกไปทุกทิศทาง เมื่อศึกษาภายในเซลล์พบว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวจะมีกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ที่ติดสีเข้มล้อมรอบไปด้วยของเหลวซึ่งถูกปิดล้อมด้วยผนังเซลล์ (cell wall) การเจริญเป็นสายใยอากาศ จะเริ่มจากกระบวนการแตกหน่อ (sprout) และแบ่งตัว (subdivision) แล้วจึงเจริญต่อไปเป็นเซลล์ซึ่งจะพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป

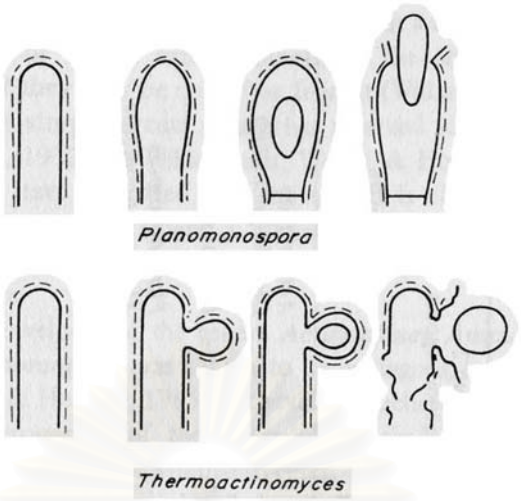
แอคติโนมัยซิทีสบางกลุ่มสร้างสายใยอากาศ ที่มีลักษณะคล้ายวงแหวนเมื่อมองจากด้านบน โดยลักษณะดังกล่าวเกิดจาก ความแตกต่างของสายใยที่สร้างและไม่สร้างสปอร์ ปรากฏการณ์นี้เป็นผลมาจากการแพร่ของสารเคมีบางชนิด ความเข้มแสง อุณหภูมิ และความชื้น (Waksman, 1950)

2.2.3 <u>สปอร์ของแอคติโนมัยซิทีส</u>

2.2.3.1 <u>การสร้างสปอร์</u>

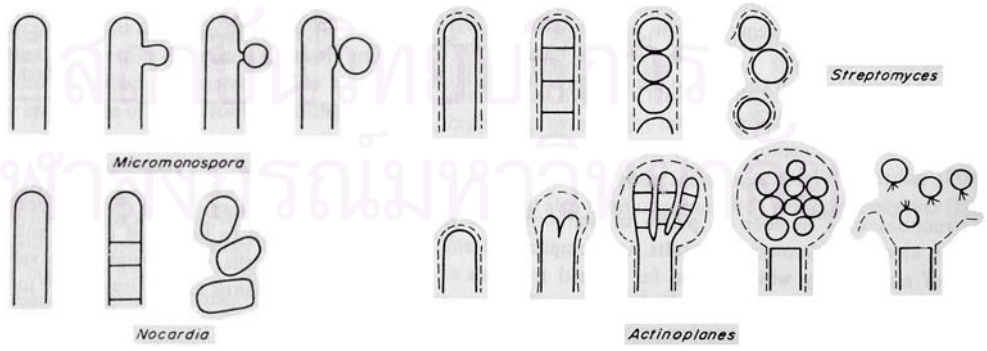
การสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสจะแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของกลุ่มและชนิด โดยพบว่าการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสเกิดได้ 2 แบบ คือ สร้างภายในสายใย (endogenous) และสร้างภายนอกสายใย (exogenous) (Kalakoutskii and Agre, 1976)

<u>สปอร์ที่สร้างภายในสายใย</u> (endogenous spore) คือสปอร์ที่ถูกสร้างอยู่ในสายใยหรือไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์คล้ายสปอร์ของแบคทีเรียแกรมบวก พบการสร้างสปอร์แบบนี้ในแอคติโนมัยซิทีส สกุล *Thermoactinomyces* สกุล *Dactylosporangium* และ สกุล *Planomonospora* เป็นต้น การสร้างสปอร์เริ่มจาก ผนังสายใยแบ่งออกเป็น 2 ชั้น จากนั้นเยื่อหุ้มโพรโตพลาสซึม (protoplasm) มีความหนาเพิ่มขึ้น เกิดช่องว่างระหว่างผนังสปอร์กับอับสปอร์ (sporangium) เกิดสปอร์ที่เรียกว่าสปอแรงจิโอสปอร์ (sporangiospores) ซึ่งสปอร์ดังกล่าวจะหลุดออกมาเมื่อผนังของอับสปอร์แตก ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ลักษณะการสร้างสปอร์แบบสร้างภายในสายใย
(Sykes and Skinner, 1973)

<u>สปอร์ที่สร้างภายนอกสายใย</u> (exogenous spore) คือสปอร์ที่ถูกสร้างอยู่ภายนอกสายใย การสร้างสปอร์ลักษณะนี้พบได้ในแอคติโนมัยซิทีสส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในสกุล *Streptomyces* การสร้างสปอร์เริ่มด้วยการเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลีอิก จากนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จะมีความหนาเพิ่มขึ้น และมีโซโซม (mesosomes) จะเพิ่มจำนวนและรวมกับผนังกั้นสปอร์ เกิดเป็นสปอร์ที่เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) ลักษณะของสปอร์ดังกล่าวจะเรียงกันเป็นสายบนสายใยที่เรียกว่าก้านชูสปอร์ (sporophore) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ลักษณะการสร้างสปอร์แบบสร้างภายนอกสายใย
(Sykes and Skinner, 1973)

2.2.3.2 ลักษณะสปอร์

สปอร์หรือโคนิเดียของแอคติโนมัยซิทีสจะมีรูปร่างหลายแบบ เช่น ทรงกลม ทรงรี หรือ ทรงกระสวย โดยรูปร่างและขนาดของสปอร์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของแอคติโนมัยซิทีส สปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสจะมีลักษณะคล้ายสปอร์ของรา คือมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมมากกว่าสปอร์ของแบคทีเรีย โดยทั่วไปสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสจะถูกทำลายที่อุณหภูมิประมาณ 60–65 องศาเซลเซียสภายในเวลา 10–15 นาที เมื่ออยู่ในภาวะที่อาหารเหมาะสม สปอร์จะเกิดการบวม และสร้างท่อเจริญงอกออกมาจากปลายข้างใดข้างหนึ่ง หรือปลายทั้งสองด้านของสปอร์ การสร้างสปอร์ของเชื้อในกลุ่ม *Micromonospora* จะแตกต่างจากเชื้อสกุลอื่น คือ โคนิเดียลักษณะทรงกลมหรือรี จะถูกสร้างขึ้นบนแขนงพิเศษที่มีลักษณะตรง และสั้นประมาณ 5-10 ไมโครเมตร ซึ่งจะพบได้หลายๆแขนง โดยจะรวมกันเป็นกลุ่มคล้ายกับพวงองุ่น ปกติการสร้างสปอร์จะเกิดขึ้นได้มาก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (synthetic medium) (Lechevalier and Lechevalier, 1967)

2.3 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของแอคติโนมัยซิทีส (Alexander, 1977)

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง แอคติโนมัยซิทีสสามารถเจริญได้ทั้งบนและใต้ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ซึ่งโคโลนีที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างราและแบคทีเรีย โดยทั่วไปมีรูปร่างกลม ขอบเรียบ หรือปกคลุมไปด้วยสายใยขนาดเล็ก เหนียว และเจริญลึกลงไปในเนื้ออาหาร สามารถเห็นลักษณะการแผ่ของสายใยเป็นรัศมีได้เมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เมื่อเลี้ยงแอคติโนมัยซิทีสในอาหารเหลวที่มีการเขย่าจะทำให้เกิดการเจริญอย่างรวดเร็วและมีปริมาณมากกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยลักษณะของเชื้อจะเป็นก้อนขนาดเล็ก (pellet) ซึ่งเกิดจากการแตกหักของสายใย และการกระจายของสปอร์ แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้จะไม่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น อาจพบการเจริญที่ผิวของภาชนะ หรือเกิดลักษณะเป็นวงของการเจริญขึ้นบริเวณผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

2.4 ความต้องการสารอาหารของแอคติโนมัยซิทีส

แอคติโนมัยซิทีสแต่ละกลุ่มมีความต้องการสารอาหารแตกต่างกันอย่างมาก บางกลุ่มสามารถเจริญได้บนอาหารที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน แต่บางกลุ่มเจริญได้เฉพาะอาหารที่มี

องค์ประกอบซับซ้อน นอกจากนี้แอคติโนมัยซิทีสบางกลุ่มยังสามารถปรับตัวให้ใช้สารอาหารได้หลากหลายอีกด้วย โดยปริมาณการสร้างเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีสจะขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารที่เชื้อได้รับ อาหารเลี้ยงเชื้อของแอคติโนมัยซิทีสมีทั้งแบบสังเคราะห์และแบบที่ใช้สารอินทรีย์ในธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์จะถูกใช้เพื่อการศึกษารูปร่างลักษณะของแอคติโนมัยซิทีส ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อแบบสารอินทรีย์มักถูกใช้เพื่อจุดประสงค์เฉพาะ เช่น ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Streptomyces griseus* เพื่อผลิตสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ภายในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ต้องใช้เวลาที่ยาวนาน และได้ผลผลิตต่ำ

2.4.1 <u>แหล่งคาร์บอน</u>

แอคติโนมัยซิทีสสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ทั้งสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนและไม่ซับซ้อน โดยสารอินทรีย์เหล่านี้ ได้แก่ กรดอินทรีย์ น้ำตาล แป้ง เซลลูโลส โปรตีน โพลีเปปไทด์ และกรดอะมิโน เป็นต้น แอคติโนมัยซิทีสบางกลุ่มสามารถใช้สารประเภทอื่น เช่น ไขมัน สารประกอบไฮโดรคาร์บอน สารประกอบที่มีวงเบนซีน หรือสารที่ย่อยสลายได้ยาก เช่น ลิกนิน แทนนิน และยางเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยแอคติโนมัยซิทีสจะเลือกแหล่งอาหารที่ใช้ได้ง่ายมาใช้ในการเจริญก่อน โดยแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ได้แก่ กลูโคส มอลโตส เดกซ์ตริน แป้ง กลีเซอรอล กรดอินทรีย์ และโปรตีน รองลงมา ได้แก่ ซูโครส และน้ำตาลประเภทอื่น และอการ์ ก็ยังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในแอคติโนมัยซิทีสบางกลุ่ม เช่น *Streptomyces coelicolor* ได้ (Cohn, 1943)

โดยทั่วไปแอคติโนมัยซิทีสมักใช้โปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน มากกว่าคาร์โบไฮเดรต ซึ่งทดสอบได้ด้วยการเติมโปรตีน หรืออนุพันธ์ของโปรตีน เช่น เปปโตน และเติมกลูโคส หรือคาร์โบไฮเดรตประเภทอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน พบว่า แอคติโนมัยซิทีสจะใช้โปรตีนเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนก่อน โดยจะขับของเสียออกมาในรูปของแอมโมเนียจำนวนมาก (Waksman and Lomanitz, 1925)

คาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วยังมีบทบาทเป็นสารบัฟเฟอร์อีกด้วย เนื่องจากถ้ามีเฉพาะโปรตีน หรืออนุพันธ์ของโปรตีนทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว จะทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียอย่างรวดเร็วจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีภาวะเป็นด่างสูงเกินกว่าที่เชื้อจะเจริญได้ จากปัจจัยดังกล่าวทำให้กลูโคสเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเจริญของแอคติโนมัยซิทีส แม้ว่าในอาหารจะมีโปรตีนหรือเปปโตนอยู่แล้วก็ตาม เพราะการย่อยสลายกลูโคสจะก่อให้เกิดกรด ซึ่งสามารถใช้ในการปรับสมดุลกับแอมโมเนียที่ถูกสร้างขึ้นจากการย่อยสลายเปปโตนได้ (Waksman, 1950)

กรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดฟอร์มิค (formic acid) กรดออกซาลิค (oxalic acid) กรดทาร์ทาริค (tartaric acid) และกรดฮิพพูริค (hippuric acid) ยกเว้นกรดอะซิติค (acetic acid) กรดซิตริค (citric acid) และกรดมาลิก (malic acid) เป็นสารประกอบคาร์บอนที่ไม่ค่อยดีนักต่อการเจริญของแอคติโนมัยซิทีส นอกจากนี้เอธิลแอลกอฮอล์ และเอธิลีนไกลคอล (ethylene glycol) ก็เป็นสารประกอบคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมเช่นกัน ในขณะที่กลีเซอรอล แมนนิทอล และแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีมากของการเจริญของเชื้อ (Lechevalier and Lechevalier, 1967)

จากการที่แอคติโนมัยซิทีสสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายประเภท จึงสามารถใช้คุณสมบัติดังกล่าวเป็นเกณฑ์ในการจำแนกแอคติโนมัยซิทีสแต่ละกลุ่มได้ โดยเฉพาะในกลุ่ม streptomycetes Pridham และ Gottlieb (1948) รายงานว่า *Streptomyces* เกือบทุกชนิดสามารถใช้กลูโคส แมนโนส แป้ง เดกซ์ตริน และกลีเซอรอลได้ แต่ไม่สามารถใช้ฟีนอล และเกลือของกรดฟอร์มิค กรดออกซาลิค และกรดทาร์ทาริคได้

2.4.2 <u>แหล่งไนโตรเจน</u>

แอคติโนมัยซิทีสไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ได้ ดังนั้น โปรตีน เปปโตน หรือ กรดอะมิโน จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสุดของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ รองลงมาคือ ไนเตรท และเกลือของแอมโมเนียม โดยไนเตรทถูกจัดให้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่าเกลือของแอมโมเนียม เนื่องจากไนเตรททำให้เกิดประจุลบ แต่เกลือของแอมโมเนียมจะให้ประจุบวก ซึ่งไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของแอคติโนมัยซิทีสนอกจากนี้ ยังพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตจะถูกใช้ได้ดีกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ (Waksman and Lomanitz, 1925)

แอคติโนมัยซิทีสแต่ละกลุ่มสามารถย่อยสลายโปรตีนได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น บางกลุ่มสามารถย่อยสลายเจลาติน บางกลุ่มสามารถสร้างเอนไซม์โปรติโอไลติค (proteolytic) ซึ่งจะตกตะกอนโปรตีนในนมได้ (Sykes and Skinner, 1973)

2.5 แร่ธาตุ

แอคติโนมัยซิทีสแต่ละกลุ่มสามารถใช้แร่ธาตุ เช่น ฟอสฟอรัส โปแทสเซียม และแมกนีเซียมได้ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ในขณะที่ความต้องการซัลเฟอร์ แคลเซียม และเหล็กนั้นยังไม่มีการยืนยันที่แน่นอน แต่พบว่าแอคติโนมัยซิทีสบางกลุ่มสามารถเจริญได้ดีเมื่อเติมธาตุเหล็กลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีรายงานว่าสังกะสีมีบทบาทสำคัญในการเจริญของแอคติโนมัยซิทีสบางกลุ่มด้วย แร่ธาตุเหล่านี้แม้จะถูกต้องการในปริมาณน้อย แต่ก็เป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้สำหรับการเจริญของเชื้อ (Pridham and Gottlieb,1948)

2.6 การสร้างกลิ่น

การสร้างกลิ่นเฉพาะของแอคติโนมัยซิทีสสามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกแอคติโนมัยซิทีสได้เช่นเดียวกัน โดยกลิ่นที่สร้างขึ้นอาจมีกลิ่นคล้ายกลิ่นอับ กลิ่นดิน หรือกลิ่นผลไม้ ในปี 1895 Rullmann อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) ได้ศึกษารายละเอียดของกลิ่นที่ถูกสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซิทีส พบว่าสารที่ทำให้เกิดกลิ่นที่สร้างจาก *Actinomyces ordorifer* สามารถละลายได้ในอีเธอร์ ต่อมาในปี 1947 Thaysen อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) อธิบายว่าสารดังกล่าวคือ สารจำพวกเอมีน

2.7 การสร้างรงควัตถุ

การสร้างรงควัตถุก็เป็นอีกเกณฑ์หนึ่งในการจำแนกแอคติโนมัยซิทีส รงควัตถุที่สร้างขึ้นจะมีความหลากหลายขึ้นกับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจำแนกตามลักษณะของโทนสี เช่น สีน้ำเงิน ม่วง แดง ชมพู เหลือง เขียว น้ำตาล หรือ ดำ ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือเก็บอยู่ในสายใย โดยรงควัตถุจะเกิดจากปฏิกิริยาของไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งออกซิไดส์สารประกอบอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แอคติโนมัยซิทีสบางกลุ่มสามารถสร้างรงควัตถุได้มากกว่า 1 ชนิด เช่น *Actinomyces violaceus-ruber* และ *Actinomyces tricolor* รงควัตถุโทนสีน้ำตาลจะเป็นรงควัตถุที่พบมากที่สุด โดยเฉพาะเมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้ออินทรีย์ (Tresner and Backus, 1963)

ความหลากหลายของรงควัตถุขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุของเชื้อ ปริมาณอากาศ และอุณหภูมิ นอกจากนี้กรดและด่างก็ยังมีผลต่อสีรงควัตถุอีกด้วย โดยในปี 1908 Muller อ้างอิงถึงโดย Shirling และ Gottlieb (1966) รายงานว่าพีเอชมีผลต่อการสร้างรงควัตถุของ *S. coelicolor* คือเมื่ออยู่ในภาวะเป็นกรด รงควัตถุจะเป็นสีแดง และจะกลายเป็นสีน้ำเงินเมื่อมีภาวะเป็นด่าง

2.8 การจัดจำแนกแอคติโนมัยซิทีส

นอกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ส่วนประกอบของผนังเซลล์สายใยของแอคติโนมัยซิทีสสามารถใช้เพื่อจำแนกแอคติโนมัยซิทีสได้ โดยองค์ประกอบผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีส แต่ละกลุ่มจะแตกต่างกันไปตามกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ 3 ของสายเตตราเปปไทด์ (tetrapeptide) ไกลซีนในอินเตอร์เปปไทด์บริด (interpeptide bridges) และเปปทิโดไกลแคนซูการ์ (peptidoglycan sugar) (Prescott *et al*, 1993) ซึ่งเมื่อพิจารณาส่วนประกอบของผนังเซลล์ดังกล่าวพบว่าสามารถแบ่งผนังเซลล์ออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่ I - IV โดยอ้างอิงการจัดจำแนกของ Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology (Williams *et al*., 1989) นอกจากนี้องค์ประกอบอื่นที่มีความสำคัญในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซิทีส คือ ลักษณะรูปร่างและสีของสายใยและสปอร์ การสร้างรงควัตถุที่แพร่เข้าในอาหาร (diffusible pigment) การสร้างรงควัตถุเมลานีน และลำดับเบสของ 16S rRNA ตามรายละเอียดข้างต้นสามารถใช้ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซิทีสออกได้เป็น 8 กลุ่มใหญ่ (Holt *et al*, 1994) คือ

1. Nocardioform actinomycetes

ประกอบด้วย สกุล *Nocardia*
สกุล *Rhodococcus*
สกุล *Nocaridioides*
สกุล *Pseudonocardia*
สกุล *Oerskovis*
สกุล *Saccharopolyspora*
สกุล *Micropolyspora*
สกุล *Promicromonospora*
สกุล *Intersporangium*
สกุล *Actinopolyspora*
สกุล *Saccharomonospora*
สกุล *Amycolatopsis*
สกุล *Amycolata*

2. Actinomycetes with multi-locular sporangia

ประกอบด้วย สกุล *Geodermatophilus*
สกุล *Dermatophilus*
สกุล *Frankia*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. Actinoplanetes

ประกอบด้วย สกุล *Actinoplanes*
สกุล *Ampullariella*
สกุล *Pilimelia*
สกุล *Dactylosporangium*
สกุล *Micromonospora*

4. Streptomycetes and related genera

ประกอบด้วย สกุล *Streptomyces*
สกุล *Streptoverticillium*
สกุล *Kineosporia*
สกุล *Sporichthya*

5. Maduromycetes

ประกอบด้วย สกุล *Actinomadura*
สกุล *Microbispora*
สกุล *Microtetraspora*
สกุล *Planobispora*
สกุล *Planomonospora*
สกุล *Spirillospora*
สกุล *Streptosporangium*

6. Thermomonospora and related genera

ประกอบด้วย สกุล *Thermomonospora*
สกุล *Actinosynnema*
สกุล *Nocardiopsis*
สกุล *Streptoalloterichus*

7. Thermoactinomycetes

ประกอบด้วย สกุล *Thermoactinomyces*

8. Other genera

ประกอบด้วย สกุล *Glycomyces*
สกุล *Kibdelosporangium*
สกุล *Kitasatosporia*
สกุล *Saccharothrix*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9 ประโยชน์ของแอคติโนมัยซิทีส

แอคติโนมัยซิทีสมีความสำคัญมากในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากแอคติโนมัยซิทีสเป็นแหล่งของสารทุติยภูมิที่ดี (secondary metabolite) ในปี 1994 Berdy อ้างอิงถึงโดย Kieser และคณะ (2000) ได้รายงานว่าสารทุติยภูมิทั้งหมดที่ค้นพบนั้นประมาณ 61 เปอร์เซ็นต์เป็นสารทุติยภูมิที่ได้จากแอคติโนมัยซิทีส รองลงมาคือ รา และแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และแอคติโนมัยซิทีสยังมีบทบาทเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น *Streptomyces fradiae* ใช้ผลิตนีโอมัยซิน (neomycin) *S. rimosus* ใช้ผลิตออคซีเตตราไซคลีน *Nocardia lurida* ใช้ผลิตริสโตซีติน (ristocetin) และ *Micromonospora olivoasterospora* ใช้ผลิตฟอร์ติมิซิน (fortimicin) เป็นต้น (Kieser *et al*., 2000) นอกจากนี้แอคติโนมัยซิทีสยังเป็นแหล่งของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์โปรติโอไลติคจาก *Streptomyces reticuli* (Moormann *et al*.,1993) และ *S. griseus* (Caccavo, 1999) เอนไซม์ไลโพไลติคจาก *Streptomyces cinnamomeus* (Sommer *et al*., 1997) ไคติเนสจาก *Streptomyces thermoviolaceus* (Tsujibo *et. al*., 1993) และ *S. coelicolor* (Saito *et. al*., 2001) เป็นต้น

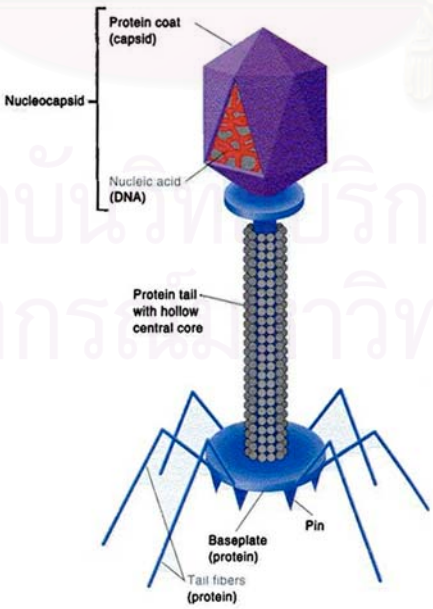
ตารางที่ 2.1 ปริมาณโดยประมาณของสารทุติยภูมิที่ถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายกลุ่มอ้างอิงในปี 1994 (Kieser *et al*., 2000)

