ลักษณะบางประการของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. ที่มีฤทธิ์ต้านโรคหูดของมันฝรั่ง

นางสาวอำไพทิพย์ สุขหอม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2534

ISBN 974-579-577-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017903 1136892 24

PARTIAL CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC FROM *Bacillus* sp. ANTAGONISTIC TO POTATO SCAB DISEASE

Miss Ampaitip Sukhoom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-577-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ลักษณะบางประการของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. ที่มีฤทธิ์ต้านโรคหูดของมันฝรั่ง

โดย นางสาวอำไพทิพย์ สุขหอม

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สุรีนา ชวนิชย์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สุรีนา ชวนิชย์)

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

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งนิพัฒน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อำไพทิพย์ สุขหอม : ลักษณะบางประการของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. ที่มีฤทธิ์ต้านโรคหูดของมันฝรั่ง PARTIAL CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC FROM Bacillus sp. ANTAGONISTIC TO POTATO SCAB DISEASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.สุรีนา ชวนิชย์, 117 หน้า.

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง Streptomyces scabies ซึ่งก่อให้เกิดโรคหูดของมันฝรั่งจาก Bacillus spp. จำนวน 8 สายพันธุ์ ที่ได้จากดินบริเวณผิวมันฝรั่ง โดยใช้วิธีขีดไขว้ร่วมกับวิธีซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ดีที่สุด ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะในขวดเขย่าเชื้อที่คัดเลือกได้ควรเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10.0 กรัม/ลิตร ซอยโทน 20.0 กรัม/ลิตร ผงสกัดมอลท์ 10.0 กรัม/ลิตร $FeSO_4.7H_2O$ 0.028 กรัม/ลิตร $MgCl_2.6H_2O$ 0.005 กรัม/ลิตร $MnSO_4.H_2O$ 0.010 กรัม/ลิตร K_2SO_4 1.60 กรัม/ลิตร และ $CaCO_3$ 5.0 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 27°ซ. มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0-8.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 27°C ให้ผลผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้ผลผลิตของสารปฏิชีวนะสูงสุดในชั่วโมงที่ 16 โดยมีอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ 400 รอบ/นาที และ 1 ลิตร/1 ลิตรของอาหาร/นาที ตามลำดับ

แยกสารปฏิชีวนะจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-80 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้เซฟาเด็กซ์ จี-25 สารปฏิชีวนะออกมาในยอดของโปรตีนยอดที่สอง เมื่อทำโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่มีส่วนผสมของ โพรพานอล:น้ำ:แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์:เอทธิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 5:3:1:1 สามารถแยกสารออกได้เป็นสองแถบได้ค่า Rf เท่ากับ 0.84 และ 0.76 นำแต่ละแถบไปหาค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต พบว่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 203.6 266.9 และ 225 นาโนเมตร คุณลักษณะอื่น ๆ ของสารปฏิชีวนะได้แก่ ละลายได้ดีใน น้ำ มีความเสถียรสูงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 และที่อุณหภูมิ 4°ซ

พลสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต อำไพทิพย์ สุขหอม

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุรีนา ชวนิชย์

ปีการศึกษา ๒๕๓๔ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

AMPAITIP SUKHOOM : PARTIAL CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC FROM Bacillus sp. ANTAGONISTIC TO POTATO SCAB DISEASE. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.SURINA CHAVANICH, 117 pp.

Bacillus sp. strain B1, the best antagonistic activity producer against potato scab, caused by Streptomyces scabies was found and selected by cross-streak and diffusion methods from 8 strains of Bacillus spp. which were isolated from soil on the surface of potato peels. To optimize antibiotic production of the selected strain, the composition of the media should contain 10.0 g/l glucose, 20.0 g/l soytone, 10.0 g/l malt extract, 0.028 g/l $FeSO_4.7H_2O$, 0.005 g/l $MgCl_2.6H_2O$, 0.010 g/l $MnSO_4.H_2O$, 1.60 g/l K_2SO_4 and 5.0 g/l $CaCO_3$, pH 7.0-8.5. The culture were cultivated in 250 ml shake flasks and were incubated at 27°C. The maximum yield was obtained after 36 hrs. However, after the scaling up culture in a 5 l. fermenter, the maximum yield was reached after 16 hrs. with agitation rate of 400 rpm and aeration rate of 1 vvm.