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

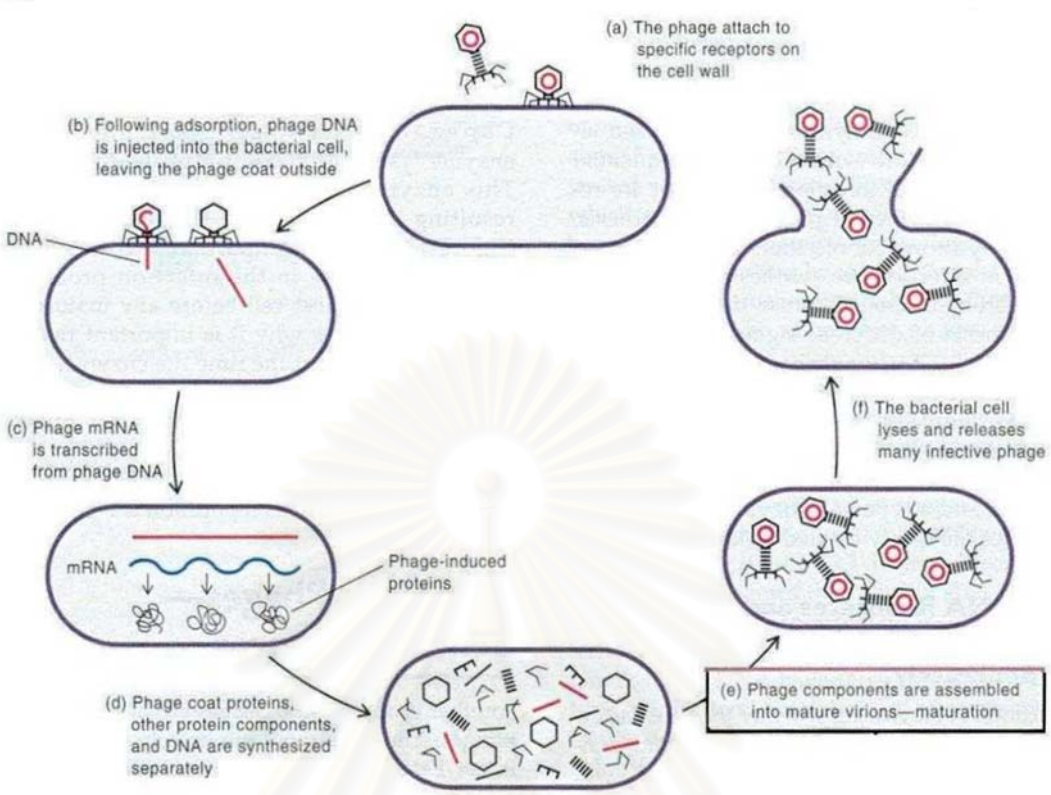
* หมายถึง สามารถพบได้จาก *Streptomyces* ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และพบได้จากแอคติโนมัยซิทีสกลุ่มอื่น ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

2.10 แอคติโนฟาจ

แอคติโนฟาจ (actinophages) เป็นฟาจ (ดังแสดงในรูปที่ 2.4) ที่สามารถทำลายแอคติโนมัยซิทีสได้ โดยจะเข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวนในเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีส เป็นผลให้เซลล์แตกและเกิดเป็นบริเวณใสของเซลล์ที่ติดเชื้อที่เรียกว่า พล๊าค (plaque) ขึ้น การที่ฟาจจะเข้าสู่โฮสท์หรือเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีสชนิดใดชนิดหนึ่งและทำให้โฮสท์เกิดการติดเชื้อได้นั้น ฟาจจะต้องมีความจำเพาะต่อแอคติโนมัยซิทีสชนิดนั้นๆ และการเกาะติด (adsorption) ของฟาจกับรีเซพเตอร์ (receptors) บนโฮสท์จะเป็นตัวจำกัดความจำเพาะระหว่างฟาจกับสายพันธุ์ของแอคติโนมัยซิทีส ฟาจแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเข้าสู่โฮสท์เซลล์ได้แตกต่างกัน ถ้าฟาจสามารถเข้าสู่โฮสท์ชนิดที่ต่างสายพันธุ์กันได้ จะเรียกว่ามีโฮสท์-เรนจ์ (host range) กว้าง แต่ถ้าฟาจสามารถเข้าสู่โฮสท์เซลล์ชนิดสายพันธุ์เดียวกันได้ จะเรียกว่ามีโฮสท์-เรนจ์แคบ (Goyal *et al*., 1987) วงจรการติดเชื้อฟาจในโฮสท์เซลล์แบ่งเป็น 2 แบบ โดยแบบแรกเรียกว่า ไลติคไซเคิล (lytic cycle) (ดังแสดงในรูปที่ 2.5) ซึ่งจะทำให้เซลล์ของแอคติโนมัยซิทีสแตกออก ฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบนี้เรียกว่า ไวรูเลนต์ฟาจ (virulent phage) เช่น ฟาจ RP2 ส่วนการติดเชื้อแบบที่สองจะเรียกว่า ไลโสเจนิคไซเคิล (lysogenic cycle) คือฟาจจะไม่ทำให้เซลล์ของแอคติโนมัยซิทีสแตก แต่ดีเอ็นเอของฟาจจะสอดแทรกเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของโฮสท์เซลล์ เรียกว่า โพรฟาจ (prophage) ฟาจที่มีวงจรชีวิตแบบนี้จะถูกเรียกว่า เทมเพอเรตฟาจ (temperate phage) เช่น ฟาจ ϕC31 เป็นต้น



รูปที่ 2.4 ส่วนประกอบต่างๆของอนุภาคฟาจ (Pelczar *et al*., 1993)



รูปที่ 2.5 ไลติคไซเคิลของแอคติโนฟาจ (Brock *et al*., 1984)

2.11 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติโนฟาจกับแอคติโนมัยซิทีส

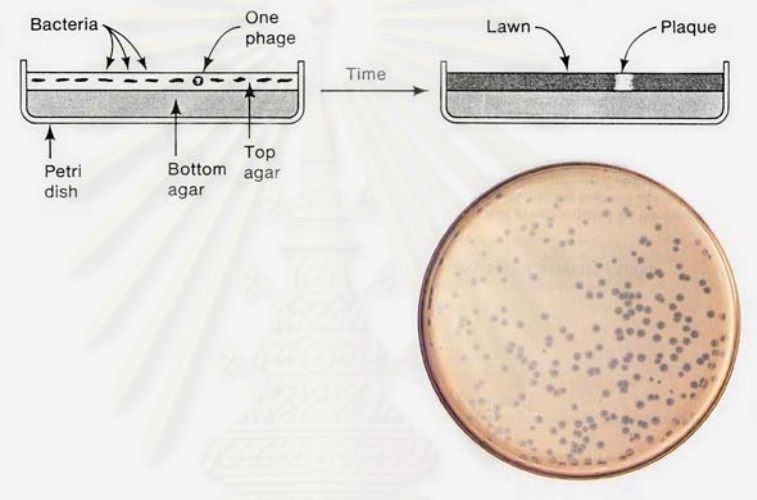
ในปี 1936 Wiebols และ Wieringa อ้างอิงถึงโดย Dowding (1973) ได้รายงานเกี่ยวกับแอคติโนมัยซิทีสที่เกิดการย่อยสลายตัวเองซึ่งแยกได้จากมันฝรั่งที่เป็นโรค พบว่าการเติมส่วนน้ำที่กรองได้จาก *Streptomyces roseus* ลงในเชื้อแอคติโนมัยซิทีส จะได้พล๊าคจำนวนมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และพบว่าน้ำกรองดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของแอคติโนมัยซิทีสได้เมื่ออยู่ในอาหารเหลว นอกจากนี้ยังสามารถแยกแอคติโนฟาจได้จาก *Actinomyces bovis* และ *Nocardia farcinica* อีกด้วย

รายงานที่เกี่ยวข้องกับการที่แอคติโนฟาจทำให้แอคติโนมัยซิทีสซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมสำคัญหลายชนิดเกิดการแตกสลายและสูญเสียผลผลิตอันเป็นปัญหาสำคัญ สามารถรวบรวมได้ดังต่อไปนี้

ในปี 1946 Woodruff และ Foster อ้างอิงถึงโดย Waksman (1950) รายงานว่าแอคติโนฟาจที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อใน *S. griseus* ซึ่งผลิตสเตรปโตมัยซินนั้นมีความจำเพาะมาก ซึ่ง

แอคติโนฟาจ ดังกล่าวจะไม่ทำให้แอคติโนมัยซิทีสกลุ่มอื่น หรือแม้แต่ใน *S. griseus* สายพันธุ์อื่นติดเชื้อ และเมื่อตรวจสอบรูปร่างของแอคติโนฟาจดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า แอคติโนฟาจของ *S. griseus* มีรูปร่างเหมือนกับแบคเทอริโอฟาจ

ในปี 1947 Saudek และ Colingsworth รายงานเกี่ยวกับ *S. griseus* ที่เกิดการติดเชื้อได้ด้วยแอคติโนฟาจ พบว่าเกิดการสลายตัวของเซลล์ และเกิดลูกหลานแอคติโนฟาจเป็นจำนวนมาก และการผลิตสเตรปโตมัยซินจะถูกยับยั้งได้ด้วยแอคติโนฟาจ ซึ่งสามารถตรวจสอบแอคติโนฟาจได้โดยใช้วิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การเพาะเลี้ยงฟาจด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น (Maloy *et al*., 1994)

ในปี 1979 Hranueli และคณะ รายงานเกี่ยวกับ *S. rimosus* ซึ่งผลิตออคซีเตตราไซคลีน ว่าเกิดการติดเชื้อของฟาจและถูกทำลายได้ด้วยแอคติโนฟาจ RP2

ในปี 1984 Anne และคณะ รายงานเกี่ยวกับแอคติโนฟาจ VP1 และ CWK ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อและทำลาย *S. venezuelae* ซึ่งผลิตทีนามัยซิน และ *S. cattleya* ซึ่งผลิตคลอแรมฟินิคอลตามลำดับ

ในปี 1986 Donadio และคณะ รายงานว่าฟาจ G3, G4 และ G5 ก่อให้เกิดการติดเชื้อและทำลายเซลล์ *S. erythreus* ซึ่งผลิตอิริโทรมัยซิน

จากรายงานข้างต้น งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรม โดยคาดว่าแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกได้จะนำไปใช้ประโยชน์ในการแก้ปัญหาที่เกิดจากแอคติโนฟาจได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D-0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) บริษัท International Scientific supply Co. Ltd., Thailand.
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (controlled environment incubator shaker) รุ่น R-88 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Ltd., U.S.A.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) รุ่น HERTZ บริษัท Kubota Corporation, Japan.
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Aquatherm G-86 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Ltd., U.S.A.
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น vortex-2 genie model G-560E บริษัท Eutech Cyberscan, Singapore.
- เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany.
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch, U.S.A.
- กระดาษกรอง (cellulose acetate membrane filter) Pore size 0.45 μm. บริษัท Sartorius, Germany.
- ฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิลิตร บริษัท Boeco, West Germany.
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (sterio microscope) รุ่น SZH-10 บริษัท Olympus Optical Co. Ltd., Japan.
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co. Ltd., Japan.
- กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) รุ่น JEM-200CX บริษัท Jeol, Japan.
- กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) รุ่น JSM-T220A บริษัท Jeol, Japan.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมี

- ฮิวมิค แอซิด (humic acid) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไคติน (chitin) บริษัท Fluka Biochemika, Switzerland.
- ไบโอติน (biotin) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไทอามีน-ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine-HCl) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไรโบเฟลวิน (riboflavin) บริษัท Merck, Germany.
- ไนอะซิน (niacin) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไพริดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxin-HCl) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- พารา-อะมิโนเบนโซอิค แอซิด (p-aminobenzoic acid) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไตรบูทิริน (tributyrin) บริษัท Fluka Biochemika, Switzerland.
- เฮกซะเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียม โบรไมด์ (hexadecyltrimethylammonium bromide) บริษัท Fluka Biochemika, Switzerland.
- โพลีเอทธีลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- อะราบิโนส (L-arabinose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- เซลโลไบโอส (cellobiose) บริษัท Fluka Biochemika, Switzerland.
- เดกซ์แทรน (dextran) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ฟรุคโตส (D-fructose) บริษัท Merck, Germany.
- กาแลคโตส (D-galactose) บริษัท Merck, Germany.
- มีโซ-อินโนสิทอล (meso –inositol) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แลคโตส (D-lactose) บริษัท Merck, Germany.
- แมนนิทอล (D-mannitol) บริษัท Difco Laboratories.
- แมนโนส (D-mannose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ราฟฟิโนส (raffinose) บริษัท Merck, Germany.
- แรมโนส (L-rhamnose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ซาลิซิน (salicin) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ซูโครส (sucrose) บริษัท Merck, Germany.
- ตรีฮาโลส (trehalose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไซลิทอล (xylitol) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไซโลส (xylose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.

- โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) บริษัท Merck, Germany.
- โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) บริษัท Merck, Germany.
- โซเดียมมาโลเนท (sodium malonate) บริษัท Merck, Germany.
- โซเดียมโพรพิโอเนท (sodium propionate) บริษัท Merck, Germany.
- โซเดียมไพรูเวท (sodium pyruvate) บริษัท Merck, Germany.
- แอสปาราจีน (L-asparagine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- โปรลีน (L-proline) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- อาจินีน (L-arginine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ซีสทีอีน (L-cysteine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ฮีสทิดีน (L-histidine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- เมทไธโอนีน (L-methionine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- โปแทสเซียม ไนเตรท (potassium nitrate) บริษัท Merck, Germany.
- ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ซีรีน (L-serine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ทรีโอนีน (L-threonine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- วาลีน (L-valine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- สารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค (2,6-diaminopimelic acid) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แลมป์ดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hin*dIII (λDNA/*Hin*dIII) บริษัท Takara., Japan.
- สารละลายพีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) บริษัท Promega, U.S.A.
- เอนไซม์ดีเอนเอพอลีเมอเรส (DNA polymerase) บริษัท Promega, U.S.A.
- ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสแพร์ ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ + 1.5 กิโลเบสแพร์ (100 bp DNA ladder + 1.5 kb) บริษัท Pacific Sciences Ltd., Thailand.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 จุลินทรีย์

3.3.1 สเตรปโตมัยซิทีส

1. *Streptomyces alboniger* ATCC 12461**
2. *Streptomyces albovinaceus* ATCC 15823**
3. *Streptomyces albus* KCC S-0357***
4. *Streptomyces aminophilus* ATCC 14961**
5. *Streptomyces aureus* KCC S-0009***
6. *Streptomyces azureus* PK 100C***
7. *Streptomyces badius* JCM 4350***
8. *Streptomyces bikiniensis* JCM 4011***
9. *Streptomyces coelicolor* KCC S-0357***
10. *Streptomyces coelicolor* M 145***
11. *Streptomyces coralus* JCM 4313*
12. *Streptomyces echinatus* KCC S-0144***
13. *Streptomyces endus* KCC S-0213***
14. *Streptomyces griseus* KA 1198*
15. *Streptomyces humifer* KCC S-0770***
16. *Streptomyces hygroscopicus subsp. hygroscopicus* JCM 4772*
17. *Streptomyces hygroscopicus subsp. hygroscopicus* NOV-1*
18. *Streptomyces lavendulae subsp. lavendulae* KCC S0055***
19. *Streptomyces lincolnensis* JCM 4297***
20. *Streptomyces lividans* TK24***
21. *Streptomyces luteofluorescens* KCC S-0203***
22. *Streptomyces luteogriseus* ISP 5483*
23. *Streptomyces melanosporofaciens* JCM 4495*
24. *Streptomyces nivous* KCC S-0251***
25. *Streptomyces nodosus* JCM 4297***
26. *Streptomyces perciperlis* V6C-6*
27. *Streptomyces pervullus* F4B-31*
28. *Streptomyces puniceus* KCC S-0406***

29. *Streptomyces sparsogenes* KCC S-0517***

30. *Streptomyces tauricus* JCM 4837*

31. *Streptomyces thermovulgaris* JCM 4520***

32. *Streptomyces* sp. PO***

33. *Microbispora rosea subsp. rosea* TISTR 1360**

* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

** ซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

*** ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Seiya Ogata Kyushu Unversity

3.3.2 จุลินทรีย์สำหรับทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ (tested organisms)

Aspergillus niger ATCC 6275

Bacillus subtilis ATCC 6633

Candida albicans ATCC 70014

Escherichia coli ATCC 25922

Micrococcus luteus ATCC 9341

Pseudomonas fluorescens K. Komagata

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5169

Staphylococcus aureus ATCC 25923

3.3.3 แอคติโนฟาจ

แอคติโนฟาจ Ap1 ถึง Ap30

Ap1 ถึง Ap10 ได้รับความอนุเคราะห์จาก เจนจิรา เดชรักษา (2543)

Ap11 ถึง Ap20 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธ์ (2544)

Ap12 ถึง Ap30 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Pringsulaka

(personal communication)

3.4 เก็บจุลินทรีย์

3.4.1 การเตรียมและเก็บรักษาสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีส

ขีด (streak) สปอร์หรือสายใยของเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียงแมนนิทอล มังบีน อการ์ (mannitol mungbean agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 8) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 7-14 วัน แล้วเติมสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล (glycerol) (ปริมาตร/ปริมาตร) 10 มิลลิลิตร ใช้ลูป (loop) ขูดให้สปอร์หลุดแล้วกรองสปอร์แขวนลอยที่ได้ในสารละลายกลีเซอรอลด้วยสำลีปลอดเชื้อ เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเก็บรักษาแอคติโนฟาจ

เก็บรักษาแอคติโนฟาจในรูปฟาจแขวนลอยในนิวเตรียนท์ บรอท (nutrient broth ; ภาคผนวก ก. หมายเลข 12) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.3 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ

ขีดเชื้อ *A. niger* ลงบนอาหารวุ้นเอียงโปเตโต เดกซ์โตรส อการ์ (potato dextrose agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 15) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-4 วัน

ขีดเชื้อ *B. subtilis*, *E. coli*, *M. luteus*, *P. fluorescens*, *S. aureus* ลงบนอาหารวุ้นเอียงนิวเตรียนท์ อการ์ (nutrient agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 11) และขีดเชื้อ *C. albicans*, *S. cerevisiae* ลงบนอาหารวุ้นเอียงยีสต์เอกซ์แทรก มอลต์เอกซ์แทรก อการ์ (yeast extract malt extract agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 25) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อเชื้อทั้งหมดเจริญดีแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารที่ใหม่ เพื่อเก็บรักษาอีกทุกๆ 1 เดือน โดยวิธีเดียวกัน

3.5 ตัวอย่างดิน

การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากจังหวัดต่างๆของประเทศไทย ตัวอย่างละประมาณ 30-100 กรัม โดยเก็บลึกจากผิวดินประมาณ 7-10 เซนติเมตร บันทึกสถานที่เก็บ ลักษณะและสีของดิน วัดพีเอช (ภาคผนวก ค ข้อ 3) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 การแยกแอคติโนมัยซิทีสจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม มาเจือจางในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เจือจางสารแขวนลอยดินให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า (serial ten fold dilution) ประมาณห้าระดับ (10^{-1}-10^{-5}) และนำสารแขวนลอยดินแต่ละระดับการเจือจางไปแช่ในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

นำสารแขวนลอยดิน 0.1 มิลลิลิตร สเปรด (spread) บนอาหารฮิวมิค แอซิด วิตามิน อการ์ (humic acid vitamin agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 6) (Hayakawa and Nonomura, 1987) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้ว โคโลนีจะมีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดเล็กบนผิวหน้าอาหารวุ้น ทำการถ่ายเชื้อโดยขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแมนนิทอล มังบีน อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7- 14 วัน เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

3.7 การเตรียมสปอร์แขวนลอย

ขีดแอคติโนมัยซิทีสจากข้อ 3.6 ลงบนอาหารวุ้นเอียงโอ๊ต มีล อการ์ (oat meal agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 13) บ่มเป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเชื้อเจริญจนมีสปอร์มากพอ เติมสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้ลูป (loop) ขูดให้สปอร์หลุดเป็นสปอร์แขวนลอยนำไปกรองด้วยสำลีปลอดเชื้อ ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้ประมาณ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ เก็บรักษาสปอร์แขวนลอยที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.8 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอคติโนฟาจกับแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิง

นำสปอร์แขวนลอยของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิงที่ทราบชนิด แต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาใส่ในซอฟท์ อการ์ (soft agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 17) ผสมให้เข้ากันเทลงบนนิวเตรียนท์ อการ์ จากนั้นนำแอคติโนฟาจแขวนลอยแต่ละชนิดมาทดสอบการทำให้เกิดการติดเชื้อในโฮสท์เซลล์ ด้วยการหยดแอคติโนฟาจแขวนลอยปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปเป็นจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดเชื้อเบื้องต้นจากการเกิดบริเวณใสตรงบริเวณทำการจุดแอคติโนฟาจแขวนลอยบนจานเพาะเชื้อ (Anne *et al*., 1984)

3.9 การตรวจสอบการติดเชื้อแอคติโนฟาจด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method)

นำแอคติโนฟาจปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสปอร์แขวนลอยของแอคติโนมัยซิทีส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมลงในซอฟท์ อการ์ ผสมให้เข้ากัน เทลงบนนิวเตรียนท์ อการ์ ที่เตรียมไว้ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดเชื้อของแอคติโนฟาจกับแอคติโนมัยซิทีสจากการเกิดพล๊าค ทำการตรวจสอบซ้ำ 2 ครั้ง (Dowding, 1973 ; Lanning and Williams, 1982 ; Anne *et al*., 1984)

3.10 การคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจ

คัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่ให้พล๊าค เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อแอคติโนฟาจด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.9

3.11 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนมัยซิทีสจากข้อ 3.7 มาทำการจุด (spot) ลงบนผิวหน้าของอาหารนิวเตรียนท์ อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำจุลินทรีย์ทดสอบที่ทำการเพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อ 3.4.3 มาเติมสารละลายนอร์มอล ซาลีน (0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์) ได้เป็นเซลล์แขวนลอย นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางจนวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.1

นำเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละตัว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมลงใน ซอฟท์ อการ์ ผสมให้เข้ากันนำไปเททับลงบนเชื้อแอคติโนมัยซิทีสที่เจริญเป็นจุดบนนิวเตรียนท์ อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบเชื้อแอคติโนมัยซิทีส

3.12 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ขั้นต้น

3.12.1 <u>เอนไซม์โปรติโอไลติค</u> (proteolytic enzyme)

เลี้ยงแอคติโนมัยซิทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อสคิม มิลค์ อการ์ (skim milk agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 18) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติโอไลติค โดยสังเกตวงใสรอบโคโลนีหลังจากบ่ม เป็นเวลา 3 วัน (Williams *et al*.,1989)

3.12.2 <u>เอนไซม์ไลโพไลติค</u> (lipolytic enzyme)

เลี้ยงแอคติโนมัยซิทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อไตรบิวทิริน อการ์ (tributyrin agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 21) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไลโพไลติคโดยสังเกตวงใสจากการย่อยสลายไตรบิวทิริน หลังจากบ่มเป็นเวลา 6 วัน (Tanigaki *et al*., 1995)

3.12.3 <u>เลซิติเนส</u> (lecithinase)

เลี้ยงแอคติโนมัยซิทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอค โยค อการ์ (egg yolk agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 4) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เลซิติเนสโดยสังเกตสีเหลืองบริเวณรอบโคโลนี หลังจากบ่มเป็นเวลา 6 วัน (Nitsch and Kutzner,1969)

3.12.4 <u>เพคติเนส</u> (pectinase)

เลี้ยงแอคติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพคติน อการ์ (pectin agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 14) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพคติน โดยสังเกตวงใส เมื่อเทสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ เฮกซะเดซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (hexadecyltrimethylammonium bromide) บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากบ่มเป็นเวลา 6 วัน (Hankin *et al*.,1971)

3.12.5 <u>ไคติเนส</u> (chitinase)

เลี้ยงแอคติโนมัยซิทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อคอลลอยดัล ไคติน อการ์ (colloidal chitin agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบวงใสรอบโคโลนีหลังจากบ่มเป็นเวลา 14 วัน (Hsu and Lockwood,1975)

3.13 **การวิเคราะห์หา 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค (2,6-diaminopimelic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีส** (Cross and Goodfellow, 1973)

3.13.1 <u>การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี</u>

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอกซ์แทรก เดกซ์โตรส (yeast extract dextrose medium ; ภาคผนวก ก หมายเลข 24) บ่มเป็นเวลา 3-4 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แล้วแยกเซลล์ด้วยการปั่น นำเซลล์มาผสมกับเอทธานอล ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้น

แยกเซลล์ด้วยการปั่น ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นำเซลล์แห้งมาผสมกับกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 6 นอร์มอล ทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมากรองเอาส่วนน้ำใส เติมบิวธานอล 1-2 หยด ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบชนิดขององค์ประกอบผนังเซลล์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เทียบกับสารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค

3.13.2 วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Staneck and Roberts, 1974)

ใช้ตัวฉาบคือเซลลูโลสบนตัวยึดที่เป็นแผ่นพลาสติก ขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร หยด (spot) สารสกัดจากวิธี 3.13.1 บนแผ่นพลาสติกที่ฉาบด้วยเซลลูโลส จุดละ 1 ไมโครลิตร ห่างจากขอบล่างประมาณ 1.5 –2 เซนติเมตร นำแผ่นพลาสติกที่ฉาบนั้น นำไปอบในถังโครมาโทกราฟีที่อิ่มตัวด้วยสารผสมของตัวแยกเคลื่อนที่ ตัวแยกเคลื่อนที่ที่ใช้คือ เมทานอล ต่อ น้ำ ต่อ 6 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริค ต่อ ไพริดีน อัตราส่วน 80 : 26 : 4 :10 โดยต้องแน่ใจว่าบรรยากาศในโหลแก้วนั้นจะต้องอิ่มตัวด้วยไอของตัวแยกเคลื่อนที่นั้น ใช้เทคนิคที่ให้ตัวแยกเคลื่อนที่ไหลขึ้น ปล่อยของเหลวนั้นไหลซึมขึ้นไปบนแผ่นที่ฉาบผ่านจุดที่หยดไว้ที่จุดเริ่มต้น (ที่หยดเอาไว้) จนถึงตำแหน่งที่กำหนด (ห่างจากปลายบนประมาณ 1 เซนติเมตร) สารแต่ละชนิดจะถูกตัวแยกเคลื่อนที่ละลายพาขึ้นไปด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันเมื่อตัวไหลซึมขึ้นไปด้วยระยะทาง 17 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น นำออกมาผึ่งให้แห้ง ตรวจแถบที่สารเคลื่อนที่โดยพ่น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นินไฮดรินที่ละลายในอะซิโตนลงบนแผ่นฉาบ นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที จะเกิดจุดสีน้ำตาลม่วง วัดค่า R_f คือระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

3.14 การศึกษาลักษณะและสมบัติของแอคติโนมัยซิทีส

ศึกษาตามวิธีที่รายงานโดย Williams และ คณะ (1983) และ Bergey ‘s Manual of Systematic Bacteriology Volume 4. (Williams *et al*.,1989)

3.14.1 การศึกษาสีของสายใยอาหารและสปอร์

ขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออินออร์แกนิค ซอล์ท สตาร์ช อการ์ (inorganic salt starch agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 7) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตสีของสายใยอาหารและสปอร์ที่เกิดขึ้น

3.14.2 การศึกษาลักษณะของสปอร์

ขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออินออร์แกนิค ซอล์ท สตาร์ช อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ศึกษาลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านตามวิธีใน ภาคผนวก ค.ข้อ 2

3.14.3 การศึกษาลักษณะของสายสปอร์

ขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออินออร์แกนิค ซอล์ท สตาร์ช อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ศึกษาลักษณะของสายใย และ การเรียงตัวของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดตามวิธีในภาคผนวก ค ข้อ 1

3.14.4 การศึกษาการสร้างรงควัตถุเมลานิน (melanin pigment)

ขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารวุ้นเอียงเปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรก ไอรอน อการ์ (peptone yeast extract iron agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 15) และ อาหารวุ้นเอียงไทโรซีน อการ์ (tyrosine agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 23) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจดูการสร้างรงควัตถุเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 โดยจะเกิดสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มในอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นเอียง

3.14.5 การศึกษาการสร้างรงควัตถุที่สามารถแพร่กระจายได้ (diffusible pigment)

ขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารวุ้นเอียงกลีเซอรอล-แอสปาราจีน อการ์ (glycerol – asparagine agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 5) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน โดยจะเกิดสีบนอาหารวุ้นเอียง คือ เหลือง-น้ำตาล น้ำเงิน เขียว แดง ส้ม และม่วง

3.14.6 การรีดิวซ์ไนเตรท

แทง (stab) เชื้อแอคติโนมัยซิทีสในอาหารเลี้ยงเชื้อไนเตรท อการ์ (nitrate agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 10) ในหลอดทดลองขนาด 16 X 150 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท โดยหยดสารละลายเอ (น้ำยาอัลฟาแนพธิลามีน) และบี (น้ำยากรดซัลฟานิลิค) (ภาคผนวก ข ; หมายเลข 2) ลงในหลอดทดลอง ซึ่งจะเกิดสีแดง แต่ถ้าไนไตรทถูกสลายต่อไปเป็นแอมโมเนีย และ ก๊าซไนโตรเจน การทดสอบจะไม่เกิดสีแดง ต้องทดสอบขั้นที่สอง โดยเติมผงสังกะสี (zinc powder) ลงไป ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ (Shirling and Gottlieb,1966)

3.14.7 <u>การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์</u>

แทง (stab) เชื้อแอคติโนมัยซิทีสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนเป็นองค์ประกอบในหลอดทดลองขนาด 16 X 150 มิลลิเมตร ใส่กระดาษเลดอะซิเตท (lead acetate strip) ไว้ภายในอย่าให้ถูกอาหาร (หนีบปลายกระดาษไว้กับจุกหลอด) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จากกระดาษเลดอะซิเตทจะเปลี่ยนเป็นสีดำ (Shirling and Gottlieb,1966)

3.14.8 <u>การศึกษาสมบัติของการย่อยสลาย (degradation activity)</u>

ศึกษาสมบัติการย่อยสลายสารแต่ละชนิดดังแต่ไปนี้

0.5% อะดีนีน (adenine)

0.5% ไทโรซีน (tyrosine)

0.4% ไซแลน (xylan)

0.4% แซนทีน (xanthine)

0.1% เคซีน (casein)

0.05% กัวนีน (guanine)

0.4% เจลาติน (gelatin)

1.0% แป้ง (starch)

โดยขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนทอการ์ (modified bennett agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 9) ที่ประกอบไปด้วยสารเคมีแต่ละชนิด ตรวจสอบการย่อยสลายสารโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงความใส บริเวณรอบหรือใต้โคโลนีในอาหารวุ้น ยกเว้น การย่อยสลายเจลาติน และ แป้ง ตรวจสอบโดยการสังเกตวงใสหลังจากเททับด้วยสารละลาย แอซิดดิไฟล์ เมอร์คิวริคคลอไรด์ (acidified $HgCl_2$) และ ไอโอดีน (iodine) ตามลำดับ

3.14.9 <u>การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ</u>

โดยขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนทอการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญหลังจาก 7 และ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญหลังจาก 2 และ 4 สัปดาห์

3.14.10<u>การตรวจสอบการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.3</u>

โดยขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนทอการ์ ที่มีพีเอช เท่ากับ 4.3 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญหลังจาก 7 และ 14 วัน

3.14.11 <u>การตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน</u>

ตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนดังต่อไปนี้

0.1% อาจินีน (L-arginine)

0.1% ซีสทีอีน (L-cysteine)

0.1% ฮีสทิดีน (L-histidine)

0.1% เมทไธโอนีน (L-methionine)

0.1% โปแทสเซียม ไนเตรท (potassium nitrate)

0.1% ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine)

0.1% ซีรีน (L-serine)

0.1% ทรีโอนีน (L-threonine)

0.1% วาลีน (L-valine)

โดยขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม (basal medium agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่ประกอบที่ประกอบไปด้วยสารประกอบไนโตรเจนแต่ละชนิด ตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โดยเทียบการเจริญกับอาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม ที่ไม่ได้เติมสาร และ อาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม ที่ประกอบด้วย 0.1% แอสปาราจีน (L-asparagine) หรือ 0.1% โปรลีน (L-proline)

3.14.12 <u>การตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน</u>

ตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนดังต่อไปนี้

1.0% อะราบิโนส (L-arabinose)

1.0% เซลโลไบโอส (cellobiose)

1.0% เดกซ์แทรน (dextran)

1.0% ฟรุคโตส (D-fructose)

1.0% กาแลคโตส (D-galactose)

1.0% มีโซ-อินโนสิทอล (meso –inositol)

1.0% แลคโตส (D-lactose)

1.0% แมนนิทอล (D-mannitol)

1.0% แมนโนส (D-mannose)

1.0% ราฟฟิโนส (raffinose)

1.0% แรมโนส (L-rhamnose)

1.0% ซาลิซิน (salicin)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.0% ซูโครส (sucrose)

1.0% ตรีฮาโลส (trehalose)

1.0% ไซลิทอล (xylitol)

1.0% ไซโลส (xylose)

0.1% โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)

0.1% โซเดียมซิเตรท (sodium citrate)

0.1% โซเดียมมาโลเนท (sodium malonate)

0.1% โซเดียมโปรปิโอเนท (sodium propionate)

0.1% โซเดียมไพรูเวท (sodium pyruvate)

โดยขีดเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิไลเซชั่น อการ์ (carbon utilization agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่ประกอบไปด้วยสารประกอบคาร์บอนแต่ละชนิด ตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนโดยเทียบการเจริญกับอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิไลเซชั่น อการ์ ที่ไม่ได้เติมสาร และอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิไลเซชั่น อการ์ ที่ประกอบด้วย 1.0% กลูโคส บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

3.15 วิธีการทั่วไปสำหรับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

3.15.1 <u>การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแอคติโนมัยซิทีส</u> ตามวิธีของ Ausubel และคณะในปี 1994 อ้างอิงถึงโดย Kieser และคณะ (2000)

เลี้ยงเซลล์แอคติโนมัยซิทีสที่ต้องการแยกโครโมโซมในอาหารเลี้ยงเชื้อทริปติก ซอย บรอท (tryptic soy broth ; ภาคผนวก ก หมายเลข 22) 30 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ในหลอดทดลองขนาด 16X100 มิลลิเมตร ที่ 3,000 รอบต่อนาที 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสให้หมด กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ TE25S (25mM Tris-HCl, pH 8, 25mM EDTA pH 8, 0.3M sucrose) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติมไลโซไซม์ (lysozyme) ปริมาตร 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30-60 นาที เติมโปรติเนส เค (proteinase K) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ 10% เอสดีเอส (SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว นำมาเติม 5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายซีแท็บ/โซเดียมคลอไรด์ (10% CTAB/0.7M NaCl) ปริมาตร 0.65 มิลลิลิตร ผสมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ปริมาตรเท่าตัวลงไป ทิ้งไว้ 30 นาที โดยผสมให้เข้า

กันเป็นครั้งคราว นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายเอาส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่แล้วเติมสารละลายไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 0.6 เท่า จะเห็นดีเอ็นเอเป็นเส้นใสๆ นำมาล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทธานอล ทำให้แห้ง และละลายในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร

3.15.2 <u>การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส</u>

เตรียมอะกาโรสเจล 0.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหลอมในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวี (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye ; ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ในอัตราส่วน 1:5 หยอดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเลคโทรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ 50 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาถึงขอบเจลอีกด้าน ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตราฐาน คือ แลมป์ดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hin*dIII

3.16 การจัดจำแนกแอคติโนมัยซิทีสโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

การออกแบบไพร์เมอร์ (primer) อ้างอิงข้อมูล Kataoka และคณะ (1997) เพื่อใช้ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ไพร์เมอร์ดังกล่าวคือ

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

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

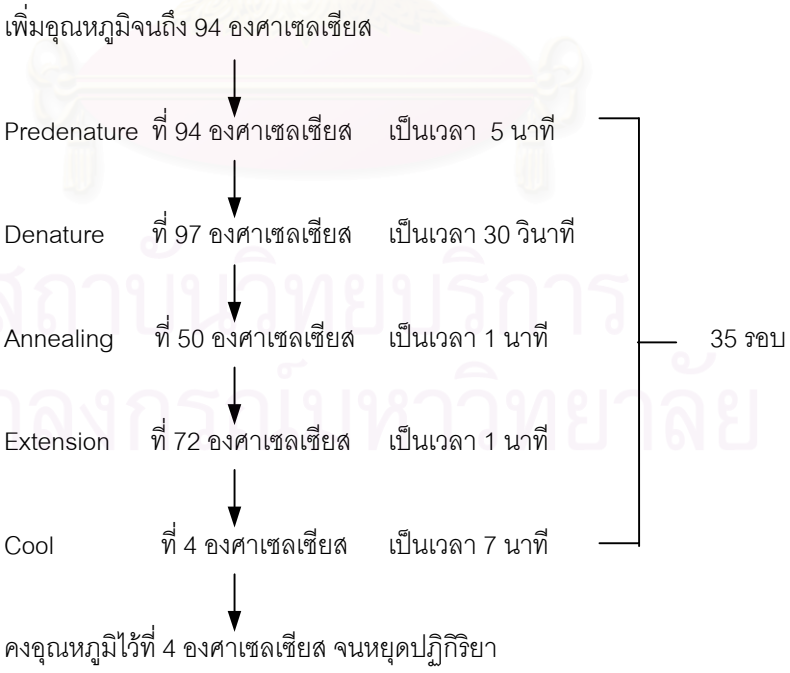
ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสที่คัดแยกได้ซึ่งสกัดด้วยวิธีของ Ausubel และคณะ ในปี 1994 อ้างอิงถึงโดย Kieser และคณะ (2000) ตามวิธีในข้อ 3.15.1 เป็นแม่แบบ (template) ในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย สารผสม dNTP forward primer reverse primer เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลีเมอเรส สารละลายพีซีอาร์บัฟเฟอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และ น้ำกลั่นบริสุทธ์ ซึ่งส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.1 และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสควบคุมอุณหภูมิดังแสดงในรูปที่ 3.1

ตรวจสอบยีนที่มีขนาดประมาณ 500 เบส ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสตามวิธีในข้อ 3.15.2 กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสแพร์ ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ + 1.5 กิโลเบสแพร์

ภายหลังการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแล้ว เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดยใช้บริการของ Bioservice unit ด้วยเครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ABI Prism™ (Perkin-Elmer, U.S.A.) (ภาคผนวก ง) วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม Dnasis แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสด้วยโปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ

รีเอเจนต์	ปริมาตรที่เติม (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	29
10X PCR บัฟเฟอร์	5
สารผสม dNTP (dNTP mixture)	5
Primer1 (forward) 50 พิโคโมล์/ไมโครลิตร	1
Primer2 (reverse) 50 พิโคโมล์/ไมโครลิตร	1
แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 ไมโครโมล์	3
แม่แบบ (template)	5
เอนไซม์ดีเอนเอพอลีเมอเรส1 ยูนิท/ไมโครลิตร	1



รูปที่ 3.1 ไดอะแกรมการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ลักษณะของตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจาก 26 จังหวัด ในประเทศไทย จำนวน 32 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมได้มีเนื้อดิน สี และ พีเอช แตกต่างกัน ตัวอย่างดินส่วนใหญ่เก็บในบริเวณที่มีการเกษตรกรรม เช่น สวนผลไม้ นาข้าว เป็นต้น และบริเวณที่มีต้นไม้ หรือ วัชพืชขึ้นปกคลุม ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.2 การแยกแอคติโนมัยซิทีสจากตัวอย่างดิน

จากการแยกแอคติโนมัยซิทีสจากตัวอย่างดิน 32 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อฮิวมิค แอซิด วิตามิน อการ์ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6 พบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยซิทีสได้จำนวน 117 สายพันธุ์ เรียงตามลำดับตัวอย่างดินที่นำมาแยก ดังแสดงในตารางที่ 4.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มา ลักษณะทั่วไป และ พีเอชของตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน	แหล่งที่มา	ลักษณะทั่วไป	พีเอช	ตัวอย่างดิน	แหล่งที่มา	ลักษณะทั่วไป	พีเอช
1	อ.ศรีเทพ จ.เพชรบูรณ์	ดินหยาบปานกลาง สีดำ	8.04	17	อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี	ดินหยาบ สีดำ	5.75
2	เขตคลองเตย กรุงเทพฯ	ดินละเอียด สีดำ	7.78	18	อ.เมือง จ.มหาสารคาม	ดินละเอียด สีน้ำตาล – ดำ	5.43
3	อ.ผักไห่ จ.อยุธยา	ดินหยาบปานกลาง สีน้ำตาล	5.50	19	อ.ปักธงชัย จ.นครราชสีมา	ดินหยาบปานกลาง สีน้ำตาล	5.79
4	อ.หนองม่วง จ.ลพบุรี	ดินหยาบปานกลาง สีดำ-น้ำตาล	6.65	20	อ.ด่านขุนทด จ.นครราชสีมา	ดินละเอียด สีน้ำตาล	7.31
5	อ.เมือง จ.ยโสธร	ดินหยาบ สีน้ำตาล	5.79	21	อ.บ้านตาก จ.ตาก	ดินหยาบปานกลาง สีดำ	7.53
6	อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	ดินหยาบ สีน้ำตาลอ่อน	6.05	22	อ.เมือง จ.ตาก	ดินละเอียด สีน้ำตาล	7.21
7	อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี	ดินละเอียด สีดำ	6.56	23	อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์	ดินหยาบปานกลาง สีดำ	7.92
8	เขาหลวง จ.เพชรบุรี	ดินละเอียด สีน้ำตาล-ดำ	6.60	24	อ.เมือง จ.ลำพูน	ดินหยาบปานกลาง สีน้ำตาล	6.32
9	เขาตะเกียบ จ.ประจวบคีรีขันธ์	ดินละเอียด สีน้ำตาลดำ	6.21	25	อ.บ้านเขาทราย จ.พิจิตร	ดินละเอียด สีน้ำตาล	6.89
10	อ.ป่าโมก จ.อ่างทอง	ดินละเอียด สีดำ	6.27	26	อ.หนองบัว จ.นครสวรรค์	ดินละเอียด สีดำ	7.04
11	อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร	ดินหยาบปานกลาง สีน้ำตาล-แดง	6.89	27	อ.เมือง จ.ชัยนาท	ดินละเอียด สีน้ำตาล	6.25
12	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ดินหยาบ สีดำ	6.47	28	อ.สรรคบุรี จ.ชัยนาท	ดินหยาบปานกลาง สีน้ำตาล	6.72
13	อ.เมือง จ.นครนายก	ดินหยาบ สีน้ำตาล-ดำ	7.24	29	อ.เมือง จ.ชัยภูมิ	ดินละเอียด สีดำ	7.94
14	อ.สามโคก จ.ปทุมธานี	ดินหยาบปานกลาง สีน้ำตาล	6.98	30	อ.ซับใหญ่ จ.ชัยภูมิ	ดินหยาบ สีดำ	8.12
15	อ.บ้านโพธิ์ จ.ฉะเชิงเทรา	ดินละเอียด สีน้ำตาล	5.91	31	อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี	ดินละเอียด สีน้ำตาล- ดำ	6.32
16	อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์	ดินหยาบ สีน้ำตาล	5.73	32	อ.เมือง จ.จันทบุรี	ดินละเอียด สีน้ำตาล	5.86

ตารางที่ 4.2 สายพันธุ์ของแอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 32 ตัวอย่าง

ลำดับตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้	ลำดับตัวอย่างดิน	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้
1	Ac1.1	17	Ac17.1
2	Ac2.1, Ac2.2	18	Ac18.1, Ac18.2
3	Ac3.1, Ac3.2, Ac3.3	19	Ac19.1, Ac19.2, Ac19.3, Ac19.4, Ac19.5, Ac19.6
4	ไม่สามารถแยกได้	20	Ac20.1, Ac20.2, Ac20.3, Ac20.4, Ac20.5, Ac20.6, Ac20.7
5	Ac5.1	21	Ac21.1, Ac21.2, Ac21.3, Ac21.4, Ac21.5
6	Ac6.1, Ac6.2, Ac6.3	22	Ac22.1, Ac22.2, Ac22.3, Ac22.4, Ac22.5, Ac22.6
7	Ac7.1, Ac7.2, Ac7.3, Ac7.4	23	Ac23.1, Ac23.2, Ac23.3, Ac23.4, Ac23.5, Ac23.6, Ac23.7
8	Ac8.1, Ac8.2	24	Ac24.1, Ac24.2, Ac24.3, Ac24.4, Ac24.5, Ac24.6, Ac24.7, Ac24.8
9	ไม่สามารถแยกได้	25	Ac25.1, Ac25.2, Ac25.3, Ac25.4, Ac25.5, Ac25.6
10	Ac10.1, Ac10.2	26	Ac26.1, Ac26.2, Ac26.3, Ac26.4, Ac26.5, Ac26.6
11	Ac11.1, Ac11.2	27	Ac27.1, Ac27.2, Ac27.3, Ac27.4, Ac27.5, Ac27.6
12	Ac12.1, Ac12.2, Ac12.3	28	Ac28.1, Ac28.2, Ac28.3
13	Ac13.1, Ac13.2	29	Ac29.1, Ac29.2, Ac29.3, Ac29.4
14	Ac14.1, Ac14.2	30	Ac30.1, Ac30.2
15	Ac15.1	31	Ac31.1, Ac31.2, Ac31.3, Ac31.4, Ac31.5
16	Ac16.1, Ac16.2, Ac16.3	32	Ac32.1, Ac32.2, Ac32.3, Ac32.3, Ac32.3, Ac32.4, Ac32.5, Ac32.6, Ac32.7, Ac32.8, Ac32.9, Ac32.10, Ac32.11, Ac32.12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอคติโนฟาจกับแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิง

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิงที่ได้จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ Prof. Dr. Seiya Ogata จำนวน 32 สายพันธุ์ มาทดสอบการติดเชื้อแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิดซึ่งได้จาก เจนจิรา เดชรักษา (2543) ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ (2544) และ Pringsulaka (personal communication) พบว่าแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิงมีการติดเชื้อแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิด แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการติดเชื้อของแอคติโนฟาจ กับแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิง

แอคติโนฟาจ	แอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิง															
	Streptomyces alboniger	*S. albovinaceus*	*S. albus*	*S. aminophilus*	*S. aureus*	*S. azureus*	*S. badius*	*S. bikiniensis*	*S. coelicolor*KCCS-0357	*S. coelicolor* M 145	*S. coralus*	*S. echinatus*	*S. endus*	*S. griseus*	*S. humifer*	*S. hygroscopicus* 4772
Ap1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap3	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C
Ap4	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-
Ap7	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	C	C	C	-	C
Ap8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-
Ap10	-	C	-	-	C	-	C	C	C	-	C	C	C	-	C	-
Ap11	-	C	-	C	C	-	C	-	C	-	-	C	C	C	C	C
Ap12	-	-	-	-	-	-	C	-	C	-	C	C	-	-	C	-
Ap13	-	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-
Ap14	-	C	-	C	-	-	C	-	C	-	-	C	C	C	-	C
Ap15	-	C	-	C	-	-	-	C	C	-	-	C	C	C	-	C
Ap16	-	C	-	-	C	C	C	-	C	C	-	C	-	-	-	-
Ap17	-	-	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-
Ap18	-	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-
Ap19	-	C	-	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C
Ap20	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C
Ap21	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	C
Ap22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
Ap23	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	C	-	C	C	-	-
Ap24	-	-	-	-	C	-	C	C	-	-	-	C	C	-	C	-
Ap25	-	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-
Ap26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap28	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	-	-	-
Ap29	-	-	C	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C : พล๊าคลักษณะใส T : พล๊าคลักษณะขุ่น - : ไม่เกิดการติดเชื้อ

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการติดเชื้อของแอคติโนฟาจกับแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิง(ต่อ)

แอคติโนฟาจ	แอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิง															
	S. hygroscopicus NOV-1	*S. lavendulae*	*S. lincolnensis*	*S. lividans*	*S. luteofluorescens*	*S. luteogriseus*	*S. melanosporofaciens*	*S. nivous*	*S. nodosus*	*S. periciperlis*	*S. pervullus*	*S. puniceus*	*S. sparsogenes*	*S. tauricus*	*S. thermovulgaris*	*Streptomyces* sp. PO
Ap1	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap2	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-
Ap3	C	-	-	C	-	T	C	C	-	-	C	-	-	C	-	-
Ap4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap5	-	-	-	-	-	C	C	C	C	-	C	-	-	-	-	-
Ap6	-	-	-	-	-	C	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-
Ap7	C	-	C	C	C	-	-	C	C	-	C	-	-	-	-	-
Ap8	-	-	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap9	-	-	C	C	C	C	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap10	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	-	-
Ap11	C	-	C	C	C	-	C	C	C	-	-	-	C	C	-	-
Ap12	-	-	C	-	C	C	-	C	C	-	-	-	-	C	C	-
Ap13	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C
Ap14	C	-	C	-	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	
Ap15	C	-	-	C	C	C	C	C	C	-	-	-	-	C	-	
Ap16	C	-	-	C	-	C	C	C	C	-	C	C	-	-	-	C
Ap17	-	-	C	C	-	C	C	C	-	-	C	C	-	-	-	C
Ap18	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C
Ap19	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C
Ap20	C	-	C	C	-	C	C	-	-	-	C	-	C	-	-	-
Ap21	-	-	-	-	-	C	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap22	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	T
Ap23	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-
Ap24	-	-	C	-	C	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-
Ap25	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	-	C
Ap26	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	C	-
Ap27	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap28	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-
Ap29	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-
Ap30	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-

C : พล๊าคลักษณะใส T : พล๊าคลักษณะขุ่น - : ไม่เกิดการติดเชื้อ

4.4 การตรวจสอบการติดเชื้อแอคติโนฟาจกับแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ที่แยกได้

ผลตรวจสอบการติดเชื้อแอคติโนฟาจ 30 ชนิดซึ่งมีความสามารถในการทำให้เกิดการติดเชื้อในแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิงได้แตกต่างกัน กับแอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้ 117 สายพันธุ์ โดยดูจากการเกิดพล๊าคตามวิธีดำเนินการวิจัย 3.9 โดยการทำซ้ำ 2 ครั้ง ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยพบว่า

แอคติโนมัยซิทีสที่เกิดการติดเชื้อแอคติโนฟาจ	0	ชนิด มี	4	สายพันธุ์
แอคติโนมัยซิทีสที่เกิดการติดเชื้อแอคติโนฟาจ	1-5	ชนิด มี	33	สายพันธุ์
แอคติโนมัยซิทีสที่เกิดการติดเชื้อแอคติโนฟาจ	6-10	ชนิด มี	27	สายพันธุ์
แอคติโนมัยซิทีสที่เกิดการติดเชื้อแอคติโนฟาจ	11-15	ชนิด มี	34	สายพันธุ์
แอคติโนมัยซิทีสที่เกิดการติดเชื้อแอคติโนฟาจ	16-20	ชนิด มี	19	สายพันธุ์

4.5 การคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่เกิดการติดเชื้อแอคติโนฟาจ

จากการตรวจสอบการติดเชื้อแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิด ต่อแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ สามารถคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิดได้จำนวน 4 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ Ac1.1, Ac2.2, Ac25.4 และ Ac26.4

นำทั้ง 4 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาตรวจสอบการติดเชื้อซ้ำ ด้วยแอคติโนฟาจที่ความเข้มข้นอื่น โดยการเจือจางแอคติโนฟาจแขวนลอยให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า (serial ten fold dilution) ประมาณสามระดับ (10^{-1}-10^{-3}) ผลการตรวจสอบซ้ำพบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจ 30 ชนิด ที่เจือจางทั้งสามระดับได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการติดเชื้อของแอคติโนฟาจ กับแอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้

แอคติโนฟาจ	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน																													
	Ac 1.1	Ac 2.1	Ac 2.2	Ac. 3.1	Ac. 3.2	Ac. 3.3	Ac. 5.1	Ac. 6.1	Ac. 6.2	Ac. 6.3	Ac. 7.1	Ac. 7.2	Ac. 7.3	Ac. 7.4	Ac. 8.1	Ac. 8.2	Ac. 10.1	Ac. 10.2	Ac. 11.1	Ac. 11.2	Ac. 12.1	Ac. 12.2	Ac. 12.3	Ac. 13.1	Ac. 13.2	Ac. 14.1	Ac. 14.2	Ac. 15.1	Ac. 16.1	Ac. 16.2
Ap1	-	-	-	-	C	-	C	C	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	C
Ap2	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap3	-	C	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	C	-	-
Ap4	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
Ap6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
Ap7	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	C
Ap8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
Ap9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap10	-	-	-	-	-	-	C	C	-	C	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	-	-	C	C
Ap11	-	-	-	-	-	-	C	C	-	C	C	-	-	C	C	-	C	-	-	-	C	-	-	C	C	-	-	-	C	C
Ap12	-	-	-	-	-	C	C	C	-	C	-	C	-	C	-	-	C	-	-	-	C	-	-	C	C	-	C	-	-	C
Ap13	-	-	-	-	-	C	C	C	-	C	C	-	-	C	-	-	C	-	-	-	C	-	-	C	-	-	C	-	C	C
Ap14	-	-	-	-	-	C	C	C	-	C	-	C	-	C	-	-	C	-	-	-	C	-	-	C	C	-	C	-	C	C
Ap15	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	C
Ap16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C
Ap17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	C	-	-	-	C	-	-	C	C	-	C	-	C	C
Ap19	-	-	-	-	C	-	C	C	C	-	-	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	-	C	-	C	C
Ap20	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	C
Ap21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C
Ap22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C
Ap23	-	-	-	-	-	-	-	C	-	C	-	C	-	-	C	-	C	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap24	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	C	-	-	C	C
Ap25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C
Ap27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap28	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C

C : พล๊าคลักษณะใส - : ไม่เกิดการติดเชื้อ

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการติดเชื้อของแอคติโนฟาจ กับแอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้ (ต่อ)

แอคติโนฟาจ	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน																												
	Ac. 16.3	Ac. 17.1	Ac. 18.1	Ac. 18.2	Ac. 19.1	Ac. 19.2	Ac. 19.3	Ac. 19.4	Ac. 19.5	Ac. 19.6	Ac. 20.1	Ac. 20.2	Ac. 20.3	Ac. 20.4	Ac. 20.5	Ac. 20.6	Ac. 20.7	Ac. 21.1	Ac. 21.2	Ac. 21.3	Ac. 21.4	Ac. 21.5	Ac. 22.1	Ac. 22.2	Ac. 22.3	Ac. 22.4	Ac. 22.5	Ac. 22.6	Ac. 23.1	Ac. 23.2
Ap1	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-
Ap2	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap3	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap4	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-
Ap5	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	-	C	-	C	-	-	-	-	C
Ap6	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
Ap7	-	-	-	-	C	-	C	-	C	C	-	-	-	-	-	C	-	-	C	C	C	-	-	C	C	-	-	-	-	-
Ap8	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap9	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	C	C	C	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-
Ap10	-	-	-	C	C	-	-	C	C	C	C	-	-	-	C	-	-	C	C	C	C	C	-	C	C	-	-	-	-	-
Ap11	-	-	-	-	C	-	C	C	C	C	C	-	-	-	C	-	-	-	C	C	C	C	-	C	-	-	C	-	-	-
Ap12	-	-	-	-	C	-	-	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	C	C	C	C	-	-	C	-	-	C	C	C	-
Ap13	-	-	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	-	-	-	-	C	-
Ap14	-	-	-	-	C	-	-	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	C	C	C	C	-	-	C	-	-	C	-	C	-
Ap15	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	C	-	-	-	C	C	C	-	C	C	C	-	C	C	-	C	-	-	C	C
Ap16	-	-	C	C	C	-	-	C	C	C	C	-	C	-	-	C	-	C	C	C	C	-	C	C	-	-	-	-	-	C
Ap17	-	-	C	C	C	-	-	-	C	C	C	-	C	-	-	C	-	C	C	C	C	-	C	C	-	-	-	-	-	C
Ap18	C	-	C	C	C	-	-	C	C	C	C	C	C	-	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	-	C	C
Ap19	-	-	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	-	-	C	-	C	C	C	C	-	C	C	-	-	C	-	C	-
Ap20	-	-	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	-	C	-	C	-	-	C	C	-	-	C	C	C	-	-	-	C	C
Ap21	-	-	C	-	-	-	-	-	C	C	C	-	C	C	-	C	-	-	-	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-
Ap22	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	C	-	-	-	-	-
Ap23	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	C	-	-	C	-	C	-	C	-	-	-	C	-	-	-	-
Ap24	-	C	C	C	C	-	C	C	C	C	-	C	-	-	C	-	-	C	C	C	C	-	C	C	C	-	-	C	C	-
Ap25	-	-	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C	-	C	C	C
Ap26	-	-	C	-	-	-	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	C	C	C	-	-	-	-	C
Ap27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap28	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap29	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	C	-	-	-	-	-
Ap30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C : พลาคลักษณะใส - : ไม่เกิดการติดเชื้อ

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการติดเชื้อของแอคติโนฟาจ กับแอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้ (ต่อ)

แอคติโนฟาจ	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน																												
	Ac. 23.3	Ac. 23.4	Ac. 23.5	Ac. 23.6	Ac. 23.7	Ac. 24.1	Ac. 24.2	Ac. 24.3	Ac. 24.4	Ac. 24.5	Ac. 24.6	Ac. 24.7	Ac. 24.8	Ac. 25.1	Ac. 25.2	Ac. 25.3	Ac. 25.4	Ac. 25.5	Ac. 25.6	Ac. 26.1	Ac. 26.2	Ac. 26.3	Ac. 26.4	Ac. 26.5	Ac. 26.6	Ac. 27.1	Ac. 27.2	Ac. 27.3	Ac. 27.4	Ac. 27.5
Ap1	-	C	-	-	C	C	-	-	-	-	-	C	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-
Ap6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap7	C	C	-	C	C	-	-	C	-	-	-	-	-	C	C	-	-	C	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-
Ap9	-	C	-	-	C	C	-	-	-	-	-	C	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap10	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	-	C	-	-	C	-	C	-	-	-
Ap11	C	C	-	C	C	C	-	C	-	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	-	-	C	C	-	C	-	-
Ap12	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C	-	-	-	C	C	-	C	-	-	C	-	-	C	-	-
Ap13	C	-	-	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	-	C	-	-	C	C	C	C	C	C
Ap14	C	C	-	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	-	-	-	C	C	C	C	-	-
Ap15	C	C	-	C	-	C	-	C	C	-	C	-	C	-	C	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	C	-	C	-	-
Ap16	-	-	-	C	-	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	-	-	C	-	-	C	-	-	-	C	C	C	-	C	-
Ap17	-	-	-	C	-	C	C	C	C	C	-	C	C	-	C	-	-	-	C	C	-	-	-	-	C	C	C	-	C	-
Ap18	-	C	-	C	C	C	-	C	C	C	-	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C
Ap19	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	-	-	C	C	C	-	C	-	-	C	-	C	-	C	C
Ap20	C	-	C	-	-	-	C	C	C	C	C	-	C	C	C	-	-	C	C	C	-	C	-	C	C	C	C	C	-	-
Ap21	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	C	-	-	-	-	C	-	-	-	C	C	-
Ap22	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-
Ap23	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	C	C	-	C	-	-	C	C	C	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap24	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	-	C	C	C	-	C	-	-	C	-	C	-	C	-
Ap25	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	-	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	C	-
Ap26	-	-	-	C	-	-	C	C	C	C	C	C	-	C	C	-	-	C	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-
Ap30	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C : พลัคลักษณะใส - : ไม่เกิดการติดเชื้อ

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการติดเชื้อของแอคติโนฟาจ กับแอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้ (ต่อ)

แอคติโนฟาจ	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน																									
	Ac. 27.6	Ac. 28.1	Ac. 28.2	Ac. 28.3	Ac. 29.1	Ac. 29.2	Ac. 29.3	Ac. 29.4	Ac. 30.1	Ac. 30.2	Ac. 31.1	Ac. 31.2	Ac. 31.3	Ac. 31.4	Ac. 31.5	Ac. 32.1	Ac. 32.2	Ac. 32.3	Ac. 32.4	Ac. 32.5	Ac. 32.6	Ac. 32.7	Ac. 32.8	Ac. 32.9	Ac.32.10	Ac.32.11	Ac.32.12
Ap1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	C
Ap2	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	C	C	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap4	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap5	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap7	C	C	-	C	C	-	-	C	-	-	-	C	-	-	C	C	C	C	C	-	-	C	-	-	C	-	-
Ap8	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap9	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap10	C	C	C	-	-	-	-	C	C	-	C	C	-	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-
Ap11	C	C	C	-	C	-	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C	-	-	C	C	-	C	C	C	C
Ap12	C	C	C	-	-	-	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C
Ap13	C	C	C	-	C	-	C	C	C	C	C	-	-	-	C	C	C	-	C	C	C	C	-	C	C	C	C
Ap14	C	C	C	-	-	-	C	-	C	C	C	C	-	-	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C
Ap15	C	C	C	-	-	-	C	-	C	-	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C
Ap16	C	C	C	-	C	-	-	C	C	-	C	C	-	-	-	-	C	-	C	C	-	C	-	-	C	C	C
Ap17	C	C	C	-	-	-	-	C	C	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	C	C	C	-	C	C	C	C
Ap18	C	C	C	-	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C
Ap19	C	C	C	C	-	-	C	C	C	C	C	C	-	-	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Ap20	C	C	-	-	C	-	C	-	C	-	-	-	C	-	C	-	C	-	-	-	C	-	C	-	C	C	-
Ap21	-	-	C	-	C	-	-	-	C	-	-	-	C	C	C	-	C	-	-	-	-	-	-	C	C	C	-
Ap22	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap23	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap24	C	C	C	-	-	-	-	C	C	-	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C	C		C	C	-
Ap25	C	C	C	-	C	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	C	C	C	C
Ap26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-
Ap27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap28	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ap30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-

C : พล๊าคลักษณะใส - : ไม่เกิดการติดเชื้อ

4.6 การตรวจสอบการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่ไม่ให้พล๊าคกับแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิด มาตรวจสอบการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ คือ กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* และ *S. aureus* กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *M. luteus*, *P. fluorescens* กลุ่มยีสต์ได้แก่ *C. albicans* และ *S. cerevisiae* และกลุ่มรา *คือ A. niger* ดังแสดงใน ตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ขอบเขตของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส	จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ							
	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ (อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสกับโคโลนี)							
	A. niger	*B. subtilis*	*C. albicans*	*E. coli*	*M. luteus*	*P. fluorescens*	*S. cerevisiae*	*S. aureus*
Ac1.1	-	-	1.3	-	1.6	1.6	1.9	-
Ac2.2	2.4	2.7	4.1	2.1	2.3	1.4	4.5	2.1
Ac25.4	-	2.5	4.2	1.2	2.1	-	-	1.2
Ac26.4	1.8	1.4	1.4	1.2	-	-	1.9	1.2

- : ไม่ยับยั้งการจริญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์

4.7.1 เอนไซม์โปรติโอไลติคและไลโพไลติค

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกมาตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติโอไลติคตามวิธี 3.12.1 และ เอนไซม์ไลโพไลติคตามวิธี 3.12.2 สามารถตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ โดยสังเกตจากการเกิดวงใสรอบโคโลนีของแอคติโนมัยซิทีสสำหรับเอนไซม์โปรติโอไลติคและไลโพไลติค บนอาหารเลี้ยงเชื้อสคิม มิลค์ อการ์ และ ไตรบิวทีริน อการ์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติโอไลติค และ ไลโพไลติค บนอาหารเลี้ยงเชื้อสคิม มิลค์ อการ์ และ ไตรบิวทีริน อการ์ ตามลำดับ

สายพันธุ์ แอคติโนมัยซิทีส	ชนิดเอนไซม์	
	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดกับโคโลนี	
	โปรติโอไลติค	ไลโพไลติค
Ac1.1	3.25	1 (เกิดวงใสใต้โคโลนี)
Ac2.2	2.44	1 (เกิดวงใสใต้โคโลนี)
Ac25.4	2.50	1 (เกิดวงใสใต้โคโลนี)
Ac26.4	1.30	1 (เกิดวงใสใต้โคโลนี)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.2 <u>เลซิติเนส เพคติเนส และ ไคติเนส</u>

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกมาตรวจสอบการสร้างเลซิติเนสตามวิธี 3.12.3 เพคติเนสตามวิธี 3.12.4 และไคติเนส ตามวิธี 3.12.5 สามารถตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ ได้จากการเกิดวงสีเหลืองขุ่นรอบโคโลนีสำหรับเลซิติเนส วงใสรอบโคโลนีของแอคติโนมัยซิทีสสำหรับเพคติเนส และไคติเนส บนอาหารเลี้ยงเชื้อเอค โยค อการ์ เพคติน อการ์ และ คอลลอยดัล ไคติน อการ์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการสร้างเลซิติเนส เพคติเนส และ ไคติเนส บนอาหารเลี้ยงเชื้อเอค โยค อการ์ เพคติน อการ์ และ คอลลอยดัล ไคติน อการ์ ตามลำดับ

สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส	ชนิดเอนไซม์		
	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงที่เกิดกับโคโลนี		
	เลซิติเนส	เพคติเนส	ไคติเนส
Ac1.1	ไม่เกิดวงสีเหลือง	ไม่เกิดวงใส	1.25
Ac2.2	ไม่เกิดวงสีเหลือง	ไม่เกิดวงใส	1.38
Ac25.4	3.33	ไม่เกิดวงใส	ไม่เกิดวงใส
Ac26.4	1.57	ไม่เกิดวงใส	2.50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 การวิเคราะห์หากรด 2,6 ไดอะมิโนพิมีลิค (2,6-diaminopimelic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีสโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

เมื่อนำสารสกัดที่เตรียมด้วยวิธีข้อ 3.13.1 มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีทดลองข้อ 3.13.2 ใช้นินไฮดรินเป็นตัวตรวจสอบ วัดค่า R_f เทียบกับสารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค พบว่าสารสกัดจากแอคติโนมัยซิทีสคัดเลือกทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่า R_f เท่ากับ ค่า R_f ของไอโซเมอร์ชนิด LL ของสารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ รูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.8 ค่า R_f ของสารสกัด และ สารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค

ตัวอย่าง	ค่า R_f
สารสกัดจากแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1	0.34
สารสกัดจากแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2	0.34
สารสกัดจากแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4	0.34
สารสกัดจากแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4	0.34
สารสกัดจาก *Streptomyces coelicolor*	0.34
สารสกัดจาก *Microbispora rosea*	0.29
สารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค (ไอโซเมอร์ชนิด meso)	0.27
สารมาตรฐาน 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค (ไอโซเมอร์ชนิด LL)	0.34

รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมแสดงแถบของสารสกัดด้วยจากวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

4.9 การศึกษาลักษณะของแอคติโนมัยซิทีส

ศึกษาตามวิธีที่รายงานโดย Williams และ คณะ (1983) และ Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4. (Williams *et al*.,1989)

4.9.1 <u>การศึกษาสีของสายใยอาหาร และสปอร์</u>

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 Ac2.2 Ac25.4 และ Ac26.4 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออินออร์แกนิค ซอล์ท สตาร์ช อการ์ ตามวิธี 3.14.1 เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ ให้สีของสายใยอาหาร และสีของสปอร์ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.2-4.5

ตารางที่ 4.9 สีของสายใยอาหาร และสปอร์ของสายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือก

สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส	สีของสายใยอาหาร	สีสปอร์
Ac1.1	เหลือง-น้ำตาล	เทา
Ac2.2	แดง	เทา
Ac25.4	เหลือง-น้ำตาล	เทาอ่อน
Ac26.4	เหลือง-น้ำตาล	เทา-ดำ

<u>4.9.2 การศึกษาลักษณะของสปอร์และสายสปอร์</u>

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือก มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออินออร์แกนิค ซอล์ท สตาร์ช อการ์ จนเจริญสร้างสปอร์โตเต็มที่ ศึกษาลักษณะสปอร์และสายสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านและส่องกราด พบว่าสายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสจะมีลักษณะสปอร์และสายสปอร์แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.6-4.13

ตารางที่ 4.10 ลักษณะรูปร่าง ผิวของสปอร์ และ สายสปอร์ของสายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส

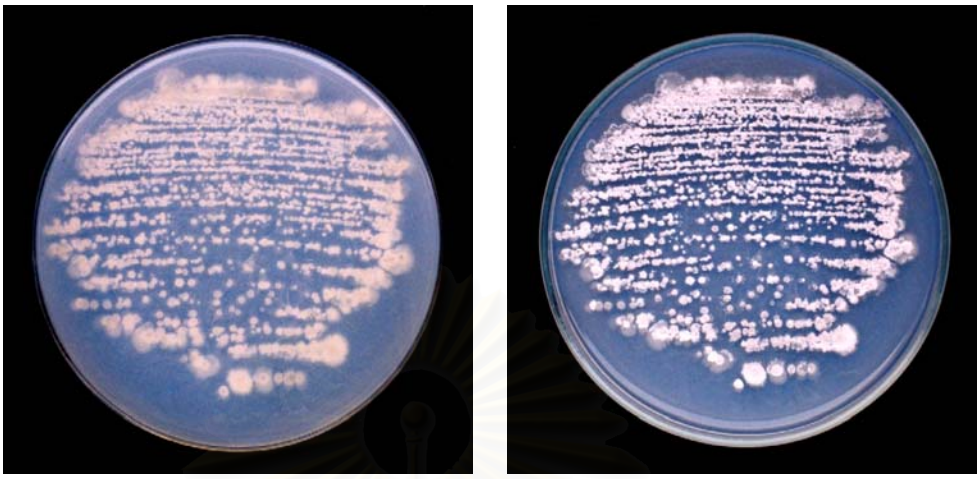
สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส	รูปร่างสปอร์	ลักษณะผิวสปอร์	ลักษณะสายสปอร์
Ac1.1	ทรงกลมรี (oval)	มีขน (hairy)	เส้นตรง
Ac2.2	ทรงรี (oval)	ผิวเรียบ(smooth)	โค้งเป็นลอน
Ac25.4	ทรงรียาว (oval)	ผิวเรียบ(smooth)	โค้งเป็นลอน
Ac26.4	ทรงรี (oval)	ผิวเรียบ(smooth)	โค้งเป็นลอน

(a) (b)

รูปที่ 4.2 สีของสายใยอาหาร (a) และสีสปอร์ (b) ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1

(a) (b)

รูปที่ 4.3 สีของสายใยอาหาร (a) และสีสปอร์ (b) ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2



(a) (b)

รูปที่ 4.4 สีของสายใยอาหาร (a) และสีสปอร์ (b) ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4

(a) (b)

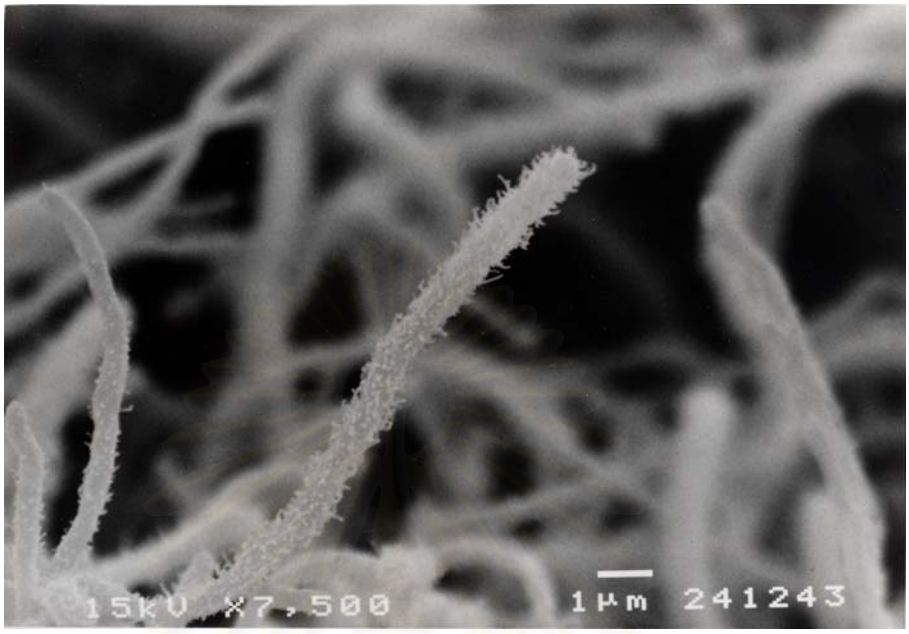
รูปที่ 4.5 สีของสายใยอาหาร (a) และสีสปอร์ (b) ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4

รูปที่ 4.6 ลักษณะรูปร่างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500 เท่า

รูปที่ 4.7 ลักษณะรูปร่างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500 เท่า

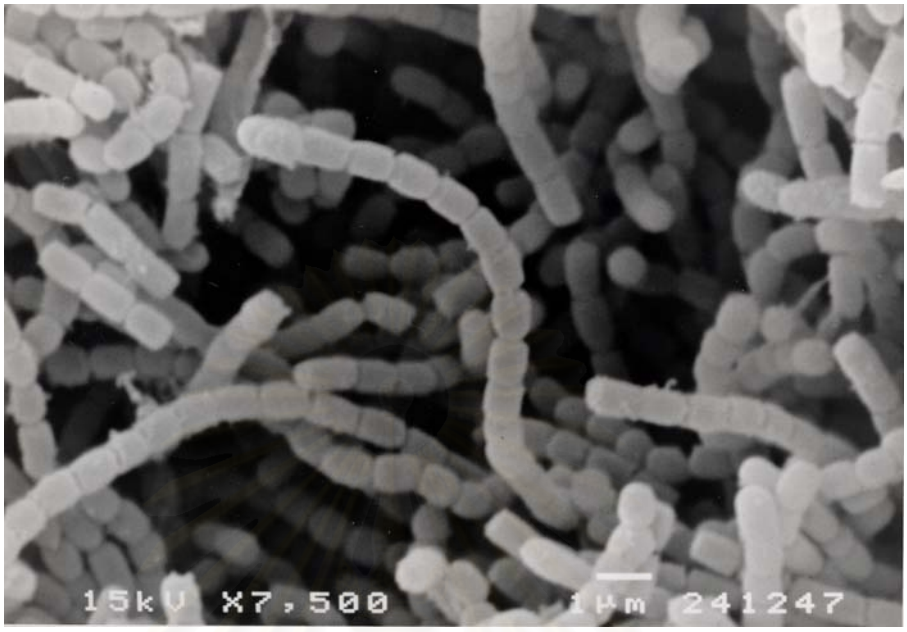
รูปที่ 4.8 ลักษณะรูปร่างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500 เท่า

รูปที่ 4.9 ลักษณะรูปร่างสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 16,500เท่า

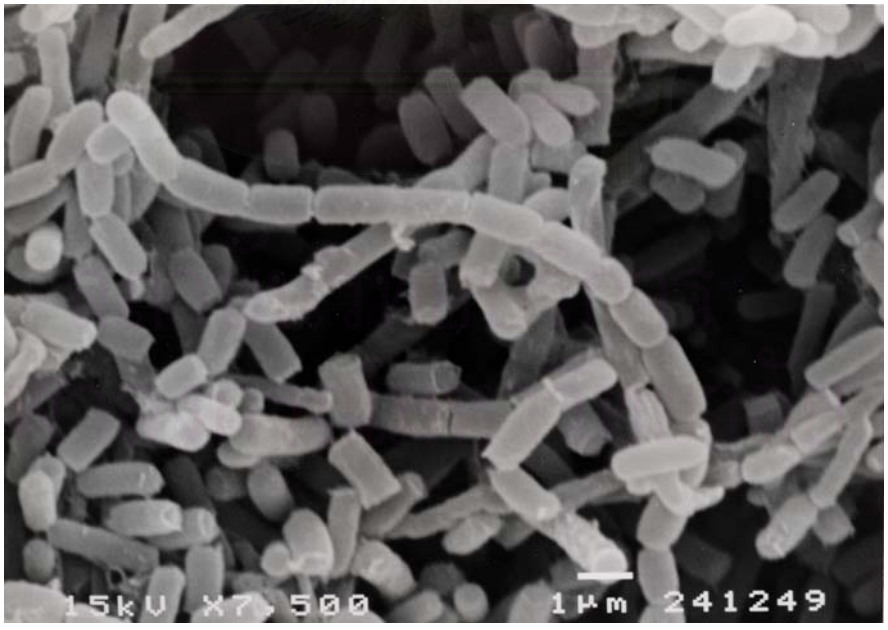


รูปที่ 4.10 ลักษณะสายสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า

รูปที่ 4.11 ลักษณะสายสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า



รูปที่ 4.12 ลักษณะสายสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า



รูปที่ 4.13 ลักษณะสายสปอร์ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 7,500 เท่า

4.9.3 <u>การศึกษาการสร้างรงควัตถุเมลานิน</u>

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซิทีสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียงเปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรก ไอรอน อการ์ และ อาหารวุ้นเอียงไทโรซีน อการ์ สามารถตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมลานินจากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.14-4.15

ตารางที่ 4.11 การสร้างรงควัตถุเมลานินบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นเอียง

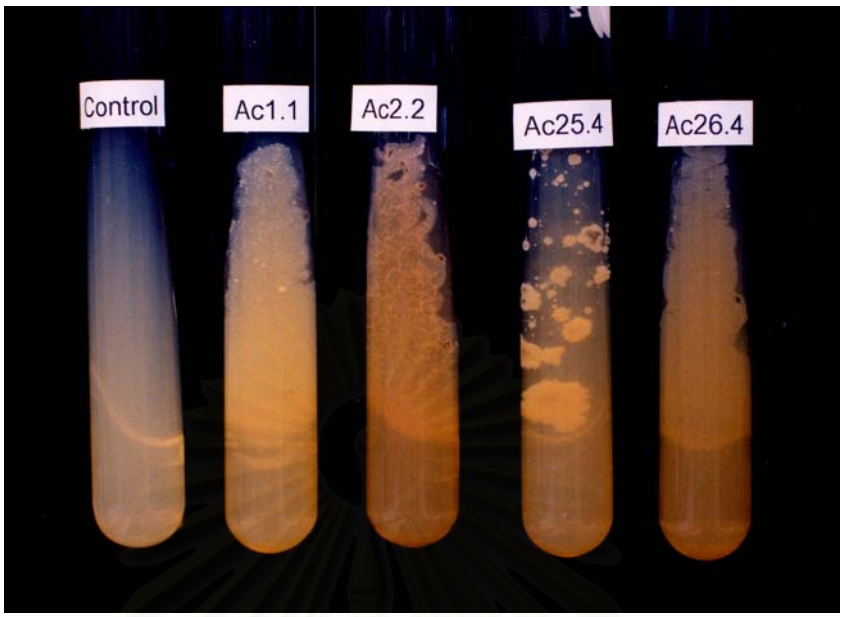
สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส	เปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรก ไอรอน อการ์ (สีเหลือง)	ไทโรซีน อการ์ (สีขาว)
Ac1.1	ไม่เปลี่ยนแปลง	สีน้ำตาลเข้ม
Ac2.2	สีน้ำตาลอ่อน	สีดำ
Ac25.4	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
Ac26.4	สีน้ำตาลอ่อน	ไม่เปลี่ยนแปลง

4.9.4 <u>การศึกษาการสร้างรงควัตถุที่สามารถแพร่กระจายได้</u>

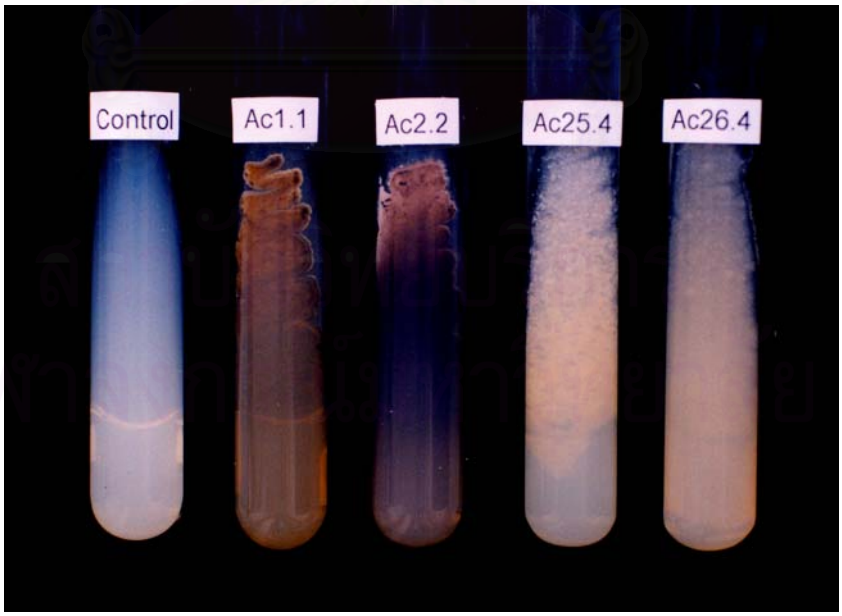
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิทีสลงบนอาหารวุ้นเอียงกลีเซอรอล-แอสปาราจีน อการ์ สามารถตรวจสอบการสร้างรงควัตถุที่สามารถแพร่กระจายได้ โดยดูจากสีที่เกิดขึ้นบนอาหารวุ้นเอียง ดังแสดงในตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.16

ตารางที่ 4.12 การสร้างรงควัตถุที่สามารถแพร่กระจายได้

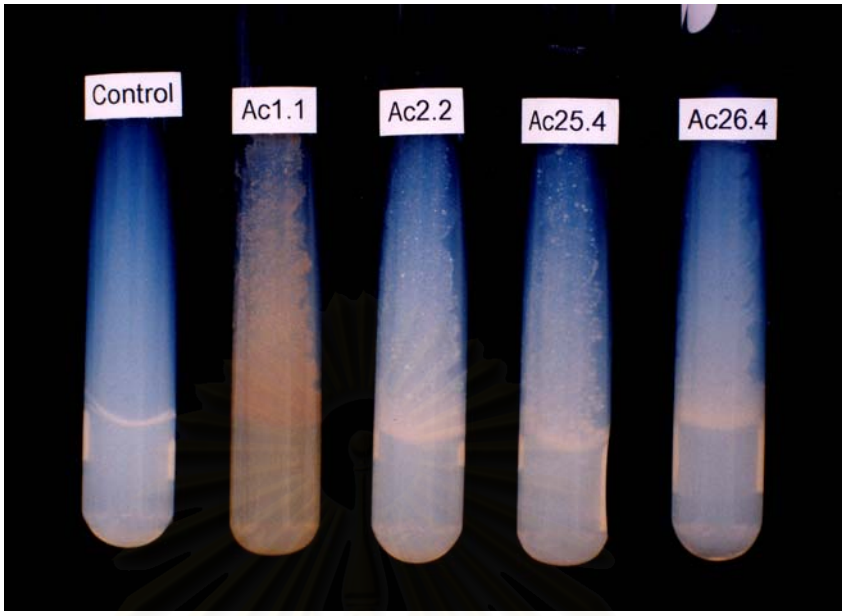
สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส	รงควัตถุที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ
Ac1.1	สีน้ำตาล
Ac2.2	ไม่เปลี่ยนแปลง (สีขาว)
Ac25.4	ไม่เปลี่ยนแปลง (สีขาว)
Ac26.4	ไม่เปลี่ยนแปลง (สีขาว)



รูปที่ 4.14 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรก ไอรอน อการ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.15 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไทโรซีน อการ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.16 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อกลีเซอรอล-แอสปาราจีน อการ์เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9.5 การรีดิวซ์ไนเตรทและการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกมาตรวจสอบรีดิวซ์ไนเตรทและการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ตามวิธี 3.14.6 และ 3.14.7 ผลดังแสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรทและสร้างก๊าซไฮโดรเจน

สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส	การรีดิวซ์ไนเตรท	การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์
Ac1.1	-	+
Ac2.2	+	+
Ac25.4	+	-
Ac26.4	-	-

+ : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

4.9.6 การศึกษาสมบัติของการย่อยสลายสาร

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ ที่เติมสารที่ต้องการตรวจสอบการย่อยสลายแต่ละชนิดลงไป พบว่าแอคติโนมัยซิทีสแต่ละสายพันธุ์มีสมบัติของการย่อยสลายสารแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบ

สารทดสอบ	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส			
	Ac1.1	Ac2.2	Ac25.4	Ac26.4
อะดีนีน (adenine)	+	+	-	-
ไทโรซีน (tyrosine)	-	-	-	-
ไซแลน (xylan)	-	-	+	+
แซนทีน (xanthine)	-	-	-	-
เคซีน (casein)	+	+	+	+
กัวนีน (guanine)	-	-	-	-
เจลาติน (gelatin)	+	+	+	+
แป้ง (starch)	+	+	+	-

+ : สามารถย่อยสลายเกิดวงใส - : ไม่สามารถย่อยสลายได้

4.9.7 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ และตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 4 10 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่ามีบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่ 10 และ 45 ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่แตกต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียสมาก ดังแสดงในตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส			
	Ac1.1	Ac2.2	Ac25.4	Ac26.4
4	-	-	-	-
10	+	+	-	-
37	+	+	+	+
45	+	+	-	+

+ : เจริญ - : ไม่เจริญ

4.9.8 การตรวจสอบการเจริญที่พีเอช เท่ากับ 4.3

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ ที่ปรับพีเอช เท่ากับ 4.3 ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติโนมัยซิทีส พบว่าแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถเจริญที่ภาวะที่พีเอช เท่ากับ 4.3 ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9.9 การตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม ที่เติมสารประกอบไนโตรเจนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม ที่ไม่ได้เติมสาร และ ชุดควบคุมบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อเบซอล มีเดียม ที่ประกอบด้วย เอสปาราจีน หรือ โปรลีน พบว่าแอคติโนมัยซิทีสแต่ละสายพันธุ์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

สารประกอบไนโตรเจน	สายพันธุ์ แอคติโนมัยซิทีส			
	Ac1.1	Ac2.2	Ac25.4	Ac26.4
อาจินีน (L-arginine)	-	-	-	-
ซีสทีอีน (L-cysteine)	+	+	+	+
ฮีสทิดีน (L-histidine)	+	+	+	-
เมทไธโอนีน (L-methionine)	+	-	-	-
โทแทสเซียม ไนเตรท (potassium nitrate)	+	+	+	-
ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine)	+	+	+	-
ซีรีน (L-serine)	+	-	+	-
ทรีโอนีน (L-threonine)	+	+	+	+
วาลีน (L-valine)	+	-	-	-

+ : เจริญมากกว่าชุดควบคุมหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุม

4.9.10 การตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน

จากการนำแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิไลเซชั่น อการ์ ที่เติมสารประกอบคาร์บอนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิไลเซชั่น อการ์ ที่ไม่ได้เติมสาร และ ชุดควบคุมบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อคาร์บอน ยูทิไลเซชั่น อการ์ ที่ประกอบด้วยกลูโคส พบว่าแอคติโนมัยซิทีสแต่ละสายพันธุ์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

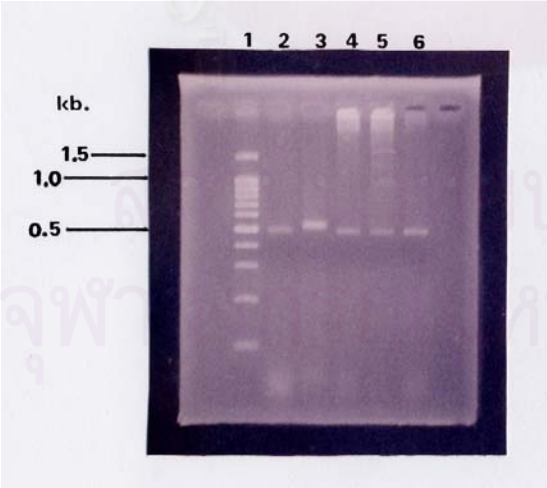
สารประกอบคาร์บอน	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส			
	Ac1.1	Ac2.2	Ac25.4	Ac26.4
อะราบิโนส (L-arabinose)	+	+	+	-
เซลโลไบโอส (cellobiose)	+	+	-	+
เดกซ์แทรน (dextran)	+	+	+	+
ฟรุคโตส (D-fructose)	+	-	-	-
กาแลคโตส (D-galactose)	+	+	-	-
มีโซ-อินโนสิทอล (meso –inositol)	+	+	-	-
แลคโตส (D-lactose)	+	+	-	-
แมนนิทอล (D-mannitol)	-	+	-	-
แมนโนส (D-mannose)	+	+	+	+
ราฟฟิโนส (raffinose)	+	+	-	-
แรมโนส (L-rhamnose)	+	+	-	-
ซาลิซิน (salicin)	-	-	-	-
ซูโครส (sucrose)	+	+	+	-
ตรีฮาโลส (trehalose)	+	+	+	-
ไซลิทอล (xylitol)	+	-	-	-
ไซโลส (xylose)	-	-	-	-
โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)	+	+	-	-
โซเดียมซิเตรท (sodium citrate)	+	+	-	+
โซเดียมมาโลเนท (sodium malonate)	+	-	-	+
โซเดียมโพรพิโอเนท (sodium propionate)	+	+	-	-
โซเดียมไพรูเวท (sodium pyruvate)	-	+	+	-

+ : เจริญมากกว่าชุดควบคุมหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุม

4.10 การตรวจสอบลำดับกรดนิวคลีอิคของ 16S rRNA

จากการจำแนกสกุลของแอคติโนมัยซิทีสคัดเลือกทางอนุกรมวิธานเบื้องต้น ตามหลักการจำแนกอ้างอิงตาม Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4. (Williams *et al*.,1989) พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ จัดอยู่ในสกุลของสเตรปโตมัยซิทีส แต่ผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซิทีสที่แน่ชัดได้ เพื่อจำแนกชนิดของสเตรปโตมัยซิทีสอย่างชัดเจนได้ทำการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของสเตรปโตมัยซิทีส แต่เนื่องจากสเตรปโตมัยซิทีสชนิดต่างๆ จะมีส่วนลำดับเบสอนุรักษ์อยู่มาก (conserved sequence) ดังนั้นจึงต้องออกแบบไพร์เมอร์ โดยครอบคลุมช่วงที่มีความแตกต่างกันมากสูงสุด (hypervariable region) ของลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของสเตรปโตมัยซิทีส ดังนั้นจึงออกแบบไพร์เมอร์อ้างอิงข้อมูลตาม Kataoka และคณะ (1997) จากการสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอตามวิธีของ Ausubel และคณะ สามารถสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 Ac2.2 Ac25.4 และ 26.4 เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA และจากข้อมูลของ Kataoka และคณะ (1997) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมีขนาดประมาณ 500 เบส เมื่อนำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกมาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามวิธีข้อ 3.16 โดยเปรียบเทียบกับชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสแพร์ ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ + 1.5 กิโลเบสแพร์ พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียง 500 เบส กับชุดควบคุมบวกคือโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *S. coelicolor* ดังแสดงในรูปที่ 4.17



แถบที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 เบสแพร์ ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ + 1.5 กิโลเบสแพร์
แถบที่ 2 *Streptomyces coelicolor*
แถบที่ 3 แอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1
แถบที่ 4 แอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2
แถบที่ 5 แอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4
แถบที่ 6 แอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4

รูปที่ 4.17 ชิ้นดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 Ac2.2 Ac25.4 Ac26.4 และ *S. coelicolor* เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน100 เบสแพร์ ดีเอ็นเอ แลดเดอร์ + 1.5 กิโลเบสแพร์

จากผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 2.2 25.4 และ 26.4 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Dnasis สามารถแสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 Ac2.2 Ac25.4 และ Ac26.4 ในรูปที่ 4.18 – 4.21 ตามลำดับ

```
            10         20         30         40         50
5' GGCGGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAGC GAACTGATTA GAAGCTTGCT
            60         70         80         90        100
   TCTATGACGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGC AACCTGCCTG
           110        120        130        140        150
   TAAGACTGGG ATAACTTCGG GAAACCGAAG CTAATACCGG ATAGGATCTT
           160        170        180        190        200
   CTCCTTCATG GGAGATGATT GAAAGATGGT TTCGGCTATC ACTTACAGAT
           210        220        230        240        250
   GGGCCCGCGG TGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAACGGCTC ACCAAGGCAA
           260        270        280        290        300
   CGATGCATAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG GACTGAGACA
           310        320        330        340        350
   CGGCCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGGAATCTTC CGCAATGGAC
           360        370        380        390        400
   GAAAGTCTGA CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGCT TTCGGGTCGT
           410        420        430        440        450
   AAAACTCTGT TGTTAGGGAA GAACAAGTAC AAGAGTAACT GCTTGTACCT
           460
   TGACGGTACC 3'
```

รูปที่ 4.18 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1

```
            10         20         30         40         50
5' GGACGAACGC TGGCGGCGTG CTTAACACAT GCAAGTCGAA CGATGAAGCC
            60         70         80         90        100
   CTTCGGGGTG GATTAGTGGC GAACGGGTGA GTAACACGTG GGCAATCTGC
           110        120        130        140        150
   CCTTCACTCT GGGACAAGCC CTGGAAACGG GGTCTAATAC CGGATACGAC
           160        170        180        190        200
   CTGCCGAGGC ATCTCGGCGG GTGGAAAGCT CCGGCGGTGA AGGATGAGCC
           210        220        230        240        250
   CGCGGCCTAT CAGCTTGTTG GTGGGGTAAT GGCCTACCAA GGCGACGACG
           260        270        280        290        300
   GGTAGCCGGC CTGAGAGGGC GACCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC
           310        320        330        340        350
   CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGCAAG
           360        370        380        390        400
   CCTGATGCAG CGACGCCGCG TGAGGGATGA CGGCCTTCGG GTTGTAAACC
           410        420        430
   TCTTTCAGCA NGGAAGAAGC GCAAGTGACG GTACC 3'
```

รูปที่ 4.19 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2

```
           10         20         30         40         50
5' GGCGGCGTGC TTAACATGCA AGTCGAACGG TGAAGCCCTT CGGGGTGGAT
           60         70         80         90        100
   CAGTGGCGAA CGGGTGAGTA ACACGTGGGC AATCTGCCCT GCACTCTGGG
          110        120        130        140        150
   ACAAGCCCTG GAAACGGGGT CTAATACCGG ATACGACCTT CCTCCGCATG
          160        170        180        190        200
   GGGGTTGGTG GAAAGCTCCG GCGGTGCAGG ATGAGCCCGC GGCCTATCAG
          210        220        230        240        250
   CTTGTTGGTG GGGTAATGGC CTACCAAGGC GACGACGGGT AGCCGGCCTG
          260        270        280        290        300
   AGAGGGCGAC CGGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG
          310        320        330        340        350
   GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGCACAATGG GCGAAAGCCT GATGCAGCGA
          360        370        380        390        400
   CGCCGCGTGA GGGATGACGG CCTTCGGGTT GTAAACCTCT TTCAGCAGGG
          410        420        430
   AAGAAGCGCA AGTGACGGTA CCTGCAAAAG AANC 3'
```

รูปที่ 4.20 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4

```
           10         20         30         40         50
5' AGGACGAACG CTGGCGGCGT GCTTAACACA TGCAAGTCGA ACGGTGAAGC
           60         70         80         90        100
   CCTTCGGGGT GGATCAGTGG CGAACGGGTG AGTAACACGT GGGCAATCTG
          110        120        130        140        150
   CCCTGCACTC TGGGACAAGC CCTGGAAACG GGGTCTAATA CCGGATACGA
          160        170        180        190        200
   CCTGCCTCCG CATGGGGGTG GGTGGAAAGC TCCGGCGGTG CAGGATGAGC
          210        220        230        240        250
   CCGCGGCCTA TCAGCTTGTT GGTGGGGTAA TGGCCTACCA AGGCGACGAC
          260        270        280        290        300
   GGGTAGCCGG CCTGAGAGGG CGACCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC
          310        320        330        340        350
   CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGGGCGAAA
          360        370        380        390        400
   GCCTGATGCA GCGACGCCGC GTGAGGGATG ACGGCCTTCG GGTTGTAAAC
          410        420
   CTCTTTCAGC ATGNAAGAAG CCCAA 3'
```

รูปที่ 4.21 ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4

หลังจากนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอคติโนมัยซิทีสทั้ง 4 สายพันธุ์ มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของสเตรปโตมัยซิทีสชนิดต่างๆ ที่มีบันทึกและรวบรวมไว้ด้วยโปรแกรม Blast พบว่า

- ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *S. maritimus* โดยมีความเหมือน (%identity) เท่ากับ 89 เปอร์เซ็นต์

- ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *S. lipmanii* โดยมีความเหมือน (%identity) เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์

- ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *S. aureofaciens* โดยมีความเหมือน (%identity) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

- ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *S. venezuelae* โดยมีความเหมือน (%identity) เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

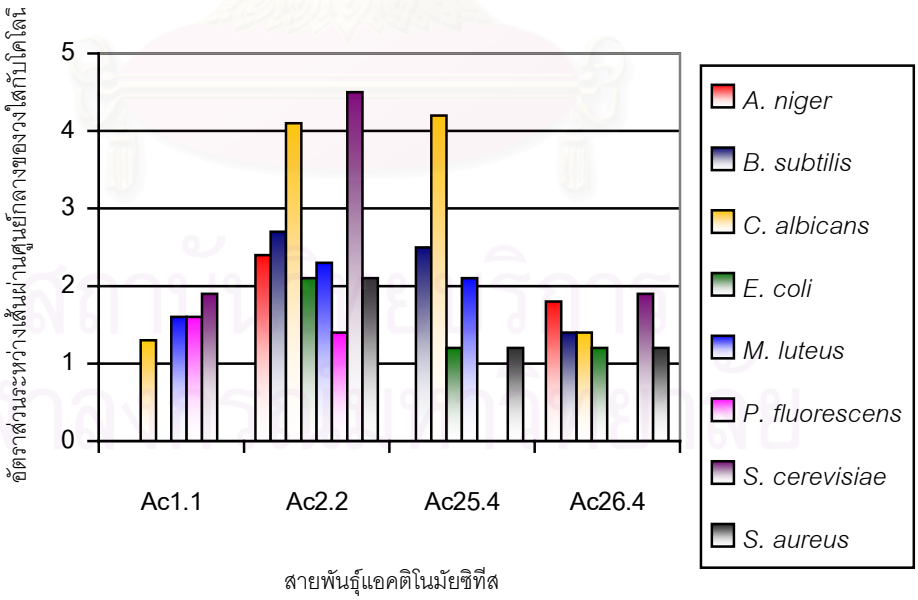
งานวิจัยนี้มีจุดหมายที่จะคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่สามารถต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจ เพื่อนำมาศึกษาสมบัติในการสร้างสารทุติยภูมิ พร้อมทั้งจัดจำแนกกลุ่มและชนิดของแอคติโนมัยซิทีส โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

จากการแยกแอคติโนมัยซิทีสจากตัวอย่างดินจำนวน 32 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในประเทศ สามารถแยกแอคติโนมัยซิทีสได้ 117 สายพันธุ์ โดยในงานวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อฮิวมิค แอซิด วิตามิน อการ์ ซึ่ง Hayakawa และ Nonomura (1987) พัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็นอาหารที่คัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซิทีสโดยเฉพาะ โดยมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ ฮิวมิค แอซิด ซึ่งเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามินบี และ ไซโคลเฮกซิมีดที่ช่วยยับยั้งการเจริญของรา โดยทั่วไปโคโลนีขนาดเล็กหรือการเจริญของสายใย จะปรากฏให้เห็นเมื่อถูกบ่มเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแมนนิทอล มังบีน อการ์ เพื่อเก็บรักษาในรูปสปอร์แขวนลอยที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ตามรายงานของ Wellington และ William ในปี 1979 อ้างอิงถึงโดย Labeda และ Shearer (1990) ได้เสนอวิธีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแอคติโนมัยซิทีสเพื่อนำมาใช้ ซึ่งจะช่วยให้แอคติโนมัยซิทีสคงคุณสมบัติเดิมได้ยาวนานเป็นเวลา1-3 ปี โดยเก็บในรูปสารละลายสปอร์แขวนลอยใน 20 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

จากการรายงานของ Chater และ Carter (1979) Kuhn และ คณะ (1987) Diaz และคณะ(1989) พบว่าโฮสท์-เรนจ์ของแอคติโนฟาจ สามารถนำมาใช้จัดจำแนกชนิดของแอคติโนฟาจได้ โดยแอคติโนฟาจแต่ละชนิดจะก่อให้เกิดการติดเชื้อกับแอคติโนมัยซิทีสได้ไม่เหมือนกัน จากรายงานดังกล่าวเมื่อตรวจสอบแอคติโนฟาจที่ทำการศึกษาทั้ง 30 ชนิด ได้แก่ Ap1 ถึง Ap30 กับแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 32 สายพันธุ์ตามวิธี 3.8 แล้วพบว่าแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิด ให้พล๊าคกับแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิงไม่เหมือนกัน จึงกล่าวได้ว่าแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิดน่าจะเป็นแอคติโนฟาจที่ต่างชนิดกันซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Anne และคณะ (1984) เมื่อนำแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิดมาทดสอบการติดเชื้อในแอคติโนมัยซิทีสเพื่อคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น (Dowding *et al*., 1973) ตามวิธี 3.9 โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่เกิดพล๊าคกับแอคติโนฟาจที่นำมาทดสอบทั้ง 30 ชนิด พบว่าแอคติโนมัยซิทีส 4 สายพันธุ์ได้แก่ Ac1.1 Ac2.2 Ac25.4 และ Ac26.4 มีสมบัติต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจโดยไม่เกิดพล๊าคกับแอคติโนฟาจทั้ง 30 ชนิด หรืออาจกล่าวได้ว่าแอคติโนมัยซิทีสทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีความจำเพาะต่อแอคติโนฟาจเลย ซึ่งทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับความจำเพาะของฟาจต่อบริเวณที่

เกาะติดบนเซลล์แอคติโนมัยซิทีส หรือ เกิดจาก host controlled restriction and modification system ซึ่งเป็นระบบป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเซลล์ของโฮสท์เอง (Diaz *et al*., 1989) ดังมีรายงาน *S. erythreus* ที่สามารถต้านการติดเชื้อของแอคติโนฟาจ G3 และ G4 (Donadio *et al*., 1986)

เมื่อนำแอคติโนมัยซิทีสทั้ง 4 สายพันธุ์มาศึกษาสมบัติเบื้องต้น เช่นการตรวจสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยดูจากวงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ เปรียบเทียบการสร้างสารปฏิชีวนะจากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดกับโคโลนี งานวิจัยนี้เลือกจุลินทรีย์ทดสอบ 8 ชนิด ซึ่งครอบคลุม แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา และ ยีสต์ จากตารางที่ 4.5 และรูปที่ 5.1 พบว่าสายพันธุ์ Ac2.2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. niger*, *B. subtilis*, *E. coli*, *M. luteus*, *S. cerevisiae* และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด สายพันธุ์ Ac25.4 สามารถยับยั้งการเจริญ *C. albicans* ได้ดีที่สุด และ สายพันธุ์ Ac1.1 สามารถยับยั้ง *P. fluorescens* ได้ดีที่สุด จากผลการตรวจสอบดังกล่าว แอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2 เป็นสายพันธุ์ที่น่าศึกษาต่อไป เนื่องจากสายพันธุ์ Ac2.2 สร้างสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติเป็นบอรดเสปกตรัม (broad-spectrum) ที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ครอบคลุมทั้งจุลินทรีย์แกรมบวก แกรมลบ รา และ ยีสต์ ดังที่มีผู้ให้คำจำกัดความไว้ (Miller and Litsky,1976)

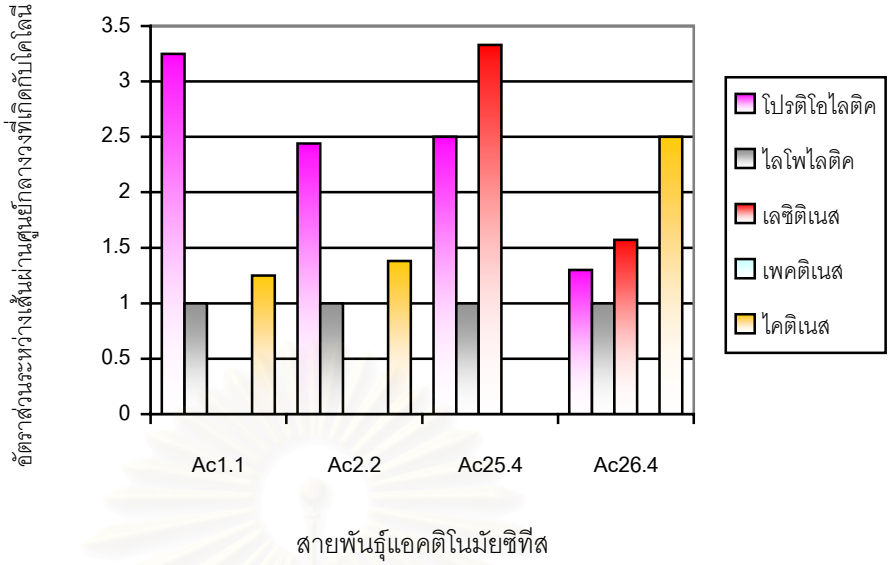


รูปที่ 5.1 แผนภูมิแสดงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

จากการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เบื้องต้น เช่น เอนไซม์โปรติโอไลติคซึ่งใช้ในอุตสาหกรรม การทำซอสปรุงรสเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนจากถั่วเหลือง (Miller and Litsky,1976) อุตสาหกรรมการทำเต้าหู้ ไวน์ เบียร์ และ ผงชักฟอก เป็นต้น (Pelczar *et al*., 1993) เอนไซม์โปรติโอไลติคจะตัดโมเลกุลของโปรตีนให้ได้หน่วยที่เล็กลง สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยสังเกตการสลายโมเลกุลของเคซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อสคิม มิลค์ อการ์ ซึ่งเป็นโปรตีนในนมจนเห็นเป็นลักษณะใส พบว่าสายพันธุ์ Ac1.1สามารถให้วงใสกว้างที่สุด โดยอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสกับโคโลนีเท่ากับ 3.25

การตรวจสอบเอนไซม์ไลโพไลติค ซึ่งเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายไขมันให้ได้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (Tanigaki *et al*., 1995) ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมัน เนยแข็ง และ ผงซักฟอก เป็นต้น ตรวจสอบปฏิกิริยาโดยสังเกตการสลายโมเลกุลของไตรบิวทิรินในอาหารเลี้ยงเชื้อไตรบิวทิริน อการ์ เกิดเป็นวงใสขึ้น พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถสลายโมเลกุลของไตรบิวทิรินได้เพียงบริเวณใต้โคโลนีเท่านั้น สำหรับการตรวจสอบการสร้างเลซิติเนส ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมทำแยม และ เยลลี่ โดยเลซิติเนสจะเร่งปฏิกิริยาสลายโมเลกุลของเลซิตินได้เป็นน้ำตาล สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาโดยสังเกตการสลายเลซิตินในอาหารเลี้ยงเชื้อเอค โยค อการ์ ซึ่งเป็นโพลีแซกคาไรด์ในไข่แดงเกิดเป็นลักษณะของวงสีเหลืองขุ่น โดยลักษณะขุ่นเกิดจากไดกลีเซอไรด์ที่เกิดขึ้นหลังปฏิกิริยา พบว่าสายพันธุ์ Ac25.4 สามารถให้วงสีเหลือง ขุ่น กว้างที่สุด อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงที่เกิดกับโคโลนีเท่ากับ 3.33 แต่ไม่พบการสร้างเลซิติเนสในสายพันธุ์ Ac1.1 และ Ac2.2

การตรวจสอบการสร้างเพคติเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาสลายเพคตินซึ่งใช้ในอุตสาหกรรม น้ำผลไม้ เส้นใยธรรมชาติ เป็นต้น (Pelczar *et al*., 1993) สังเกตได้จากวงใสจากการสลายเพคติน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพคติน อการ์ ไม่พบการสร้างเพคติเนสในทั้ง 4 สายพันธุ์ แต่พบการสร้างไคติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาสลายไคตินในทุกสายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์ Ac25.4 ในการตรวจสอบการสร้างไคตินเนส โดยดูจากอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดจากการสลายโมเลกุลไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อคอลลอยดัล ไคติน อการ์ กับโคโลนีพบว่ามีมากที่สุดในสายพันธุ์ Ac26.4 จากการตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าบางสายพันธุ์เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาการสร้างเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 แผนภูมิเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ

การวิเคราะห์หา 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิคของแอคติโนมัยซิทีสซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ได้เลือกใช้วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีตามวิธีของ Staneck และ Roberts (1974) เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก และ สะดวก พบว่า ค่า R_f ของสารสกัดของทั้ง 4 สายพันธุ์ มีค่า R_f เท่ากับค่า R_f ของไอโซเมอร์ชนิด LL ของ 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค แสดงว่าทั้ง 4 สายพันธุ์มีองค์ประกอบของผนังเซลล์เป็น 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิค ไอโซเมอร์ชนิด LL ซึ่งจัดอยู่ในผนังเซลล์แบบที่ ๊ ตามการแบ่งของ Williams และคณะในปี 1989 (ดังแสดงในตารางที่ 5.1) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Yamaguchi (1964) Staneck และ Roberts (1974) Hasegawa และ คณะ (1983) ที่สามารถตรวจพบไอโซเมอร์ชนิด LL ของ 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิคได้ในแอคติโนมัยซิทีสกลุ่ม *Streptomyces*

ตารางที่ 5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดผนังเซลล์และน้ำตาลภายในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีส (Williams *et al.*, 1989)

ชนิดผนังเซลล์	รูปแบบของกรดอะมิโนและน้ำตาล
I	กรดไดอะมิโนพิมีลิคชนิด LL ไกลซีน
II	กรดไดอะมิโนพิมีลิคชนิด meso* ไกลซีน
III	กรดไดอะมิโนพิมีลิคชนิด meso ไม่พบไกลซีน
IV	กรดไดอะมิโนพิมีลิคชนิด meso อะราบิโนส กาแลคโตส ไม่พบไกลซีน

* อาจพบในรูปของกรด 3 ไฮดรอซี อะมิโนพิมีลิค

ในการจัดจำแนกแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจที่คัดเลือกได้คือ สายพันธุ์ Ac1.1 Ac2.2 Ac25.4 และ Ac26.4 ศึกษาตามวิธีของ Williams และ คณะ (1983) และ Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4. (Williams *et al*.,1989) โดยศึกษาสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของทั้ง 4 สายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 5.2 และข้อมูลการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากตารางที่ 4.17 และ 4.18 พบว่าแอคติโนมัยซิทีสทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการสร้างสปอร์เรียงต่อกันเป็นสายยาว โค้งเป็นลอน ยกเว้นสายพันธุ์ Ac1.1 ที่มีสายสปอร์ยาวตรง ลักษณะสายสปอร์ที่เกิดจากการเรียงต่อกันเป็นสายนี้สอดคล้องกับรายงานของ Pridham และคณะ (1958) ที่รายงานถึงลักษณะของสายสปอร์ของ *Streptomyces* ที่มีลักษณะเป็นสายยาวเกิดจากการเรียงตัวของสปอร์ ลักษณะที่ผิวของสปอร์มีผิวเรียบ ยกเว้นสายพันธุ์ Ac1.1 ที่มีขนปกคลุมทั่วสปอร์ ซึ่งเป็นลักษณะที่มีรายงานโดย Tresner และคณะ (1961) ว่าลักษณะผิวของสปอร์ *Streptomyces* มีได้ 5 แบบ คือ ผิวเรียบ ขรุขระ มีหนาม มีขน และ มีปุ่ม

เมื่อสังเกตสีของสปอร์พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์มีสปอร์สีเทาเหมือนกัน ซึ่งสีเทาเป็นสีที่พบได้มากใน *Streptomyces* (Williams *et al*.,1989) พบสายใยอาหารเป็นสีเหลือง-น้ำตาลทั้ง 4 สายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ Ac2.2 ที่มีสีแดง สายพันธุ์ Ac1.1 และ Ac 2.2 สามารถสร้างรงควัตถุเมลานินและก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ สายพันธุ์ Ac1.1 สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลบนอาหารเลี้ยงเชื้อกลีเซอรอล-แอสปาราจีน อการ์ สายพันธุ์ Ac2.2 และ Ac25.4 สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ เมื่อทดสอบคุณสมบัติการย่อยสลายพบว่าแต่ละสายพันธุ์สามารถย่อยสลายสารได้แตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 5.2) พบว่าสายพันธุ์ Ac1.1 Ac2.2 และ Ac26.4 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเท่ากับ 4.3 พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ นอกจากข้อมูลในตารางที่ 5.2 แล้ว การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนดังแสดงในตารางที่ 4.17 และ 4.18 ก็แสดงให้เห็นถึงสมบัติต่างๆของสายพันธุ์ที่คัดเลือกมา โดยข้อมูลดังกล่าวสามารถในไปใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปได้ สำหรับการจัดจำแนกแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ อาศัยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาตามวิธีของ Williams และ คณะ (1983) และ Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4. (Williams *et al*.,1989) ดังที่กล่าวมาข้างต้น สามารถจัดกลุ่มแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกได้โดยทั้ง 4 สายพันธุ์จัดอยู่ใน สกุล *Streptomyces* แต่ข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอที่จะจำแนกชนิดของ *Streptomyces* ได้ จึงต้องอาศัยความรู้ทางพันธุศาสตร์ โดยการหาลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA เพื่อจำแนกชนิดของ *Streptomyces* ต่อไป

ตารางที่ 5.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ความสามารถของการเจริญที่อุณหภูมิและพีเอช ของสายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกได้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส			
	Ac1.1	Ac2.2	Ac25.4	Ac26.4
สีของสายใยอาหาร	เหลือง-น้ำตาล	แดง	เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล
สีสปอร์	เทา	เทา	เทาอ่อน	เทา-ดำ
รูปร่างสปอร์	ทรงกลมรี	ทรงรี	ทรงรียาว	ทรงรี
ลักษณะผิวสปอร์	มีขน	ผิวเรียบ	ผิวเรียบ	ผิวเรียบ
ลักษณะสายสปอร์	เส้นตรง	โค้งเป็นลอน	โค้งเป็นลอน	โค้งเป็นลอน
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	สร้าง	สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
การสร้างรงควัตถุ	สร้าง(สีน้ำตาล)	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
การรีดิวซ์ไนเตรท	-	+	+	-
การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	+	+	-	-
<u>การย่อยสลาย</u>				
อะดีนีน	+	+	-	-
ไทโรซีน	-	-	-	-
ไซแลน	-	-	+	+
แซนทีน	-	-	-	-
เคซีน	+	+	+	+
กัวนีน	-	-	-	-
เจลาติน	+	+	+	+
แป้ง	+	+	+	-
<u>การเจริญที่อุณหภูมิ</u> (องศาเซลเซียส)				
4	-	-	-	-
10	+	+	-	-
37	+	+	+	+
45	+	+	-	+
การเจริญที่พีเอชเท่ากับ 4.3	+	+	+	+

+ : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

การหาลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA สามารถสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นที่สกัดแยกจากแอคติโนมัยซิทีสตามวิธีของ Ausubel และคณะในปี 1994 อ้างถึงโดย Kieser และคณะ (2000) เมื่อตรวจสอบโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิส สามารถเห็นแถบของโครโมโซมอลดีเอ็นเอของทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยโครโมโซมอลดีเอ็นที่สกัดแยกจะถูกใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป จากงานวิจัยของ Kataoka และคณะ (1997) และ Ueda และคณะ (1999) รายงานถึงการจำแนกชนิดของ *Streptomyces* โดยอาศัยลำดับเบสส่วนหนึ่งของ 16S rRNA ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วกว่าวิธีเดิมซึ่งต้องใช้ลำดับเบสทั้งหมดของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ในการจัดจำแนกชนิดของ *Streptomyces* (Mehling *et al*., 1995) งานวิจัยนี้จึงออกแบบไพร์เมอร์โดยอ้างอิงข้อมูลจาก Kataoka และคณะ (1997) ได้ไพร์เมอร์ 2 ตัวเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสคือ

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

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

โดยลำดับเบสของไพร์เมอร์คู่นี้ได้จากลำดับอนุรักษ์ (conserved region) ที่ตำแหน่งที่ 1-20 สำหรับ forward primer (WAT1) และ ตำแหน่งที่ 481 – 500 สำหรับ reverse primer (WAT2) ซึ่งไพร์เมอร์ดังกล่าวจะครอบคลุมช่วงของลำดับเบสประมาณ120 เบส ตรงตำแหน่งที่ 158 - 277 ของช่วงที่มีความแตกต่างกันมากสูงสุด (hypervariable region) ของลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของสเตรปโตมัยซิทีส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้จะมีขนาดประมาณ 500 เบส พบว่าภายหลังปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของทั้ง 4 สายพันธุ์มีขนาดประมาณ 500 เบส สอดคล้องกับรายงานของ Kataoka และคณะ (1997) และ Ueda และคณะ (1999) เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA แล้ว นำมาวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม Dnasis เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน โดยการใช้ข้อมูลจากไพร์เมอร์ 2 ตัวต่อ 1 ชิ้นส่วนยีน (ภาคผนวก ง รูปที่ 1-4) เมื่อได้ข้อมูลลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ถูกต้องแล้ว นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า

- ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces maritimus* โดยมีความเหมือน (%identity) เท่ากับ 89 เปอร์เซ็นต์
- ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces lipmanii* โดยมีความเหมือน (%identity) เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์
- ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac25.4 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces aureofaciens* โดยมีความเหมือน (%identity) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

- ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac26.4 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces venezuelae* โดยมีความเหมือน (%identity) เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2, Ac25.4 และ Ac26.4 กับรายละเอียดของเชื้อที่ปรากฏใน Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4. พบว่าแอคติโนมัยซิทีสที่คัดเลือกได้มีลักษณะใกล้เคียงกับ *S. lipmanii, S. aureofaciens* และ *S. venezuelae* ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac2.2, Ac25.4 และ Ac26.4 เปรียบเทียบกับ *S. lipmanii, S. aureofaciens* และ *S. venezuelae* ตามลำดับ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา	สายพันธุ์แอคติโนมัยซิทีส					
	Ac2.2	*S. lipmanii*	Ac25.4	*S. aureofaciens*	Ac26.4	*S. venezuelae*
สีของสายใยอาหาร	แดง	น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล	เหลือง-น้ำตาล
สีสปอร์	เทา	ขาว	เทาอ่อน	เทา	เทา-ดำ	เทา
รูปร่างสปอร์	ทรงรี	ทรงรี	ทรงรียาว	ทรงรี	ทรงรี	ทรงรี
ลักษณะผิวสปอร์	ผิวเรียบ	ผิวเรียบ	ผิวเรียบ	ผิวเรียบ	ผิวเรียบ	ผิวเรียบ
ลักษณะสายสปอร์	โค้งเป็นลอน	โค้งเป็นลอน	โค้งเป็นลอน	โค้งเป็นลอน	โค้งเป็นลอน	โค้งเป็นลอน
การสร้างรงควัตถุเมลานิน	สร้าง	สร้างในบางสายพันธุ์	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	สร้างในบางสายพันธุ์
การสร้างรงควัตถุ	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
การรีดิวซ์ไนเตรท	+	+	+	พบในบางสายพันธุ์	-	-
การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์	+	+	_	พบในบางสายพันธุ์	_	-

+ : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

เนื่องจาก *S. maritimus* เป็น *Streptomyces* ที่เพิ่งถูกค้นพบและจัดจำแนกชนิดได้โดยข้อมูลลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดย Barnan และคณะ (in progress) ทำให้ไม่มีรายละเอียดทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาปรากฏใน Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 4. เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ Ac1.1

มีรายงานทางอุตสาหกรรมถึงการใช้ *S. lipmanii* ผลิตไอโซเพนนิซิลิน เอน ซินเทส (isopenicillin N synthase) ซึ่งมีความสำคัญในการสร้างไอโซเพนนิซิลิน เอน (isopenicillin N) ซึ่งเป็นโครงสร้างในเพนนิซิลิน (penicillin) และ ซีฟาโรสปอริน (cephalosporin) (Loke *et al*.,2000) *S. maritimus* ผลิตสารปฏิชีวนะประเภทโพลีคีไทด์ (polyketide) เช่น เอนเทอโรซิน (enterocins) *S. aureofaciens* ผลิตสารปฏิชีวนะคลอเตตราไซคลีน (chlortetracycline) *S. venezuelae* ผลิตสารปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล (chloramphenicol) และ สเตรปโตทริซิน (streptothricin) (Kieser *et al*., 2000) และมีรายงานกล่าวถึงแอคติโนมัยซิทีสสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเกิดการติดเชื้อและถูกทำลายโดยแอคติโนฟาจ ก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากในอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่น Anne และคณะ (1984) รายงานว่า *S. lipmanii*, *S. aureofaciens* และ *S. venezuelae* เกิดการติดเชื้อและถูกทำลายได้โดยแอคติโนฟาจ CWK, P23 และ VP1 ตามลำดับ ดังนั้นถ้ามีการศึกษาแอคติโนมัยซิทีสทั้ง 4 สายพันธุ์เพื่อใช้ทดแทนสายพันธุ์เดิมซึ่งใช้อยู่ในอุตสาหกรรมก็น่าจะสามารถป้องกันปัญหาที่เกิดขึ้นจากแอคติโนฟาจซึ่งเป็นปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นได้

งานวิจัยนี้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ กล่าวคือ จากการแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสจากแหล่งดินต่างๆ ในประเทศ สามารถคัดเลือกแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจได้จำนวน 4 สายพันธุ์ และเมื่อจัดจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์หา 2,6 กรดไดอะมิโนพิมีลิคซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซิทีส และจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการหาลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA แล้วพบว่าแอคติโนมัยซิทีสทั้ง 4 สายพันธุ์เป็น *S. maritimus*, *S. lipmanii*, *S, aureofaciens*, และ *S. venezuelae* ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้มีความสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่สามารถนำไปศึกษาเพื่อพัฒนามาใช้ในอุตสาหกรรมได้ต่อไป

อนึ่งงานวิจัยนี้นับเป็นรายงานการศึกษาครั้งแรกของเรื่องแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจ และ สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ก็เป็นสายพันธุ์ชนิดที่มีการใช้ผลิตสารปฏิชีวนะในวงการอุตสาหกรรม ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยมั่นใจว่าสามารถนำไปพัฒนาและใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เจนจิรา เดชรักษา. 2543. ลักษณะเฉพาะของแอคติโนฟาจที่แยกแยกสเตรปโตมัยซิทีสในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์. 2544. ลักษณะของเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตมัยซิทีสที่แยกจากดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Alexander, M. 1977. Soil Microbiology. 2nd ed. New Delhi: Wiley Eastern.

Anne, J., Wohlleben, W., Burkardt, H. J., Springer, R., and Puhler, A. 1984. Morphological and molecular characterization of several actinophages isolated from soil which lyse *Streptomyces cattleya* or *S. venezuelae*. J. Gen. Microbiol. 130: 2639-2649.

Bernan, V. S., Piel, J., Davidson, B. S., and Moore, B. S. *Streptomyces maritimus* sp. nov., a new actinomycete isolated from marine sediments. (in progress)

Brock, T. D., Smith, D. W., and Madigan, M. T. 1984. Biology of Microorganisms. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall.

Caccavo, F., Jr. 1999. Protein-mediated adhesion of the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY to hydrous ferric oxide. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5017-5022.

Carter, K. F., and Carter, A. T. 1979. A new, wide host-range, temperate bacteriophage (R4) of *Streptomyces* and its interaction with some restriction – modification system. J. Gen. Microbiol. 115: 431-442.

Cohn, J. E. 1943. The pigment production of *Actinomyces coelicolor* and *A. violaceus-ruber*. J. Bacteriol. 46: 133-150.

Cross, T., and Goodfellow, M. 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. London: Academic Press.

Diaz, L. A., Hardisson, C., and Rodicio, M. R. 1989. Isolation and characterization of actinophages infecting *Streptomyces* species and their interaction with host restriction-modification systems. J. Gen. Microbiol. 135: 1847-1856.

Donadio, S., Paladino, R., Costanzi, I., Sparapani, P., Schreil, W., and Laccarino, M. 1986. Characterization of bacteriophages infecting *Streptomyces erythreus* and properties of phage-resistant mutants. J. Bacteriol. 166: 1055-1060.

Dowding, J. E. 1973. Characterization of a bacteriophage virulent for *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 76: 163-176.

Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. 1987. Phage Ecology. New York: John Wiley&Sons.

Hankin, L., Zucker, M., and Sands, D. C. 1971. Improved solid medium for detection and enumeration of pectiolytic bacteria. Appl. Microbiol. 22: 205-209.

Hasegawa, T., Takizawa, M., and Tanida, S. 1984. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. J. Gen. Appl. Microbiol. 29: 319-322.

Hayakawa, M., and Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. Ferment. Technol. 65: 501-509.

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.

Hranueli, D., Pigac, J., and Vesligaj, M. 1979. Characterization of persistence of actinophage RP2 isolated from *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. J. Gen. Microbiol. 114: 295-303.

Hsu, S. C., and Lockwood, J. L. 1975. Powdered chitin as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. Appl. Microbiol. 29: 422–426.

Kalakoutskii, L. V., and Agre, N. S. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. Bacteriol. Rev. 40: 469-524.

Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T., and Yoshida, T. 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. FEMS Microbiol. Lett. 151: 249-255.

Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: John Innes Foundation.

Klieneberger, N. L. 1947. The life cycle of sporing *Actinomyces* as revealed by a study of their structure and septation. J. Gen. Microbiol. 1: 22-32.

Kuhn, S. P., Lampel, J. S., and Strohi, W. R. 1987. Isolation and characterization of a temperate bacteriophage from *Streptomyces galilaeus*. App. Environ. Microbiol. 53: 2708-2713.

Labeda, D. P., and Shearer, M. C. 1990. Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. In Labeda, D. P. (ed.), Isolation of Biotechnology Organisms from Natures, pp. 1-21. New York: McGraw-Hill.

Lanning, S., and William, S. T. 1982. Methods for the direct isolation and enumeration of actinophages in soil. J. Gen. Micobiol. 128: 2063-2071.

Lechevalier, H. A., and Lechevalier, M. P. 1967. Biology of the actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 21: 71-100.

Loke, P., and Ng, C. P., and Sim, T. S. 2000. PCR cloning, heterologous expression and characterization of isopenicillin N synthase from *Streptomyces lipmanii* NRRL 3584. Can. J. Microbiol. 46: 166-170.

Maloy, S. R., Cronan, J. E., Jr., and Freigelder, D. 1994. Microbial Genetics. 2nd ed. Boston: Jones and Bartlett.

Mehling, A., Wehmeier, U. F., and Piepersberg, W., 1995. Nucleotide sequences of streptomycetes 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. Microbiol. 141: 2139-2147.

Miller, B. M., and Litsky, W. 1976. Industrial Microbiology. New York: McGraw-Hill.

Moormann, M., Schlochtermeier, A., and Schrempf, H. 1993. Biochemical characterization of a protease involved in the processing of a *Streptomyces reticuli* cellulase (avicelase). Appl. Environ. Microbiol. 59: 1573-1578.

Nitsch, B., and Kutzner, H. J. 1969. Egg–yolk agar as a diagnostic medium for streptomycetes. Experientia. 25: 220-221.

Pelczar, M. L., Jr., Chan, E. C. S., and Krieg, N. R. 1993. Microbiology Concepts and Applications. International edition. New York: McGraw-Hill.

Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. 1993. Microbiology. 2nd ed. Melbourne: Wm. C. Brown.

Pridham, T. G., and Gottlieb, D. 1948. The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. J. Bacteriol. 56: 107-114.

Pridham, T. G., Hesseltine, C. W., and Benedict, R. G., 1958. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups placement of strains in morphological section. Appl. Microbiol. 6: 52-79.

Pringsulaka, O. Personal communication.

Saito, A., Miyashita, K., Biukovi, G., and Schrempf, H. 2001. Characteristics of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) extracellular protein targeting chitin and chitosan. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1268-1273.

Saudek, E. C., and Colingsworth, D. R. 1947. A bacteriophage in the streptomycin fermentation. J. Bacteriol. 54: 41-42.

Shirling, E. B., and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst . Bacteriol. 16: 313–340.

Sommer, P., Bormann, C., and Gotz, F. 1997. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3553-3560.

Staneck, J. L., and Roberts, G. D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin -layer chromatography. Appl. Microbiol. 28: 226-231.

Sykes, G., and Skinner, F. A. 1973. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. New York: Academic Press.

Tanigaki, M., Sakata, M., Takaya, H., and Mimura, K. 1995. Hydrolysis of palm stearin oil by a thermostable lipase in a draft tube-type reactor. J. Ferment. Bioeng. 80: 340-345.

Tresner, H. D., Davies, M. C., and Backus, E. J. 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. J. Bacteriol. 81: 70-80.

Tresner, H. D., and Backus, E. J. 1963. System of color wheels for streptomycetes taxonomy. Appl. Microbiol. 11: 335–338.

Tsujibo, H., Minoura, K., Miyamoto, K., Endo, H., Moriwaki M., and Inamori, Y. 1993. Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Appl. Environ. Microbiol. 59: 620-622.

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., 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. 1950. Actinomycetes: Their Nature, Occurrence, Activities, and Importance. Massachusetts: Chronica Botanica Company.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., and Sackin, M. J. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. J. Gen. Microbiol. 129: 1743-1813.

Williams, S. T., Goodfellow, M., and Alderson, G. 1989. Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 4. U.S.A.: Williams&Wilkins.

Yamaguchi, T. 1965. Comparison of cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. J. Bacteriol. 89: 444-453.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เบซอล มีเดียม (basal medium agar)

กลูโคส	10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
วุ้นผง	12.0	กรัม

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. คาร์บอน ยูทิไลเซชั่น อการ์ (carbon utilization agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2.64	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2.38	กรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.65	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.0	กรัม
สารละลายเทรซ ซอล์ทของ Pridham และ Gottlieb*	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

* จากภาคผนวก ก หมายเลข 20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. คอลลอยดัล ไคติน อการ์ (colloidal chitin agar)

คอลลอยดัล ไคติน (น้ำหนักแห้ง)	2.0	กรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.7	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.3	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.001	กรัม
แมกกานีสคลอไรด์ ($MnCl_4.4H_2O$)	0.001	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

แยกคอลลอยดัล ไคติน และส่วนประกอบทั้งหมด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)

4. เอค โยค อการ์ (egg yolk agar)

แบคโต เปปโตน (bacto peptone)	10.0	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
วุ้นผง	12.0	กรัม
ไข่แดง	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

เติมไข่แดงผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐานแล้ว ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. กลีเซอรอล-แอสปาราจีน อการ์ (glycerol-asparagine agar)

กลีเซอรอล (glycerol)	10.0	กรัม
แอล-แอสปาราจีน (L-asparagine)	1.0	กรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
สารละลาย เทรซ ซอล์ท (ภาคผนวก ก หมายเลข 19)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

6. ฮิวมิค แอซิด-วิตามิน อการ์ (humic acid-vitamin agar)

ฮิวมิค แอซิด* (humic acid)	1.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.5	กรัม
โปแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	1.7	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.05	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	0.02	กรัม
ไซโคลเฮกซิมิด** (cycloheximide)	50.0	มิลลิกรัม
วิตามินบี***		
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นรด-ด่างเป็น 7.2

* ฮิวมิค แอซิด ละลายใน 0.2 นอร์มอลสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 มิลลิลิตร

** ไซโคลเฮกซิมิดและวิตามินบี ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรและเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

*** วิตามินบี

ไทอามิน-ไฮโดรคลอไรด์(thiamine-HCl)	0.5	มิลลิกรัม
ไรโบเฟลวิน (riboflavin)	0.5	มิลลิกรัม
ไนอะซิน (niacin)	0.5	มิลลิกรัม
ไพริดอกซิน-ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxin-HCl)	0.5	มิลลิกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไอโนซิทอล (inositol)	0.5	มิลลิกรัม
พารา-อะมิโนเบนโซอิค (p-aminobenzoic)	0.5	มิลลิกรัม
ไบโอติน (biotin)	0.25	มิลลิกรัม

7. อินออร์แกนิค ซอล์ท สตาร์ช อการ์ (inorganic salt starch agar)

แป้ง (soluble starch)	10.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	2.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2.0	กรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1.0	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	1.0	มิลลิกรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.7H_2O$)	1.0	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	1.0	มิลลิกรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

8. แมนนิทอล มังบีน 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

ปรับพีเอชเป็น 7.0

ต้มถั่วเขียวบดกับน้ำประปาจนเดือด กรองเอาถั่วเขียวออก นำน้ำต้มถั่วเขียวที่ได้มาเติมน้ำตาลแมนนิทอล วุ้นผง และน้ำกลั่น ปรับพีเอช แล้วนำไปต้มจนเดือดอีกครั้ง

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. โมดิฟายด์ เบนเนท อการ์ (modified Bennett ‘s agar)

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	1.0	กรัม
กลีเซอรอล (glycerol)	10.0	กรัม
แบคโต เคซีน (bacto casein)	2.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

10. 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	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

11. นิวเตรียนท์ อการ์ (nutrient agar)

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

12. นิวเตรียนท์ บรอท (nutrient broth)

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. โอ๊ต มีล อการ์ (oat meal agar)

ข้าวโอ๊ต (oat meal)	20.0	กรัม
สารละลายเทรซ ซอล์ท (trace salt solution)	1.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	18.0	กรัม

ต้มข้าวโอ๊ตในน้ำเดือด 10 – 15 นาที กรองนำส่วนน้ำใสมาใช้

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

14. เพคติน อการ์ (pectin agar)

เพคติน อการ์ 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

<u>ส่วนที่ 1</u>

โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	4.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	5.0	กรัม

<u>ส่วนที่ 2</u>

เพคติน (pectin)	5.0	กรัม

<u>ส่วนที่ 3</u>

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	2.0	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.001	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	0.001	กรัม
วุ้นผง	10.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0

แยกแต่ละส่วนนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน นำมาผสมกันที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15. เปปโตน ยีสต์ เอกซ์แทรก ไอรอน อการ์ (peptone yeast extract iron agar)

เปปโตน	15.0	กรัม
โปรติโอส เปปโตน (proteose peptone)	5.0	กรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
เฟอริค แอมโมเนีย ซิเตรท (ferric ammonium citrate)	0.5	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	0.08	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

16. โปเตโต เดกซ์โตรส อการ์ (potato dextrose agar)

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

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือด กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้
ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

17. ซอฟท์ อการ์ (soft agar)

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3.0	กรัม
แบคโต เปปโตน (bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

แบ่งใส่ในหลองทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. สคิม มิลค์ อการ์ (skim milk agar)

นมสกัด (skim milk)	10.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

19. สารละลายเทรซ ซอล์ท (trace salt solution)

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.7H_2O$)	0.1	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

20. สารละลายเทรซ ซอล์ท ของ Pridham และ Gottlieb

(Pridham and Gottlieb trace salt solution)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.64	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.11	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_4.4H_2O$)	0.79	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

21. ไตรบิวทิริน อการ์ (tributyrin agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	5.0	กรัม
ถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (soytone)	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.0	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.0	กรัม
ไตรบิวทิริน (tributyrin)	10.0	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

22. ทริปติก ซอย บรอท (tryptic soy broth)

แบคโต ทริปโตน	17.0	กรัม
แบคโต ซอยโทน	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโปแทสเซียมฟอสเฟต	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