Antibiotic isolated from culture broth was fractionated with 20-80% saturation of ammonium sulfate, then chromatography on Sephadex G-25 column and thin layer chromatography, respectively. Antibiotic activity was found in the second peak of protein from Sephadex G-25. Two bands of antibiotic were obtained from thin layer chromatography with the Rf value of 0.84 and 0.76 when using propanol:water:ammoniumhydroxide:ethylacetate (5:3:1:1) as the solvent system, each band had the maximum absorbsion of UV light at 203.6, 266.9 and 225 nm.

The other characteristics of the antibiotic were greatly soluble in water and were highly stable in phosphate buffer pH 8.0 at 4°C.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต อำไพทิพย์ สุขอม

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สุรินา ชวนิช

ปีการศึกษา ๒๕๓๔ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ เพราะได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลต่อไปนี้ และอีกหลายท่านที่ไม่อาจกล่าวนามในที่นี้ได้หมด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในน้ำใจ และขอระลึกถึงตลอดไป

รองศาสตราจารย์ สุรีนา ชวนิชย์ ที่ได้เมตตารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาให้แนวความคิดคำแนะนำที่มีค่า ความช่วยเหลือ และกำลังใจโดยไม่เห็นแก่เหน็ดเหนื่อยตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ที่ได้ให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือตลอดไปจนถึงการซ่อมบำรุงทำให้งานวิจัยรุดหน้าไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำวิธีการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

บรรดาคณาจารย์ทุกท่านที่เคยอบรมสั่งสอนข้าพเจ้ามาจนกระทั่งบัดนี้

คุณสมคะเน ทองระคนธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้ถังหมัก

รุ่นพี่ เพื่อน รุ่นน้อง และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดไปจนถึงเจ้าหน้าที่รักษาความปลอดภัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ และ พี่ทั้ง 7 ของข้าพเจ้า ในความเอื้ออาทร ความรัก ความห่วงใย และความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านด้วยดีเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ฌ
คำย่อ ..... ฐ
บทที่
1 บทนำ 1
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 29
3 ผลการวิจัย 42
4 การอภิปรายและสรุปผลการวัจัย 87
รายการอ้างอิง 100
ภาคผนวก 108
ประวัติผู้เขียน 117

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	แหล่งและหน้าที่ของแร่ธาตุที่แบคทีเรียต้องการในปริมาณสูง	18
1.2	แหล่งและหน้าที่ของแร่ธาตุที่แบคทีเรียต้องการในปริมาณต่ำ	20
1.3	ผลกระทบของแมงกานีสต่อการผลิตเซคันดารีเมตาบอไลท์ของ *Bacillus* sp.	24
3.1	เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้ง ของ *S. scabies* *Bacillus sp.* จำนวน 8 สายพันธุ์	45
3.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1	46
3.3	ลักษณะทางสรีระวิทยา (Physiological characteristic) ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1.....	49
3.4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียตัวทดสอบที่นำมาใช้แทน *S. scabies*	50
3.5	ลักษณะทางสรีระวิทยาของแบคทีเรียตัวทดสอบที่นำมาแทน *S. scabies*	52
3.6	ผลกระทบของเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า	64
3.7	ผลการตกตะกอนสารปฏิชีวนะด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวตามลำดับส่วน.	77
3.8	การละลายของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1 ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	79
3.9	ความเสถียรของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างในบัฟเฟอร์ 3 ชนิด	81
3.10	ความเสถียรของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	82
3.11	ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1 ต่อการยับยั้งราที่ทำให้เกิดโรคพืชบางชนิด โดยวิธีขีดไขว้	84
3.12	ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B1 ที่มีผลยับยั้งต่อแบคทีเรีย	86

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	เป็นโครงสร้างของเฟอริค ชูโดแบคติน ซึ่งเป็นลิเดอโรฟอร์ที่ผลิตจาก Pseudomonas สายพันธุ์ B10	14
1.2	แสดงโครงสร้างโมเลกุลของบาซิไลซิน	15
2.1	แสดงการคัดเลือกเชื้อ Bacillus sp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง S. scabies โดยวิธีการขีดไขว้ (Cross streak method)	32
3.1	แสดงการยับยั้งของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ต่อ S. scabies โดยวิธีการขีดไขว้	43
3.2	แสดงการยับยั้งรอบกระดาษทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยวิธีซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ (Diffusion method) ของ Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 ก เมื่อใช้ S. scabies เป็นจุลินทรีย์ตัวทดสอบ ข เมื่อใช้ Arthrobacter sp. เป็นจุลินทรีย์ตัวทดสอบ	44
3.3	รูปร่างของ Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 เมื่อเซลล์อายุได้ 12 ชั่วโมง (กำลังขยาย 400 เท่า)	47
3.4	รูปแบบการเจริญของ Bacillus sp.สายพันธุ์ B1ในอาหารนิวเตรียนท์บรอท เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า ติดตามการเจริญโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	48
3.5	รูปร่างของ Arthrobacter sp.ที่ใช้เป็นจุลินทรีย์ตัวทดสอบ ก เมื่อจุลินทรีย์อายุได้ 12 ชั่วโมง; ข เมื่อจุลินทรีย์อายุได้24 ชั่วโมง; ค เมื่อจุลินทรีย์อายุได้ 7 วัน (กำลังขยาย 400 เท่า)	51
3.6	ผลของแหล่งสารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2	54
3.7	ผลของการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp.สายพันธุ์ B1โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2	55

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.8 ผลของแหล่งสารไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2 56

3.9 ผลของแหล่งสารไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ เมื่อผสมกับซอยโทน 20.0 กรัม/ลิตร ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 โดยที่องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2 58

3.10 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของผงสกัดมอล์ทต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 โดยผสมกับซอยโทน 20.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2 59

3.11 ผลการแปรผันความเข้มข้นของซอยโทน ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp.สายพันธุ์ B1โดยผสมกับผงสกัดมอล์ท 10.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างอื่นดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2 60

3.12 ผลของ $CaCO_3$ 5.0 กรัม/ลิตร ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ 20.0 กรัม/ลิตร ผสมกับเปปโตน 10.0 กรัม/ลิตร องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2 62

3.13 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาคผนวกเลขที่ 1.2 63

3.14 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (Initial pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 ในขวดเขย่า 66

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.15 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1ในขวดเขย่า 67

3.16 ผลของรูปแบบของเครื่องเขย่า ที่ใช้ในการบ่มเชื้อต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 68

3.17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ กับการผลิตสารปฏิชีวนะของ Bacillus sp.สายพันธุ์ B1ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยที่อัตราการให้อากาศ 1 ลิตร/1ลิตรของอาหาร/นาที และอัตราการกวน 300 รอบ/นาที 70

3.18 ผลการเปรียบเทียบเมื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0-8.0 ตลอดการหมัก กับการไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างตลอดการหมักต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยที่อัตราการให้อากาศ 1 ลิตร/1ลิตรของอาหาร/นาที และอัตราการกวน 200 รอบ/นาที 72

3.19 ผลของการแปรผันอัตราการกวนต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยที่กำหนดให้อัตราการให้อากาศคงที่ 1ลิตร/1ลิตรของอาหาร/นาที 73

3.20 ผลการแปรผัน อัตราการให้อากาศ ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยกำหนดให้อัตรการกวนคงที่ 400 รอบ/นาที 74

3.21 การทำโครมาโตกราฟีของสารปฏิชีวนะ ที่ผลิตโดย Bacillus sp. สายพันธุ์ B1 โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-25 76

3.22 แสดงค่า Rf จากการทำโครมาโตกราฟีแบบผิวบางของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย Bacillus sp.สายพันธุ์ B1 78

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.23 รูปแบบของการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเล็ต ของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp. สายพันธุ์ B1
ก, เป็นอนุพันธ์ที่มีค่า Rf 0.84
ข, เป็นอนุพันธ์ที่มีค่า Rf 0.76 83

3.24 ประสิทธิภาพการยับยั้งของสารปฏิชีวนะจาก Bacillus sp.สายพันธุ์ B1ต่อการยับยั้ง Bipolaris sorghi ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดของข้าวฟ่าง 85

คำย่อ

°ซ	=	องศาเซลเซียส
ชม.	=	ชั่วโมง
%	=	เปอร์เซนต์
ซม.	=	เซนติเมตร
มล.	=	มิลลิเมตร
°c	=	องศาเซลเซียส
l	=	ลิตร
g	=	กรัม
nm	=	นาโนเมตร
vvm	=	ปริมาตรต่อปริมาตรอากาศต่อนาที
rpm	=	จำนวนรอบต่อนาที