23. ไทโรซีน อการ์ (tyrosine agar)

กลีเซอรอล (glycerol)	15.0	กรัม
แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)	0.5	กรัม
แอล-แอสปาราจีน (L-asparagine)	1.0	กรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K_2HPO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
สารละลายเทรซ ซอล์ท*	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.2-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24. ยีสต์เอกซ์แทรก เดกซ์โตส (yeast extract dextrose medium)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

25. ยีสต์เอกซ์แทรก มอลต์เอกซ์แทรก อการ์ (yeast extract malt extract agar)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	3.0	กรัม
แบตโต เปปโตน (bacto peptone)	5.0	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	10.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม คอลอยดัล ไคติน

1.1 ชั่งไคติน 100 กรัม ล้างให้สะอาด

1.2 แช่ในสารละลาย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 กรองผ่านด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง

1.4 แช่ในสารละลาย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่งโมง

1.5 กรองผ่านด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง

1.6 ทำซ้ำ 1.2 – 1.5 4 ครั้ง

1.7 ล้างไคตินที่ได้จากข้อ 5 ใน 95 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล 2 ครั้ง

1.8 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป ให้ท่วมไคติน กวนบนเครื่องผสมสารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.9 กรองด้วยกระดาษกรองที่เป็นใยแก้ว โดยให้ส่วนที่กรองไหลลงไปในน้ำกลั่นที่เย็น เมื่อสารละลายไคตินที่กรองผสมกับน้ำกลั่นที่เย็นจะเกิดตะกอนสีขาวขึ้น

1.10 แยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที

1.11 ล้างตะกอนจนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เป็นกลาง

1.12 ละลายตะกอนในน้ำกลั่น

1.13 คำนวณค่า Dry weight factor โดยการนำสารละลายบางส่วนไปอบ หาน้ำหนักแห้ง

โดย $\text{Dry weight factor} = \frac{\text{Wet weight}}{\text{Dry weight}}$

2. สารละลายเอและบี

<u>สารละลายเอ</u>

ละลายกรดซัลฟานิลิค (sulfanilic acid) 0.8 กรัม ใน 5 นอร์มอล กรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร

<u>สารละลายบี</u>

ละลายอัลฟา-แนพธีลามีน (alpha-naphthylamine) 0.5 กรัม ใน 5 นอร์มอล กรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สารละลายบัฟเฟอร์ TAE

เตรียมที่ความเข้มข้น 5 เท่า		
ทริสมาเบส	24.2	กรัม
กรดอะซิติคเข้มข้น	5.71	มิลลิลิตร
0.5 โมลาร์ อีดีทีเอ pH 8.0 (0.5 M. EDTA pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	990	มิลลิลิตร
ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า		

4. สีติดตาม (tracking dye)

เตรียมที่ความเข้มข้น 5 เท่า		
ซูโครส	60	เปอร์เซ็นต์
โบรโมฟีนอลบลู	0.25	เปอร์เซ็นต์
ทริสมาไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0	100	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	100	มิลลิโมลาร์
Na_2EDTA pH 8.0	0.5	มิลลิโมลาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

1. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

   1.1 นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาตัดเป็นชิ้นให้ได้ขนาดที่เหมาะสม นำไปแช่ในน้ำยาดองขั้นที่ 1 (primary fixation) ซึ่งประกอบด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ ของ พาราฟอร์มอลดีไฮด์ (p-formaldehyde) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่น้ำยาดองขั้นที่ 2 (secondary fixation) ซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ของ ออสเมียมเตตระออกไซด์ (osmium tetraoxide, OsO_4) ใน 0.1โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1- 2 ชั่วโมง ภายในตู้ควัน

   1.2 การขจัดน้ำออก (dehydration) โดยเทน้ำยาดองขั้นที่ 2 ออก แล้วจุ่มตัวอย่างใน เอทธานอลความเข้มข้น 35 50 70 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ขั้นตอนละ10 – 20 นาที ตามลำดับ

   1.3 การทำตัวอย่างให้แห้ง โดยการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical dryer model SAMDRI-780)

   1.4 นำตัวอย่างไปติดบนแท่นทองเหลืองด้วยกาวติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (electroconductive adhesive)

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

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

ที่มา : ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)

2.1 นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาตัดเป็นชิ้นให้ได้ขนาดที่เหมาะสม

2.2 นำกริด (grid) ที่เคลือบด้วยฟอร์มวาร (formvar) หรือ คอลโลเดียน (collodion) มาคว่ำลงไปตัวอย่าง

2.3 กดให้กริดแนบกับตัวอย่าง ขั้นตอนนี้ต้องกระทำอย่างระมัดระวัง เนื่องจากกริดบอบบาง ถ้ากดแรงเกินไปจะทำให้กริดเสียรูปทรงได้

2.4 นำกริดขึ้นมา เขย่าเล็กน้อยเพื่อให้เศษของตัวอย่างที่ไม่ต้องการหลุดออกไป

2.5 นำกริดไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, รุ่น JEM-200CX)

ที่มา : Shirling, E. B., and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst . Bacteriol. 16: 313–340.

3. การวัดค่าพีเอชของตัวอย่างดิน

ชั่งตัวอย่างดิน ตัวอย่างละ 20 กรัม ผสมในสารละลาย 1 นอร์มอล โพแทสเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้ตกตะกอน นำส่วนน้ำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดค่าพีเอช

ที่มา : M. L. Jackson. 1956. Soil Chemical anlysis-advanced course. Det. Soils, Univ. Wisconsin, Madison, Wisc.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

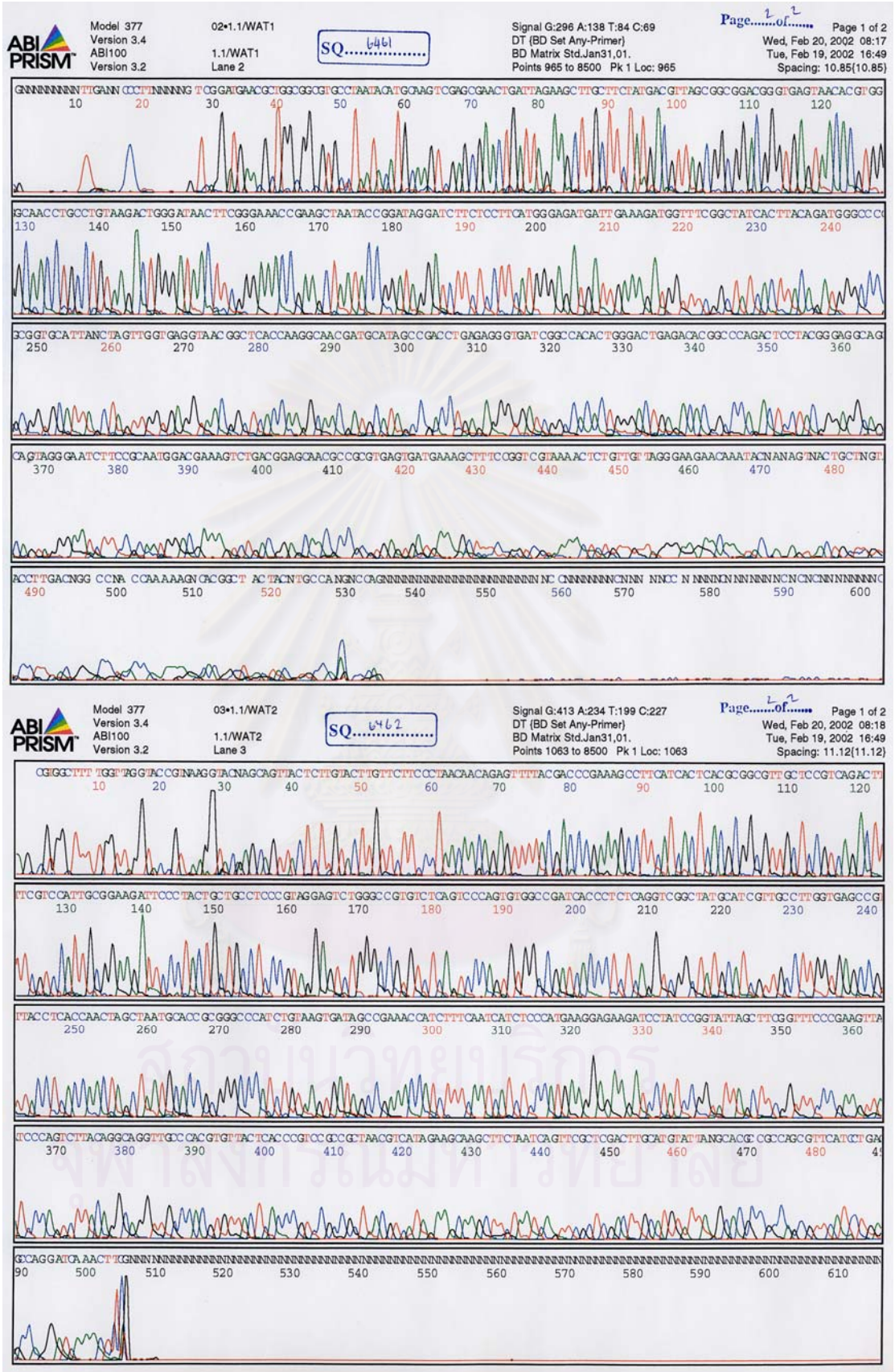
ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยเครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ABI Prism™ (Perkin-Elmer, U.S.A.)

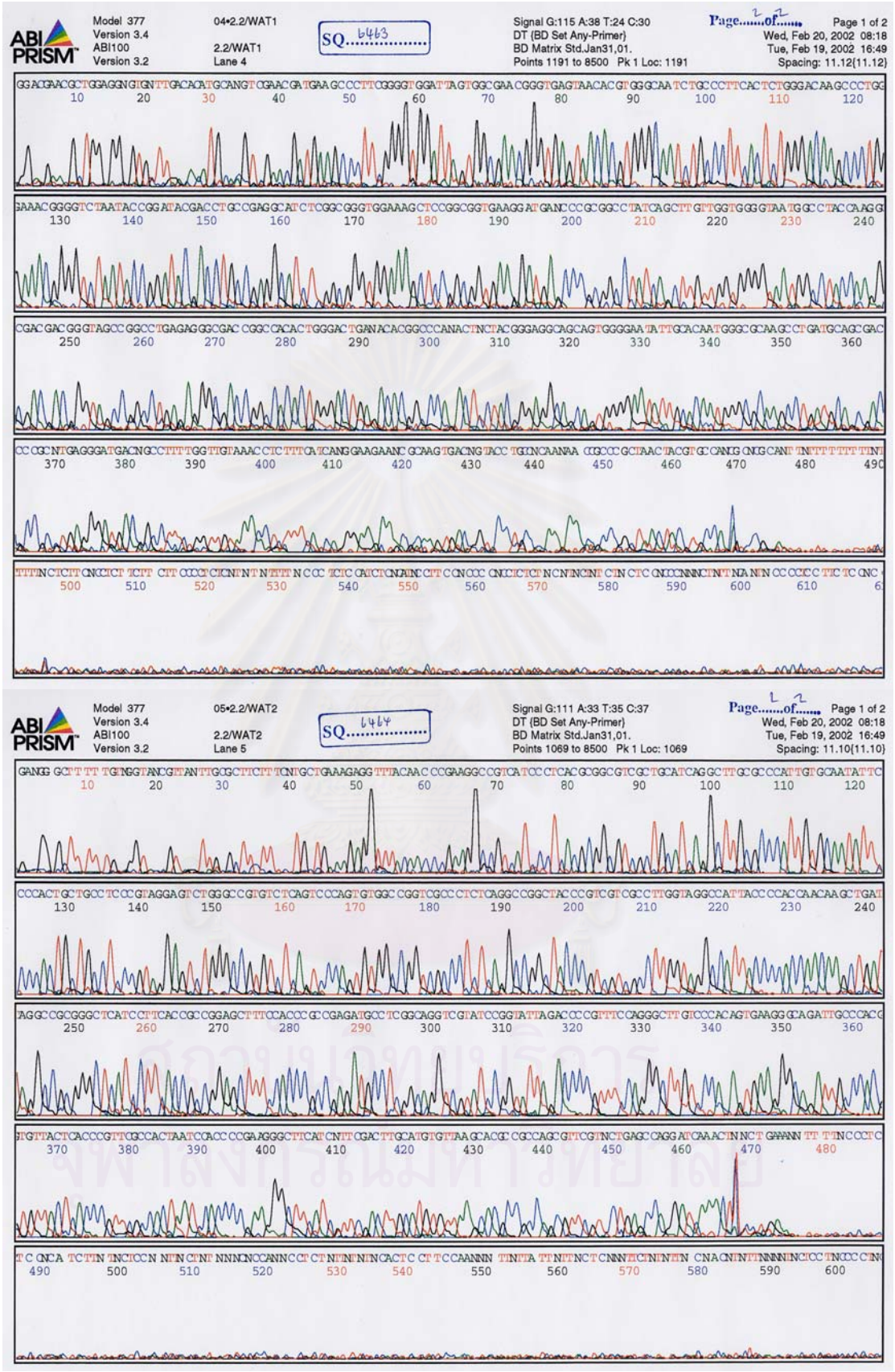
1. เติม Terminator ready reaction mix ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาปริมาตร 12 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่แบบ 90 – 150 นาโนกรัม ไพร์เมอร์ 3.2 พิโคโมล และ น้ำกลั่นบริสุทธิ์
2. ผสมให้เข้ากัน
3. ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal cycler ควบคุมอุณหภูมิปฏิกิริยาโดย Predenature ที่ 96 องศาเซลเซียส 1 นาที Denature ที่ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 5 วินาที Extension ที่ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที ทำปฏิกิริยา 25 รอบ
4. ปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายตกที่ก้นหลอด
5. นำมาตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) โดยเติม น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ 100 เปอร์เซ็นต์ ไอโซโพรพานอล ปริมาตร 60 ไมโครลิตร
6. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที
7. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
8. ทิ้งส่วนน้ำใส แล้วเติม 75 เปอร์เซ็นต์ ไอโซโพรพานอล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
9. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
10. ทิ้งส่วนน้ำใส
11. เติม Loading buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
12. ผสมให้เข้ากัน
13. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำออกมาใส่ในอ่างน้ำแข็งทันที
14. บรรจุตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตรในเครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ABI Prism™
15. แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดังแสดงในรูปที่1 - 4

ที่มา : Bioservice Unit (B.S.U.)

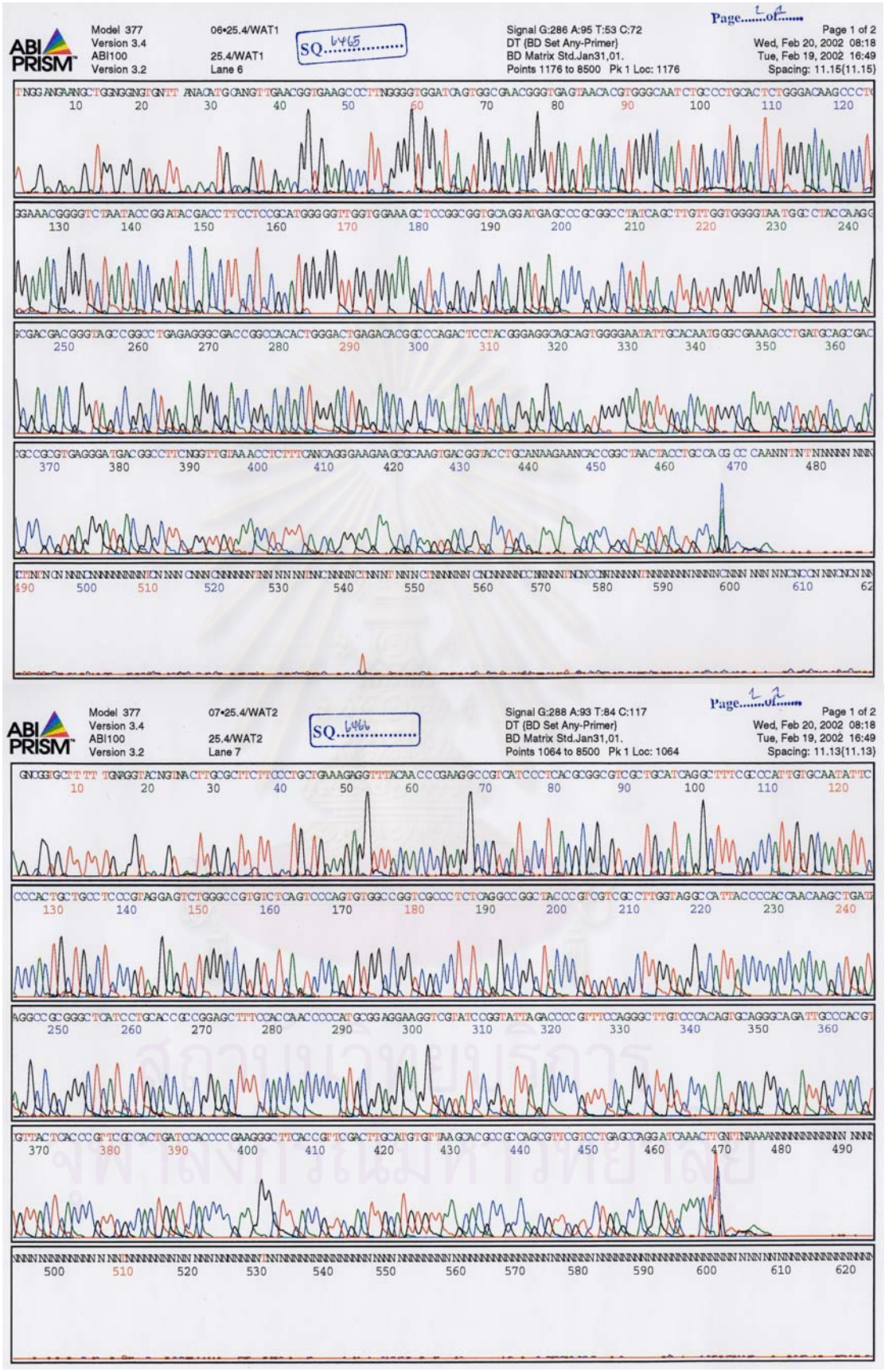
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



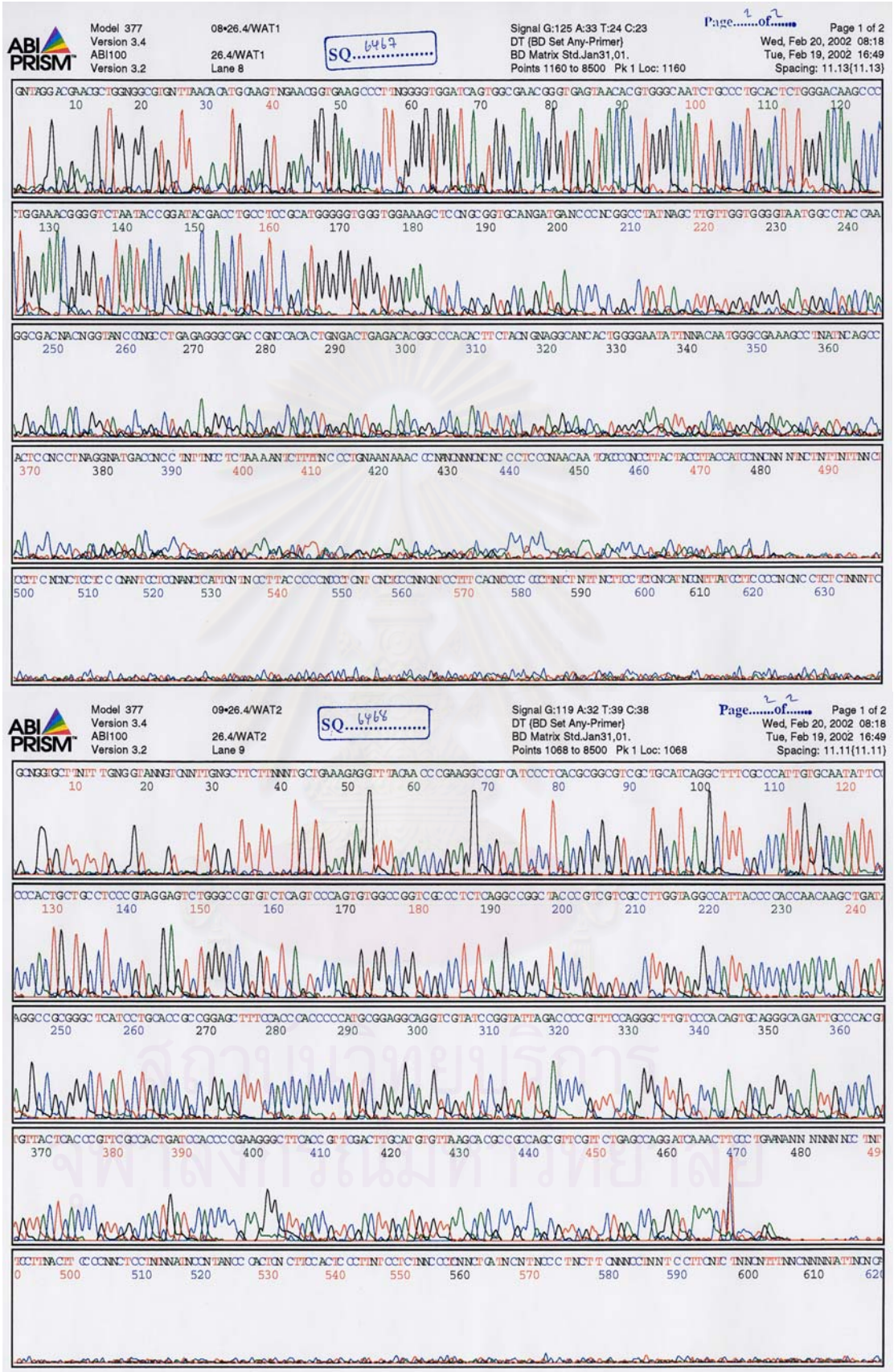
รูปที่ 1 ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของสายพันธุ์ Ac 1.1 ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ABI Prism™



รูปที่ 2 ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของสายพันธุ์ Ac 2.2 ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ABI Prism™



รูปที่ 3 ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของสายพันธุ์ Ac 25.4 ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ABI Prism™



รูปที่ 4 ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของสายพันธุ์ Ac 26.4 ที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ABI Prism™

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายวีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร เกิดวันที่ 10 ตุลาคม 2519 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541

ผลงานทางวิชาการ

วีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร และ สุรีนา ชวนิชย์. 2544. การคัดเลือกและศึกษาลักษณะแอคติโนมัยซิทีสที่ต้านการติดเชื้อแอคติโนฟาจ. การเสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยาย ที่การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 9. 20-21 มีนาคม, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Piyakriengkrai, W., Chavanich, S. 2000. Characterization of several non-actinophage infected actinomycetes isolated from soil. Poster presented at the 12th Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology. 1-3 November, Felix hotel, Kanchanaburi, Thailand.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย