สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

นาย กฤษณ์ สุทธิเสถียรทอง
น.ส. ชมพูนุช จงสมจิตต
น.ส. วลีพร เหลืองอร่ามกุล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67312
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549
b 11663388
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Biological activities of crude extract from actinomycetes

Khirt Suitisatientong

Chompunuch Jongsomjit

Waleeporn Luangaramkul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	ฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์	
นักศึกษา	นาย กฤษณ์	สุทธิเสถียรทอง
	นางสาว ชมพูนุช	จงสมจิตต
	นางสาว วลีพร	เหลืองอร่ามกุล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.จิตติ ท่าไว	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.วีนา ชูโชติ	
กรรมการ อาจารย์ คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	
กรรมการ ดร.จิตติ ท่าไว	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง : ฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์
นักศึกษา : นาย กฤษณ์ สุทธิเสถียรทอง
นางสาว ชมพูนุช จงสมจิตต
นางสาว วลีพร เหลืองอร่ามกุล
ภาควิชา : ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา : จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา : 2458
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. จิตติ ท่าไว

บทคัดย่อ

ในการศึกษาเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ม17ไอโซเลต คือ KB10-28, KB11-2-4, KB10-6, KB11-2-9, KB11-2-11, RB 2-25, *Micromonospora* sp. LK7-1 จากตัวอย่างดินบริเวณจังหวัดราชบุรี, กาญจนบุรี และยะลา น้ำหมักเชื้อของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์เหล่านี้ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์สามชนิด คือ เฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเอ็น-บิวทานอล สิ่งสกัดหยาบในแต่ละส่วนถูกทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ 5 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ด้วย Agar Disc Diffusion Method ผลที่ได้พบว่าสิ่งสกัดหยาบที่สกัดจากน้ำหมักในชั้นเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่มาทดสอบดีอย่างมีนัยสำคัญ ทำการเลือกสิ่งสกัดหยาบในส่วนของเอทิลอะซิเตตจากเชื้อไอโซเลต *Micromonospora* sp. LK7-1 มาทำการศึกษาทางเคมีเบื้องต้น ผลของเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ของสารประกอบที่แยกได้สามารถคาดคะเนว่าสารที่แยกได้เป็นสารในกลุ่มแอนทราควิโนน และ/หรือควิโนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title : Biological activities of crude extract from actinomycetes

Name : Mr.Khirt Suitisatientong

Miss Chompunuch Jongsomjit

Miss Waleeporn Luangaramkul

Department : Applied Biology Faculty of Science

Program : Industrial Microbiology

Academic Year : 2005

Special Project Advisor : Dr. Chitti Thawai

Abstract

In the course of our investigation for bioactive metabolites of the actinomycetes. Seven actinomycete strains, KB 10-28, OKB 11-2-4, OKB 10-6, OKB 11-2-9, OKB 11-2-11, NRB 2-25, *Micromonospora* sp. LK7-1 were isolated from soil samples collected from Kanchnaburi, Rachaburi, and Yala provinces of Thailand. The fermentation broth of these strains were extracted with three organic solvent; hexane, ethylacetate and n-butanol. The crude extract from each part of fermentation broth were tested for antibacterial activity against five genera of tested microorganisms, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Micrococcus luteus* ATCC 9341, using agar disc diffusion method. The results showed that the ethyl acetate extract from fermentation broth of all actinomycetes strains significantly inhibited the growth of the tested microorganisms. The crude ethyl acetate extract of *Micromonospora* sp. LK7-1 was selected for chemical study. The ^{1}H-NMR spectroscopic data of isolated compound could be predicted that the core structure of isolated compounds were anthraquinone and/or quinone types.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ โครงงานพิเศษนี้จะไม่สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดี หากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.จิตติ ท่าไว ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ต่างๆเกี่ยวกับการทดลอง ข้อเสนอแนะ การตอบข้อซักถามของผู้จัดทำ และข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทดลอง "ฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์" (Biological activities of crude extract from actinomycetes) จนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ทางผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ประธานกรรมการ ผศ.วีนา ชูโชติ กรรมการ อ. คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่ให้คำแนะนำปรึกษาและกรุณาช่วยตรวจแก้ไขงานวิจัยฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องต่างๆในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์ไบโอเทค ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาของผู้จัดทำที่เป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆน้องๆที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในเรื่องต่างๆทำให้โครงงานพิเศษเป็นไปด้วยดี

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้

นาย กฤษณ์ สุทธิเสถียรทอง
นางสาว ชมพูนุช จงสมจิตต
นางสาว วลีพร เหลืองอร่ามกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	19
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	48
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก ก.	52
ภาคผนวก ข.	54
ภาคผนวก ค.	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Streptomycin	12
2	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Neomycin	13
3	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Kanamycin	15
4	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Gentamycin	16
5	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Netilmicin	17
6	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Spectinomycin	18
7	แสดงขั้นตอนการสกัดน้ำหมักเชื้อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ	22
8	แสดงขั้นตอนการสกัดน้ำหมักเชื้อ	23
9	แสดงขั้นตอนการแยกสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี	24
10	แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต KB 11-2-11	8
11	แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต KB 11-2-9	30
12	แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต KB 11-2-4	32
13	แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต KB 10-6	34
14	แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-1	43
15	แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-2	44
16	แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-3	45
17	แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-4	46
18	แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-5	47
19	รูปแสดงการทดสอบฤทธิ์การต้านทานเชื้อจุลินทรีย์โดย Agar Disc Diffussion Method	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆโดยประมาณ	4
2	แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยซีทส์สามารถผลิตได้ในแต่ละสปีชีส์	5
3	แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-11 บนอาหาร Y.M.	27
4	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-11	28
5	แสดงผลของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อไอโซเลต KB11-2-11	29
6	แสดงคุณสมบัติทางการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-9 บนอาหาร Y.M.	30
7	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-9	31
8	แสดงผลของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-9	31
9	แสดงคุณสมบัติทางการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-4	32
10	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-4	33
11	แสดงผลของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-430	33
12	แสดงคุณสมบัติทางการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต KB 10-6	34
13	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อไอโซเลต KB 10-6	35
14	แสดงผลของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อไอโซเลต KB 10-6	36
15	แสดงคุณสมบัติทางการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต KB 10-28	36
16	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อไอโซเลต KB 10-28	37
17	แสดงผลของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อไอโซเลต KB 10-28	38
18	แสดงคุณสมบัติทางการเจริญของเชื้อไอโซเลต RB 5-22	38
19	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อไอโซเลต RB 5-22	39
20	แสดงผลของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อไอโซเลต RB 5-22	40
21	แสดงคุณสมบัติทางการเจริญของเชื้อไอโซเลต LK 7-1	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
22 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อไอโซเลต LK 7-1	41
23 แสดงผลของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อไอโซเลต LK 7-1	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือ มีไมซีเลียมแตกกิ่งก้านขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่าConidiosporeหรือConidia ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม แต่ถ้าสปอร์ที่สร้างมีถุงหุ้มเรียก Sporangiospore อยู่ใน sporangium สปอร์ที่สร้างนี้ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่ทนความแห้งได้ดีจึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอคติโนมัยซีทส์ที่รู้จักกันดี คือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้จำนวนมาก จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทส์ (45%), เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) (Bérdy, 2005)

สารปฏิชีวนะชนิดต่างๆมีการค้นพบเป็นจำนวนมากและนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างแพร่หลาย โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ มีสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด และสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างได้ เช่น Gentamycin, Metamycin, Erytomycin, Mycinamycin, Halomycin, Mutamycin, Rafampicin และ Streptomycin เป็นต้น

เนื่องจากปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวนมากได้พัฒนาตัวเองจนสามารถต้านยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้มากขึ้น ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเหล่านี้ จึงจำเป็นต้องดำเนินต่อไป

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นสารที่สกัดได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ล้วนเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ สำหรับนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคดังกล่าว จากข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงนั้นพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทส์เป็นแหล่งสำคัญ เนื่องจากเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด และโอกาสที่จะค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ยังคงมีอยู่สูง

ดังนั้นโครงงานนี้จึงมุ่งเน้นสกัดสารจากเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบ ตลอดจนแยกสิ่งสกัดหยาบโดยเทคนิคโครมาโตกราฟฟี เพื่อนำมาทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อทำการสกัดสิ่งสกัดหยาบจากน้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลตที่คัดเลือก

1.2.2 เพื่อแยกสิ่งสกัดหยาบโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี

1.2.3 เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดหยาบ

1.2.4 เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสิ่งสกัดหยาบ และสารส่วนที่แยกได้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ทำการสกัดสารจากน้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลตที่คัดเลือก

1.3.2 นำสิ่งสกัดหยาบที่ได้มาทำการแยกโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี

1.3.3 นำสิ่งสกัดหยาบและสารส่วนที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิธี Bioautographic Method และ Agar Disc Diffusion Method

1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1.4.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่นำมาใช้ในการศึกษา

เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นทั้งหมด 7 ไอโซเลต คือ KB 10-28, KB 11-2-4, KB 10-6, KB 11-2-9, RB 2-25, KB 11-2-11 และ *Micromonospora* sp. LK7-1

1.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Yeast extract-Malt extract broth นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการสกัด และนำสิ่งสกัดที่ได้ในแต่ละส่วนมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดย Agar Disc Diffusion Method

1.4.3 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลตที่คัดเลือก

1.4.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ

1.4.3.2 การหมักและการสกัดสิ่งสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ

1.4.3.3 การสกัดและแยกสาร

นำน้ำหมักเชื้อมากรองแยกเอาส่วนน้ำใส จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการสกัดได้ส่วนของชั้นเอทิล-อะซิเตต (Crude Ethylacetate Extract)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3.4 การแยกสิ่งสกัดหยาบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นและนำมาแยกสารออกเป็นส่วนๆ(Fractions) ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดย Bioautographic Method

1.4.4 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้น

นำสารส่วนที่แยกได้(Fraction) มาวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นโดย Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถสกัดสิ่งสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากการหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลตที่คัดเลือก

1.5.2 สามารถแยกและศึกษาโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นของสารทุติยภูมิที่แยกได้

1.5.3 เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ศึกษาวิจัยและพัฒนาในเชิงวิทยาศาสตร์ต่อไป

1.5.4 การวิจัยในครั้งนี้อาจค้นพบสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่น่าสนใจ ซึ่งอาจใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาต่อทางด้านเภสัชศาสตร์ เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตรสาธารณสุขต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือ มีไมซีเลียมแตกกิ่งก้านขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า Conidiospore หรือ Conidia ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม แต่ถ้าสปอร์ที่สร้างมีถุงหุ้มเรียก Sporangiospore อยู่ใน sporangium สปอร์ที่สร้างนี้ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่ทนความแห้งได้ดีจึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอคติโนมัยซีทส์ที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ จากข้อมูลพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทส์ (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) (Bérdy, 2005)

ตารางที่1 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยประมาณ

Source	Antibiotics	"Other bioactive" metabolites	Total bioactive metabolites	Practically used (in human therapy)	Inactive metabolites
Bacteria	2900	900	3800	10~12(8~10)	3000 to 5000
Actinomycetales	8700	1400	10100	100~120(70~75)	5000 to 10000
Fungi	4900	3700	8600	30~35(13~15)	2000 to 15000
Total	16500	6000	22500	140~160 (~100)	20000 to 25000

ที่มา : Bérdy (2005)

โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น ดังแสดงในตารางที่ 2 (Bérdy, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแอคติโนมัยซีทส์สามารถผลิตได้ในแต่ละสปีชีส์

***Streptomycetaceae*:**		***Thermomonosporaceae*:**	
Streptomyces	~8000	*Actinomadura*	345
Streptoverticillium	258	*Saccharothrix*	68
Kitasatosporia	37	*Microbispora*	54
Chainia	30	*Actinosynnema*	51
Microellobosporia	11	*Nocardiopsis*	41
Nocardioides	9	*Microtetraspora/Nonomuria*	26/21
		Thermomonospora	19
***Micromonosporaceae*:**		*Micropolyspora/Faenia*	13/3
(*Actinoplanetes*)		*Thermoactinomyces*	14
Micromonospora	740	*Thermopolyspora*	1
Actinoplanes	248	*Thermoactinopolyspora*	1
Dactylosporangium	58		
Ampullariella	9	***Mycobacteriaceae*:**	
Glycomyces	2	(*Actinobacteria*)	
Catenuloplanes	3	*Nocardia*	(357)
Catellatospora	1	*Mycobacterium*	57
***Pseudonocardiaceae*:**		*Arthrobacter*	25
Saccharopolyspora	131	*Brevibacterium*	17
Amycalotopsis/Nocardia	120/357	*Proactinomyces*	14
Kibdellosporangium	34	*Rhodococcus*	13
Pseudonocardia	27		
Amycolata	12	**Other (unclassified) species:**	
Saccharomonospora	2	*Actinosporangium*	30
Actinopolyspora	1	*Microellobosporia*	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2 (ต่อ)

Streptosporangiaceae:		**Other (unclassified) species:**	
(*Maduromycetes*)		*Frankia*	7
Streptosporangium	79	*Westerdykella*	6
Streptoalloteichus	48	*Kitasatoa*	5
Spirillospora	11	*Synnenomyces*	4
Planobispora	10	*Sebekia*	3
Kutzneria	4	*Elaktomyces*	3
Planomonospora	2	*Excelsospora*	3
		Waksmania	3
		Alkalomyces	1
		Catellatospora	1
		Erythrosporangium	1
		Streptoplanospora	1
		Microechinospora	1
		Salinospora	1

ที่มา : Bérdy (2005)

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารประกอบที่ผลิตหรือสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา หรือแอคติโนมัยซีทส์ สารที่ผลิตขึ้นได้นี้สามารถไปยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง หรือไปมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์กลุ่มนั้นๆได้โดยใช้ในปริมาณน้อย ดังนั้นยาปฏิชีวนะเป็นยาที่จัดอยู่ในกลุ่มยาต้านจุลินทรีย์ที่แยกได้จากจุลินทรีย์นั่นเอง (มาลิน, 2540)

ปัจจุบันจะรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ (ยากึ่งสังเคราะห์ หมายถึง สารที่ใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีร่วมกับวิธีผลิตตามธรรมชาติ) ที่ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นต้นแบบด้วย (ดวงพร, 2530)

สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเป็นสารเมตาโบไลท์ขั้นที่สอง (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารเมตาโบไลท์ที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญ แต่ถ้ามีอาจก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเซลล์ที่ผลิต ส่วนใหญ่จะสร้างในช่วง late log phase จนถึงช่วง Stationary phase อันเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มมีการเจริญคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งหรือทำลาย จุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงไปได้ จึงช่วยยืดชีวิตของจุลินทรีย์ให้อยู่นานขึ้น สารปฏิชีวนะแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ (สายสมร, 2524)

ก. Bacteriocidal antibiotics เป็นสารพวกที่ฆ่าหรือทำให้เกิดการแตกสลายของแบคทีเรียที่เข้าทำลาย เช่น เพนนิซิลิน (Penicillin)

ข. Bacteriostatic antibiotics เป็นพวกที่ยับยั้งการเจริญและการแบ่งตัวของแบคทีเรีย เช่น คลอแรมฟีนิคลอ (Chloramphenicol)

2.2 การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบัน สามารถจำแนกได้หลายแบบและเพื่อสะดวกแก่การศึกษาหรือเลือกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อต่าง ๆ สามารถจำแนกได้ คือ

2.2.1 การจัดจำแนกตามลักษณะโครงสร้าง (Tortora และคณะ, 1992 และ Alcamo,1994)

2.2.1.1 Penicillin โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Thiazolidine Ring และ Beta-Lactam Ring ทำปฏิกิริยารวมกันเป็นนิวเคลียส (Nucleus) ของ Penicillin เรียกว่า 6-aminopenicillanic acid (6-APA) ชนิดของ Penicillin จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับตำแหน่ง side chain ของ Beta-Lactam เช่น ถ้าตำแหน่ง side chain เป็น Benzyl group มีชื่อเรียกว่า Penicillin G ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ Penicillin V, Penicillin F เป็นต้น

2.2.1.2 Caphalosporin มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานคล้ายกับ Penicillin ต่างกันที่ Cephalosporin มี Dihydrothiazine Ring แทน Thiazolidine Ring เมื่อรวมกับ Beta-Lactam ได้เป็นนิวเคลียส (Nucleus) ของ Cephalosporin เรียกว่า 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ได้แก่ Cephalothin, Cefamandole และ Cefataxime

2.2.1.3 Aminoglycoside โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย Amino Sugar เชื่อมต่อด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ Streptomycin, Neomycin และ Gentamycin

2.2.1.4 Tetracycline มีโครงสร้างพื้นฐานที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันด้วย Benzene Ring 4 Ring เป็น Hydronapthacene Nucleus สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ Minocycline, Oxytetracycline และ Chlortetracycline

2.2.1.5 Chloramphenicol มีโครงสร้างพื้นฐานแบบ ไนโตรเบนซิน (Nitrobenzene)

2.2.1.6 Macrolides โครงสร้างพื้นฐานเป็นแบบ Macrocyclic Lactone Ring มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactone เชื่อมต่อกับน้ำตาล หรือแอลกอฮอล์ มี Carbon Atom มากกว่า 20 ตัวขึ้นไป ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ Erythromycin, Clarithromycin และ Azithromycin

2.2.1.7 Polypeptide มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) เชื่อมต่อกันด้วย พันธะเปบไทด์ (Peptide bond) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ Bacitracin และ Polymyxin B

2.2.1.8 Vancomycin เป็นกลุ่มสารปฏิชีวนะที่มีโมเลกุลใหญ่มาก มีมวลโมเลกุลประมาณ 3,500 ประกอบด้วย น้ำตาล และกรดอะมิโน (amino acid) ที่ไม่ทราบสูตรโครงสร้างแน่นอน

2.2.1.9 Polyene กลุ่มสารปฏิชีวนะที่มีพันธะคู่หลายพันธะเป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น Nystatin และ Amphotericin

2.2.1.10 Rifamycin มีโครงสร้างพื้นฐาน ประกอบด้วย Aromatic ring เชื่อมต่อกันด้วย Aliphatic Bridge มีอนุพันธ์ คือ Rifampin

2.2.1.11 Griseofulvin มีโครงสร้างเป็นแบบ Spirocyclic Structure

2.2.1.12 Lincomycin มีโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) เชื่อมต่อกับ Amino Sugar ที่เชื่อมต่อกับซัลเฟอร์

2.2.2 การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะตามขอบเขตในการทำลาย (ดวงพร,2530)

ในการนำสารปฏิชีวนะมาใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องทราบถึงฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 พวก คือ

2.2.2.1 Broad-spectrum Antibiotics

คือ สารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม แบคทีเรียแกรมลบ เชื้อราและยีสต์ เช่น Chloramphenicol และ Tetracyclines

2.2.2.2 Intermediate-spectrum Antibiotics

คือ การปฏิชีวนะที่สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม แบคทีเรียแกรมลบ และกลุ่ม Mycobacteria เช่น Streptomycin, Gentamycin, Kanamycin และ Neomycin

2.2.2.3 Narrow-spectrum Antibiotics

คือ สารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายจุลินทรีย์พวกใดพวกหนึ่ง โดยอาจทำลายเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก หรือแกรมลบ เช่น Penicillin G, Erythromycin และ Lincomycin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 การจัดจำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์ (Tortora และคณะ, 1992)

การออกฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะสามารถพบได้ 2 แบบ คือ สารปฏิชีวนะที่มีผลในการฆ่าเชื้อได้โดยตรง (Bacteriocidal) และที่มีผลในการยับยั้งการเจริญโดยจุลินทรีย์ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ (Bacteriostatic) สารปฏิชีวนะแต่ละกลุ่มมีความสามารถในการทำลายเชื้อของจุลินทรีย์ได้ต่างกัน ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ด้วยกันคือ

2.2.3.1 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย Macromolecular Net Work ที่เรียกว่า เปบติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ซึ่งสารดังกล่าวพบเฉพาะที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น โดยสารปฏิชีวนะมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลังเจริญ เช่น Penicillin และ Cephalosporin จะป้องกันการเกิด Crosslink ของเปบติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ในขณะที่ Bacitracin และ Vancomycin ยับยั้งการทำงานของ Peptidoglycan Synthetase ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง Peptidoglycan Backbone ของผนังเซลล์ ดังนั้นเมื่อโครงสร้างของผนังเซลล์มีความอ่อนแอไม่สมบูรณ์ เซลล์จึงถูกย่อยสลายได้ในที่สุด สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ host น้อยมาก โดยเฉพาะมนุษย์ เนื่องจากเซลล์ของมนุษย์ไม่มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย Peptidoglycan (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

2.2.3.2 ออกฤทธิ์ทำลายพลาสมาเมมเบรน

สารปฏิชีวนะในกลุ่ม Polypeptide ทำให้ความสามารถในการนำสารเข้าของพลาสมาเมมเบรน (Plasma Membrane) เปลี่ยนแปลง เช่น Polymyxins, Colistin, Nystatin, Amphotericin B และ Streptomycin ทำให้คุณสมบัติที่เป็น Selective Permeability เสียไปหรือทำให้เกิดการรั่วไหลของสารออกจากเซลล์ หรือคุณสมบัติการเป็น Osmotic Barrier เสียไป (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547)

2.2.3.3 ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั้งพวกโพรคาริโอต (Prokaryotes) และยูคาริโอต (Eukaryote) พบว่าไรโบโซมจะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนในโพรคาริโอต (Prokaryotes) ไรโบโซมเป็นชนิด 70s ไรโบโซมประกอบด้วย หน่วยย่อยสองหน่วยคือ 50s และ 30s unit สารปฏิชีวนะชนิด Chloramphenicol ออกฤทธิ์ที่ตำแหน่ง 50s คือยับยั้งการสร้างพันธะเปบไทป์ (peptide bond) ของสาย Polypeptide Erythromycin ออกฤทธิ์บริเวณ 50s ของ 70s ribosome เช่นเดียวกัน โดยป้องกันการเกิด Translocation – movement ของ mRNA tetracycline ยับยั้งการรวมกันของ tRNA ที่มีกรดอะมิโน (Amino Acid) กับ ไรโบโซม (Ribosome) ป้องกันการต่อกันของกรดอะมิโน (Amino Acid) เพื่อเป็นสายโซ่ Polypeptide สารปฏิชีวนะกลุ่ม Amino glycoside เช่น Gentamycin และ Streptomycin จะทำให้รูปร่างของ 30s ของ 70s ไรโบโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ribosome) เปลี่ยนแปลง ทำให้การอ่านรหัสของยีนบน mRNA ไม่ถูกต้องมีผลในการสังเคราะห์โปรตีนผิดปกติ

2.2.3.4 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลิอิก

สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อขบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของกรดนิวคลิอิก (nucleic acid) ในการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าบางชนิด เช่น Antiviral Idoxuridine มีข้อจำกัดในการใช้สูง เนื่องจากสารดังกล่าวมีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และ อาร์เอ็นเอ (RNA) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วน Rifamycin, Nalidixic acid และ Trimethoprim เป็นสารปฏิชีวนะที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเลือกออกฤทธิ์ทำลาย

2.2.3.5 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารเมตาบอไลท์

สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารเมตาบอไลท์ที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ เช่น Sulfonamides, Trimethoprim และ Isoniazid สารปฏิชีวนะ ส่วนใหญ่มักมีกลไกการออกฤทธิ์ขัดขวาง โดยการแก่งแย่งที่กัน (Competitive inhibition) โดยอาศัยสูตรโครงสร้างที่คล้ายกัน เช่น Sulfonamides มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ para – aminobenzoic acid (PABA) ซึ่งเป็นสารที่เชื้อจำเป็นต้องนำไปใช้ในการสังเคราะห์ Folic Acid หรือ Trimethoprim และ Pyrimethamine มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ Pteridine Portion ของ Dihydrofolate ออกฤทธิ์ขัดขวางเอนไซม์ Dihydrofolate Reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน Dihydrofolic Acid ไปเป็น Tetrahydrofolic Acid

2.3 ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ผลิต เช่น

2.3.1 Streptomycin

2.3.2 Neomycin

2.3.3 Paromomycins

2.3.4 Kanamycins

2.3.5 Amikacin

2.3.6 Gentamicin

2.3.7 Tobramycin

2.3.8 Netilimicin

2.3.9 Spectinomycin

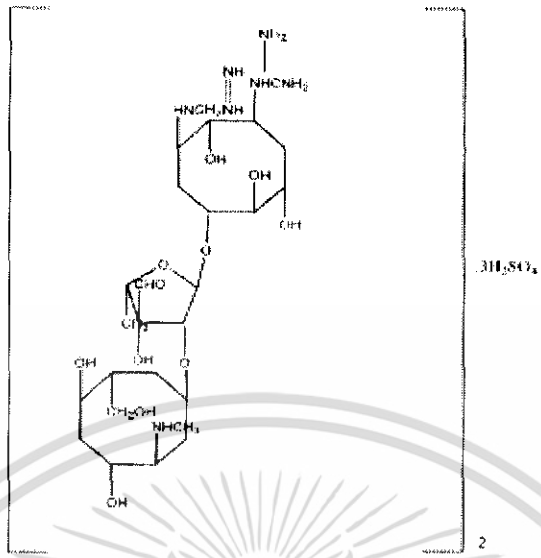
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 Streptomycin

Streptomycin sulfate มีลักษณะสีขาวไม่มีกลิ่นเป็นผง และเกิดปฏิกิริยากับความชื้นได้อย่างรวดเร็ว แต่จะไม่เกิดปฏิกิริยากับแสงและอากาศแต่จะสามารถละลายในน้ำได้ดี และถ้าหากอยู่ในรูปสารละลายจะเป็นกรดเล็กน้อยหรือเป็นกลางละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ แต่จะไม่สามารถละลายได้เลยในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic Solvent) หากว่าอยู่ในรูปสารละลายในน้ำสามารถทำการเก็บได้เลยที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยที่ไม่มีการสูญเสียคุณสมบัติต่างๆของสารไป แต่จะมีความเสถียรมากถ้าทำการเก็บที่พีเอช 4.5 ถึง 7.0 และจะมีการเสียสภาพได้เมื่อได้รับความร้อน และถ้าต้องการที่จะทำการฆ่าเชื้อ (Sterile) สามารถทำได้โดยการนำน้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วมาผสมรวมกับ Streptomycin ซึ่งจะอยู่ในรูปที่เป็นผงที่ทำการฆ่าเชื้อ(Sterile)แล้ว โดยที่ตัวผง Streptomycin นั้นจะมีความปนเปื้อน (Impurities) ซึ่งเป็นสิ่งที่ยากในการกำจัดออกและแต่จะสามารถทำการกำจัดออกได้โดยการใส่แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) จะสามารถนำเอาความปนเปื้อน (Impurities) ออกมาได้ซึ่งจะทำให้ Streptomycin ที่ได้มีความเสถียรและสามารถทำการเก็บรักษาได้ง่าย

จุลินทรีย์ที่สามารถทำการผลิต Streptomycin ได้คือ *Streptomyces griseus* และยังสามารถทำการผลิตสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆได้อีก เช่น Hydroxystreptomycin, Mannisidostreptomycin และ Cycloheximide แต่จะเป็นสารที่ไม่ค่อยได้รับความสนใจมาก และในทางการแพทย์โดยที่ Streptomycin A จะใช้เรียกแทน Streptomycin และ Streptomycin B ใช้เรียกแทน Mannisidostreptomycin โดยที่ Hydroxystreptomycin จะแตกต่างจาก Streptomycin ตรงที่จะมี Hydroxy group ตรงตำแหน่งของ Hydrogen ตำแหน่งที่ 1 ของ Methyl group บนน้ำตาล Streptose Methyl group และ Mannisidostreptomycin จะมีหมู่ Mannose ที่เกาะกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic bond) ตรงที่ Hydroxy group ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 4 และหมู่ n-methyl-L-glucosamine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Streptomycin

ที่มา : http://www.rxlist.com/cgi/generic2/streptomycin.htm

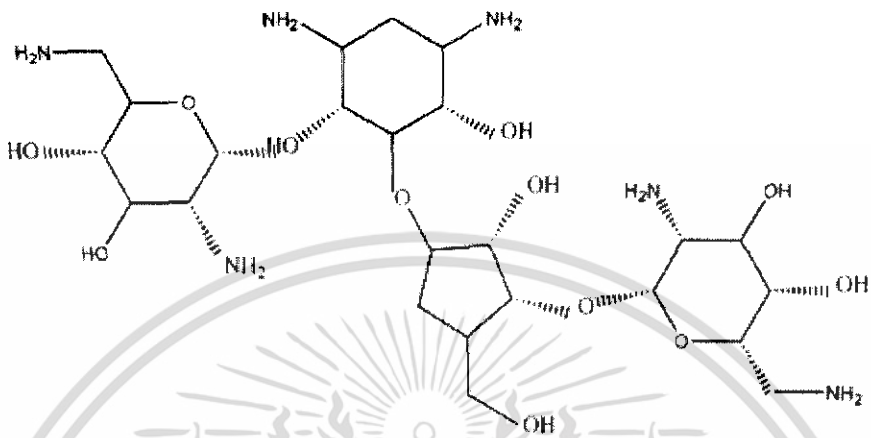
2.3.2 Neomycin

ในการค้นหายาปฏิชีวนะ (Antibiotics) ที่ไม่ก่อให้เกิดพิษหรือเป็นพิษน้อยกว่า Streptomycin นั้นได้มีการค้นพบ Neomycin ในปี ค.ศ. 1949 โดยค้นพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถทำการผลิตได้คือ *Streptomyces fradiae* จากนั้นเป็นต้นมา Neomycin เริ่มมีความสำคัญมากขึ้นเรื่อยๆในปัจจุบัน Neomycin เป็นสารปฏิชีวนะที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการทำการรักษาการติดเชื้อภายในทางเดินอาหาร (Gastrointestinal infection) การติดเชื้อที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ (Dermatologic infections) และนอกจากนี้ยังใช้ในการผ่าตัดโดยจะช่วยในการลดการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal Flora) โดยที่ Neomycin จะมีผลต่อแบคทีเรียหลายชนิดและมีความเป็นพิษที่ต่ำและจะไม่ทำให้เกิดสภาวะภูมิคุ้มกันไวเกิน (Hypersensitivity) และจะถูกดูดซึมได้เพียงเล็กน้อยภายในทางเดินอาหาร ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ได้ง่ายโดยที่ไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงอื่น ๆ

Neomycin จะอยู่ในรูปของเกลือซัลเฟต โดยที่จะมีสีขาวหรือเป็นผลึกสีเหลืองที่มีลักษณะเป็นผงและสามารถละลายน้ำได้ดีเพราะเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น Hygroscopic สูง และสามารถเกิดปฏิกิริยากับแสงได้อย่างรวดเร็ว แต่จะมีความเสถียรในช่วงพีเอช ที่กว้างและสามารถนำไปทำการฆ่าเชื้อได้ และ 60 เปอร์เซ็นต์ ของ Neomycin จะเป็น Free Base จุลินทรีย์ที่สามารถทำการผลิต Neomycin ได้คือ *Streptomyces fradiae* โดยที่ Neomycin จะอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน โดยที่จะมีสารที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับ Neomycin คือ Neamine, Neomycin A, B, C นอกจากนี้ *Streptomyces fradiae* ยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถทำการผลิตสารปฏิชีวนะอื่นๆได้อีกเช่น Fradicin ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรีย



รูปที่2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Neomycin
ที่มา : http://www.epochem.com/products/pharm/1405-10-3.htm

2.3.3 Paromomycin

มีการค้นพบ Paromomycin ในปี ค.ศ.1956 โดยที่จะมีการผลิตได้โดย *Streptomyces* sp. PD 0499 โดยผลิตจาก *Streptomyces rimosus* โดยพบ *Streptomyces rimosus* จากการเก็บตัวอย่างในประเทศโคลัมเบีย อย่างไรก็ตาม Paromomycin มีความคล้ายคลึงกับ Neomycin และ Streptomycin ในเรื่องของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Antibiotic Activity) มากกว่า Oxytetracyclin ซึ่งผลิตได้โดย *Streptomyces rimosus* เช่นกัน

โครงสร้างทั่วไปของ Paromomycin ได้มีการรายงานจากการใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี เราจะพบว่า Paromomycin จะประกอบด้วยสองส่วนคือ Paromomycin I และ Paromomycin II และสูตรโครงสร้างที่แน่นอนของ Paromomycin มีการค้นพบและได้รับการยืนยัน โดยการใช้เทคนิค Mass Spectrometric โครงสร้างของ Paromomycin จะมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของ Neomycin B จะแตกต่างกันตรงที่ Paromomycin จะประกอบด้วย D-Glucose แทน 6-Amino-6-Deoxy-D-Glucosamine ซึ่งจะพบใน Neomycin B โดยที่ความคล้ายกันของโครงสร้างนี้จะพบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างสาร Paromomycin II กับ Neomycin C โดยที่ Paromomycin มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้กว้าง (Broad Spectrum) และจะนิยมใช้ในการรักษาอาการเกี่ยวกับการติดเชื้อในทางเดินอาหาร (Gastrointestinal infection) ที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อโดยพวก *Salmonella*, *Shigella* และจุลินทรีย์ก่อโรคอื่นๆ ที่อยู่ภายในทางเดินอาหารเช่น *Escherichia coli* อย่างไรก็ตามในการใช้ก็จะต้องระวังเนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

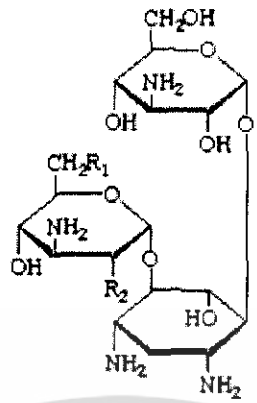
ในการใช้ Paromomycin กับการติดเชื้อในทางเดินอาหาร และจะพบได้ว่า Paromomycin นั้นสามารถละลายได้ดีในน้ำและมีความเสถียรต่อความร้อนและช่วงของพีเอชที่กว้าง

2.3.4 Kanamycin sulphate

Kanamycin สามารถทำการคัดแยกได้ในปี ค.ศ. 1957 โดยทำการคัดแยกออกมาจาก *Streptomyces kanamyceticus* โดยที่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพกับแบคทีเรียพวก Mycobacteria และแบคทีเรียต่างๆ ภายในลำไส้ซึ่ง Kanamycin มีการออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียหลายชนิดจึงเป็นที่สนใจในการศึกษามากกว่าสารปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ ดังนั้นในเวลาอันสั้น Kanamycin จึงเป็นสารปฏิชีวนะที่มีความสำคัญและได้รับความนิยมอย่างมากในการใช้ในการรักษาต่างๆ

การวิจัยเกี่ยวกับกิจกรรมต่างๆของ Kanamycin นั้นจะมุ่งเน้นไปที่โครงสร้างของ Kanamycin ซึ่งจะทำการตรวจสอบออกมาโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีและจากการตรวจสอบจะพบว่า *Streptomyces kanamyceticus* จะมีการสร้างสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน คือ Kanamycin A, B และ C และ Kanamycin บริสุทธิ์ที่พบในท้องตลาดนั้นจะเป็น Kanamycin A ซึ่งเป็นชนิดที่เป็นพิษน้อยที่สุดโดยที่ Kanamycin แต่ละชนิดจะแตกต่างกันตรงที่ชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุลที่จับอยู่กับ Glycosidic Oxygen ที่ตำแหน่งของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ Central Deoxystreptamine สารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ Kanamycin คือ Neomycin และ Paromomycin โดยปกติแล้ว Kanamycin จะอยู่ในรูปของเกลือที่สามารถละลายน้ำได้ แต่เวลาที่ทำการใช้งานจะอยู่ในรูปของเกลือซัลเฟตซึ่งจะเป็นรูปที่สามารถละลายน้ำได้ง่ายมากและจะมีความเสถียรต่อความร้อนและสารเคมีต่าง โดยที่ Kanamycin จะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้งกรดและเบส ภายในช่วงพีเอชที่ 2-11 โดยที่จะนิยมใช้ Kanamycin ในการรักษาอาการติดเชื้อภายในลำไส้โดยเฉพาะการติดเชื้อที่มาจากแบคทีเรียแกรมลบต่างๆ เช่น *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* และ *Enterobacter* ซึ่งจะเป็นเชื้อที่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ดี และจะนิยมใช้ Kanamycin ในการเป็นสาร Antiseptic ก่อนทำการผ่าตัดต่างๆ แต่ Kanamycin จะดูดซึมได้น้อยมากภายในลำไส้ ในการใช้งานควรที่จะทำการฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อของผู้ป่วย แต่ถ้าในกรณีที่มีการติดเชื้อขั้นรุนแรงนั้นจะทำการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ และจะไม่นิยมใช้ Kanamycin ในการรักษาวัณโรค เนื่องจากเชื้อ *Mycobacterium* นั้นสามารถทำการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้อย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่3 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Kanamycin

ที่มา : http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/glossary/kanamyc.html

2.3.5 Amikacin

Amikacin มีการใช้ครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น โดยจัดเป็นสารพวก Semisynthetic Aminoglycoside โดยที่จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะพวก Bacilli โดยที่โครงสร้างของ Amikacin นั้นแบบที่เป็น L-Amikacin จะสามารถทำงานได้ดีกว่าแบบที่เป็น D-Amikacin และนอกจากนี้ Amikacin ยังสามารถทำการต้านทานต่อเอนไซม์ต่างๆ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียซึ่งแตกต่างจากสารปฏิชีวนะชนิดอื่นเช่น Gentamicin และ Tobramycin แต่ Amikacin ก็ยังไม่สามารถต้านทานต่อเอนไซม์ Aminotransferase และ Acetylates

จากการศึกษาในขั้นต้นจะพบว่า Amikacin นั้นจะมีความเป็นพิษที่น้อยกว่า Kanamycin และ Gentamicin อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้วการใช้ Amikacin ในปริมาณมากนั้นมักจะใช้เพื่อเป็นการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียแกรมลบพวก Bacilli นั้น Amikacin จะเป็นสารปฏิชีวนะที่ได้รับความนิยมในการใช้มากกว่าสารปฏิชีวนะพวก Aminoglycoside อื่น ๆ

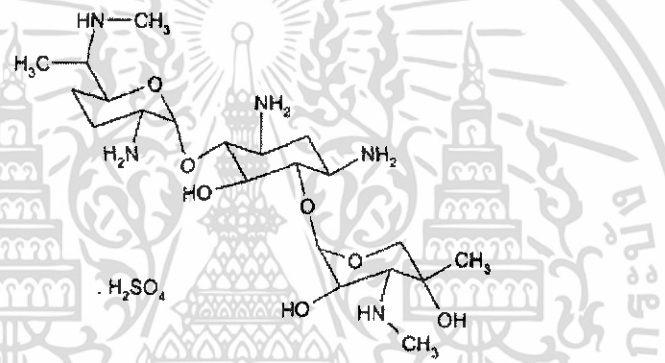
2.3.6 Gentamicin

Gentamicin ทำการคัดแยกได้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1958 ซึ่งได้มีการผลิตเป็นการค้าโดยจะใช้แบคทีเรียพวก *Micromonospora purpurea* และ Gentamicin จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียพวก *Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียแกรมลบพวก Bacilli ได้ดีเป็นพิเศษ Gentamicin จะนิยมใช้ในการรักษาในอาการติดเชื้อทางผิวหนังต่างๆ โดยจะใช้ในลักษณะที่เป็นครีมหรือยาขี้ผึ้ง แต่อย่างไรก็ตาม Gentamicin นั้นยังมีความสามารถที่จำกัดเมื่อเทียบกับ Neomycin ในการใช้ในการรักษายกเว้นการรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยที่เราจะนิยมใช้ Gentamicin ในการรักษาอาการติดเชื้อที่เกิดในแผลต่างๆ และถ้าหากมีการติดเชื้อในกรณีที่ร้ายแรงนั้นเราจะทำการให้ Gentamicin ในรูปของเหลวโดยทำการผสม Gentamicin 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการรักษาการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Pseudomonas*, *Enterobacter* และ *Serratia* species สาเหตุที่นิยมใช้ Gentamicin เนื่องมาจากว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถทำการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะชนิดก่อนๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่หลากหลายชนิด (Broad Spectrum)

Gentamicin นั้นจะลักษณะเป็นผงสีขาวจนถึงผงสีเหลือง สามารถละลายได้ดีในน้ำแต่จะไม่สามารถละลายได้เลยในแอลกอฮอล์และเบนซีน และจะมีความเสถียรที่พีเอชที่กว้างและสามารถนำไปเข้าเครื่อง Autoclave ได้



รูปที่4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Gentamycin

ที่มา : http://www.axxora.com/antibiotics-LKT-G1658/opfa.1.1.LKT-G1658.450.4.1.html

2.3.7 Tobramycin sulfate

มีการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 สามารถทำการผลิตได้จาก *Streptomyces tenebrarius* คุณสมบัติที่สำคัญของ Tobramycin คือ จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* จุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะพวก Gentamicin ได้จะไม่สามารถต้านทานต่อ Tobramycin ได้ โครงสร้างของ Tobramycin นั้นจะมีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ Kanamycin B

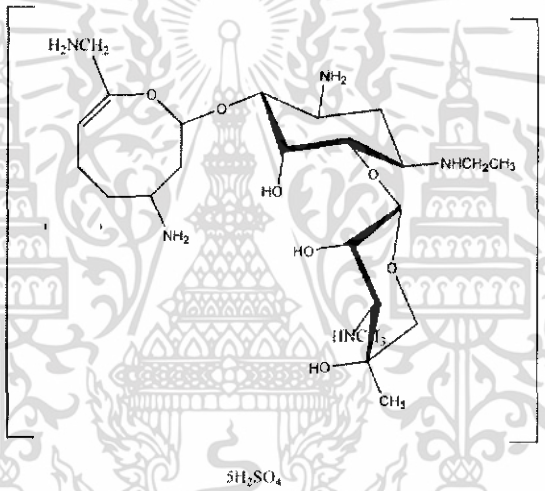
2.3.8 Netilmicin

Netilmicin นั้นสามารถทำการผลิตได้จากการนำเอา Sisomicin มาทำการเกิดปฏิกิริยา Reductive Ethylation ซึ่งจะเป็นสารปฏิชีวนะพวก Aminoglycoside โดยที่ Sisomicin นั้นสามารถทำการผลิตได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

แบคทีเรียพวก *Micromonospora inoyensis* โดยที่โครงสร้างของ Netilmicin และ Sisomicin นั้นจะมีความคล้ายคลึงกับ Gentamicin B และจากการทดสอบจะพบว่า Netilmicin นั้นสามารถยับยั้งต่อจุลินทรีย์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะพวก Gentamicin บางตัว เช่น *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* และ *Citrobacter* และนอกจากนั้นยังสามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* , *Proteus* บางสายพันธุ์ได้ด้วย และยังมีจุลินทรีย์บางชนิดที่ถูกยับยั้งได้โดย Sisomocin โดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นจุลินทรีย์พวกที่ถูกยับยั้งได้โดย Gentamicin และกิจกรรมของ Netilmicin นั้นจะถูกยับยั้งได้โดยเอนไซม์พวก Adenylyate และ Phosphorylate แต่ Gentamicin และ Sisomicin นั้นจะไม่ถูกยับยั้งได้โดยเอนไซม์เหล่านี้โดยที่จะสังเกตได้จากที่โมเลกุลของ 1-Ethyl Group ใน Sisomicin นั้นจะไปทำการลดความจำเพาะของเอนไซม์เหล่านั้น



รูปที่5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Netilmicin

ที่มา : http://www.axxora.com/antibiotics-ALX-380-048/opfa.1.1.ALX-380-048.450.4.1.html

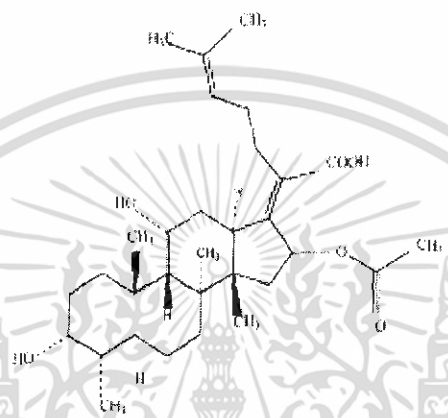
2.3.9 Spectinomycin

เป็นสารปฏิชีวนะพวก Aminocyclitol ทำการคัดแยกได้จากแบคทีเรียพวก *Streptomyces spectabilis* โดยที่ส่วนใหญ่แล้วจะเรียกว่า Actinospectocin โครงสร้างที่แน่นอนนั้นทำการพิสูจน์ออกมาโดย x-ray crystallography โดยที่จะอยู่ในรูปผลึกสีขาวซึ่งจะมีความเสถียรอย่างมากในสภาวะที่แห้งและสามารถละลายได้ดีในน้ำ สารละลายของ Spectinomycin เมื่อทำการเตรียมแล้วควรที่จะทำการใช้ภายในเวลายี่สิบสี่ชั่วโมงเนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ได้อย่างช้าๆ และในการใช้นั้นควรที่จะฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อของผู้ป่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

67312

Spectinomycin นั้นเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถออกฤทธิ์ได้กับจุลินทรีย์หลายชนิด (Broad spectrum) โดยที่จะมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยที่ Spectinomycin นั้นจะออกฤทธิ์โดยการไปจับกับ tRNA กับไรโบโซม ในขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีน แต่จะไม่มีผลต่อการอ่านลำดับเบส แต่ Spectinomycin นั้นจะได้รับความนิยมน้อยกว่าสารปฏิชีวนะอื่นๆ เนื่องจากเป็นสารที่มีราคาสูงแต่จะได้รับความนิยมในการนำไปรักษาในผู้ป่วยโรคหนองใน เนื่องจากผู้ป่วยบางรายจะแพ้ต่อยา Penicillin



รูปที่6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Spectinomycin

ที่มา : http://www.pharmainformatic.com/assets/images/FusidicAcid.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ไอโซเลตของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่นำมาทดสอบ

3.1.1 KB 10-28

3.1.2 KB 11-2-11

3.1.3 KB 11-2-9

3.1.4 KB 11-2-4

3.1.5 KB 10-6

3.1.6 RB 5-22

3.1.7 *Micromonospora* sp. LK7-1

หมายเหตุ KB = Kanchanaburi Province, RB = Ratchaburi Province

3.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์ของสิ่งสกัดหยาบ

3.2.1 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.2.3 *Candida albicans* ATCC 10231

3.2.4 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.2.5 *Micrococcus luteus* ATCC 9341

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ

3.3.2 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.3.3 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.4 ปากคีบ (Forcep)

3.3.4 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.3.5 ไม้พันสำลี

3.3.6 ทิป (Tips)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 กระดาษกรอง Whatman No.1

3.3.9 แผ่นทดสอบ (Paper disc : Macherey - nagael ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร)

3.3.10 แผ่นSilica gel GF_{254} เคลือบทับบนแผ่นอลูมิเนียม

3.3.11 คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี (Sephadex Column)

3.4 เครื่องมือ

3.4.1 เครื่องเขย่า (Incubator Shaker : บริษัท ไทยโพลีเมดิค จำกัด, GALLENKAMP)

3.4.2 เครื่องวัดpH (pH-meter : Eutech, pH150)

3.4.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave : HIRAYAMA, HA-300 MIV)

3.4.4 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow : บริษัท ซายน์เทค จำกัด, ABS 1200)

3.4.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (SARTORIUS, A200S)

3.4.6 เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Evaporator : บริษัท แล็บโฟกัสจำกัด, LABOROTA 4001)

3.4.7 ตู้บ่ม 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส (Incubator : MEMMERT, BE 600)

3.4.8 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven : WTC BINDER, FD53)

3.4.9 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR 400 MHz : Bruker AVANCE DPX-300 FT-NMR spectrometer)

3.5 สารเคมี

3.5.1 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

3.5.2 สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)

3.5.3 กลูโคส (Glucose)

3.5.4 แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium Carbonate; $CaCO_3$)

3.5.5 วุ้น (Agar)

3.5.6 Mueller-Hinton Agar (MHA)

3.5.7 Sabouraud's Dextrose Agar (SDA)

3.5.8 สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)

3.5.9 เปปโตน (Peptone)

3.5.10 เอทิลอะซีเตต (Ethylacetate; $C_4H_8O_2$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.11 เมทานอล (Methanol; CH_3OH)

3.5.12 เฮกเซน (Hexane; C_6H_{14})

3.5.13 เอ็น-บิวทานอล (n-Butanol; C_4H_9OH)

3.5.14 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; NaOH)

3.5.15 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride; NaCl)

3.5.16 ไดคลอโรมีเทน (Dicholoromethane; CH_2Cl_2)

3.5.17 แบเรียมคลอไรด์ (Barium Chloride; $BaCl_2$)

3.5.18 กรดซัลฟิวริค (Sulfuric acid; H_2SO_4)

3.5.19 แอมพิซิลิน (Ampicillin)

3.5.20 นิสเตติน (Nystatin)

3.6 วิธีการทดลอง

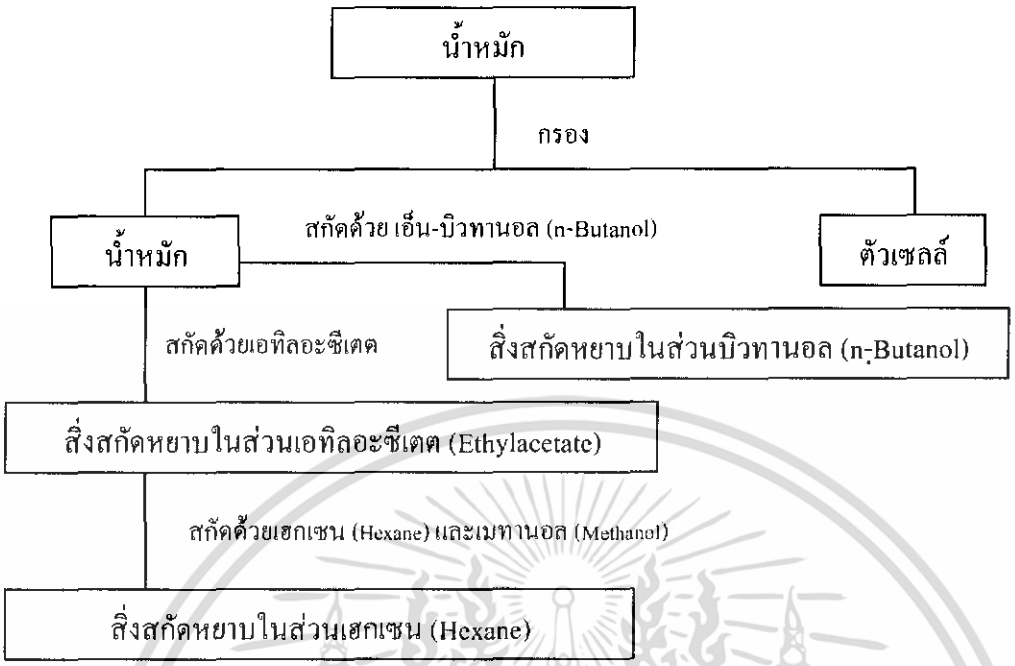
3.6.1 เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นทั้งหมด 7 ไอโซเลต คือ KB 10-28, KB 11-2-11, KB 11-2-4, KB 11-2-9, KB 10-6, RB 2-25 และ *Micromonospora* sp. LK7-1

3.6.2 การสกัดสิ่งสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Yeast extract-Malt extract broth; พีเอช 7.3 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกส่วนน้ำใส จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการสกัดตามรูปที่ 7 และนำสิ่งสกัดที่ได้ในแต่ละส่วนมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี อาร์กาดิสฟิวชั่น (Agar Disc Diffusion Method) (หัวข้อ 3.6.5.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่7 แสดงขั้นตอนการสกัดน้ำหมักเชื้อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ

3.6.3 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลตที่คัดเลือก

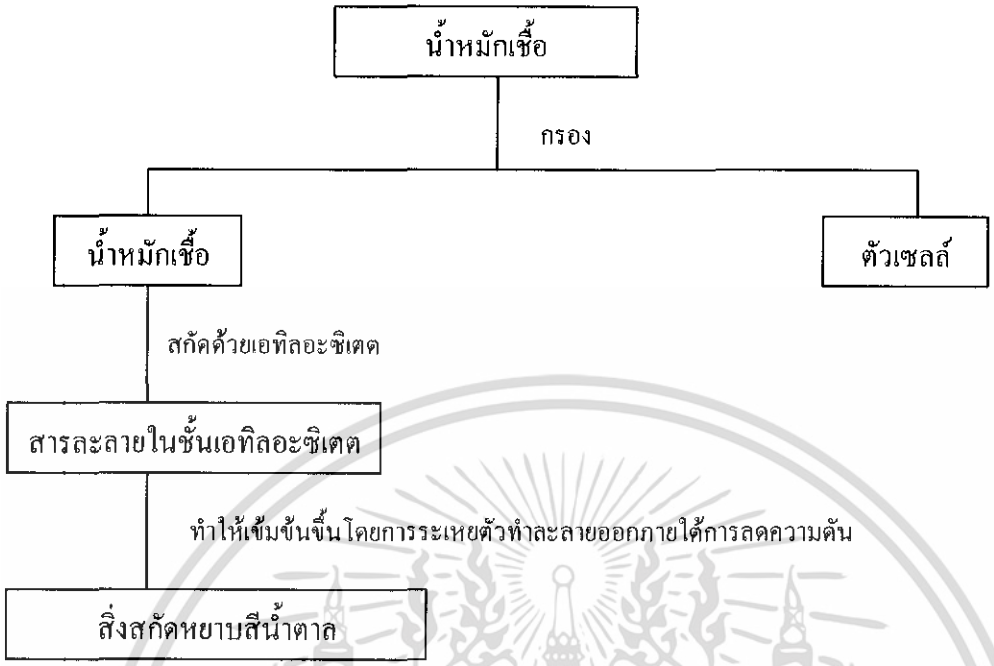
3.6.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ (Seed medium)

เขี่ยเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จำนวนหนึ่งลูปถ่ายลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Seed medium; 0.4% กลูโคส (Glucose), 0.4 % สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract), 1.0 % สารสกัดจากมอลต์ (malt extract),พีเอช 7.3) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

3.6.3.2 การหมักและการสกัดสิ่งสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ

ทำการถ่ายเชื้อที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.6.3.1 ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีอาหารสำหรับการหมักปริมาณ 200 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 0.4 % กลูโคส (Glucose), 0.4 % สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract), 1.0 % สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) และ 0.1 % แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$), พีเอช 7.3 บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการสกัดกับเอทิลอะซีเตต 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดันจะได้สิ่งสกัดหยาบในส่วนเอทิลอะซีเตต (Crude Ethylacetate Extract) นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นและนำมาสกัดแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดย Bioautographic Method ควบคู่กันไป (bioassay – guided fractionation) ดังแสดงในรูปที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



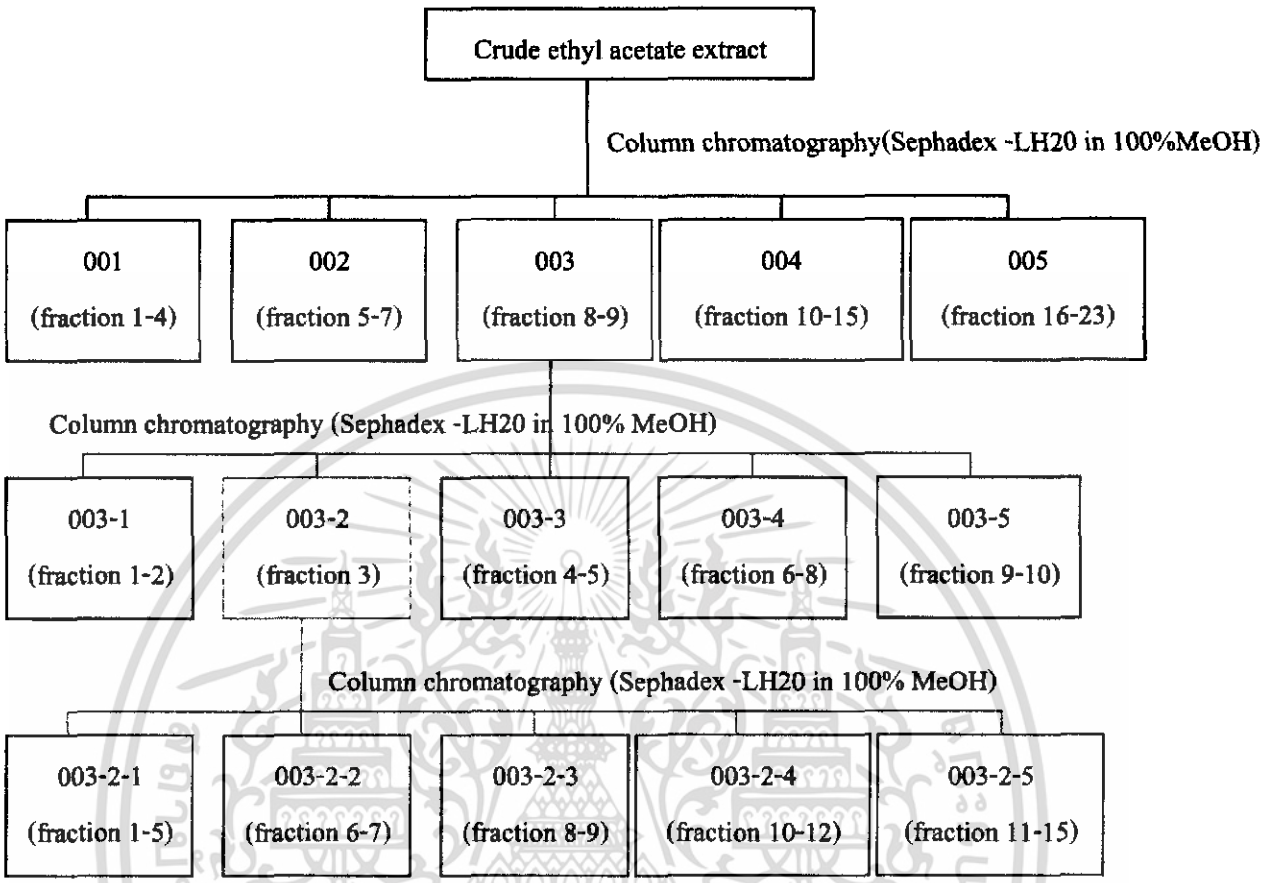
รูปที่8 แสดงขั้นตอนการสกัดน้ำหมักเชื้อ

สารสกัดจากเอทิลอะซีเตตของแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดเลือก จะนำไปทำการทดสอบการต่อต้านจุลินทรีย์โดยใช้วิธีที่อธิบายในหัวข้อที่ 3.6.5.2 โดยที่สิ่งสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จะมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมต่างๆของเชื้อจุลินทรีย์ตัวอื่น

3.6.3.3 การแยกสิ่งสกัดหยาบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

นำสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลตที่คัดเลือกมาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี (Column chromatography) โดยใช้เซฟาเด็กซ์ แอลเอช - 20 (Sephadex LH-20) เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) และใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) ดังแสดงในรูปที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่9 แสดงขั้นตอนการแยกสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี

3.6.4 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้น

นำสารที่แยกได้มาพิสูจน์โครงสร้างเบื้องต้นโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี และเทคนิคทางสเปคโตรสโคปี ที่จะนำมาใช้ในการศึกษา ได้แก่

3.6.4.1 Analytical thin-layer chromatography

เทคนิคที่ใช้	:	การเคลื่อนที่ทางเดียว
ตัวดูดซับ	:	ซิลิกาเจล จีเอฟ254 (Silica gel GF_{254}) เคลือบทับบนแผ่นอลูมิเนียม
ความหนาของแผ่น TLC	:	250 ไมโครเมตร
ระยะทาง	:	5 เซนติเมตร
อุณหภูมิ	:	อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบ : 1. ตรวจสอบที่แสงตามปกติ

2. ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร

3. ทำการพ่นแผ่น TLC ด้วย Anisaldehyde reagent และนำไปให้ความร้อนจนกระทั่งเกิดสีของสาร

3.6.4.2 Gel filtration chromatography

ตัวดูดซับ : เซฟาเด็กซ์ แอลเฮช - 20 (Sephadex LH-20) (Amersham Biosciences)

วิธีการใส่ตัวดูดซับลงในคอลัมน์ : นำ เซฟาเด็กซ์ แอลเฮช - 20 (Sephadex LH-20) แช่ในตัวทำละลาย โดยแช่ค้างคืนก่อนทำการใช้ แล้วจากนั้นจึงเทลงไปในคอลัมน์ แล้วทิ้งไว้ให้ผิวหน้าของตัวดูดซับเรียบสนิท

การใส่ตัวอย่าง : ตัวอย่างจะถูกละลายแล้วจากนั้นใส่ลงไปในคอลัมน์ทางด้านบน

การตรวจสอบ : ส่วน (fraction) ต่างๆ จะทำการตรวจสอบโดย TLC ตามที่อธิบายไว้ข้างต้น

3.6.4.3 สเปคโตรสโคปี (Spectroscopy)

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

คลื่นในช่วงของโปรตอนจะทำการตรวจสอบโดยเครื่อง Bruker AVANCE DPX-300 FT-NMR spectrometer โดยจะทำงานที่ 400 MHz และจะมีคลอโรฟอร์ม ($CDCl_3$) และ อะซิโตน d-5) เป็นตัวทำละลายอ้างอิงสำหรับสารบริสุทธิ์

3.6.5 .การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.6.5.1 การตรวจสอบสารโดย Bioautographic Method (กุสุมา, 2543)

นำสิ่งสกัดที่ได้จากชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์มาละลายด้วยเอทิลอะซีเตตให้มีความเข้มข้นของสาร 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร หยดสารลงบน TLC plateใช้ siliga gel60 F_{254} precoadted บนแผ่นอลูมิเนียมเป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (Dichloromethane :Methanol) ในอัตราส่วน 9:1 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 245 และ 365เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อของ Mueller-Hinton agar (MHA) และ Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) สำหรับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ตามลำดับทา (swab)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อทดสอบทั้ง 5 ชนิดไว้แล้ว นำแผ่น TLC ที่ผ่านการdeveloped ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) วางทาบลงบนผิวหน้าของจานอาหาร สังเกตผลโดยดูวงใสที่เกิดขึ้นบริเวณ จุด (spot) ต่างๆ

3.6.5.2 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Agar Disc Diffusion (Lorian, 1980)โดยอาศัยหลักการแพร่ของสิ่งสกัดออกมาโดยรอบแผ่นทดสอบ (disc) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นเป็นส่วนประกอบโดยบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ขึ้นอยู่กับฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสารสกัด เชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยมีวิธีการ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ normal salt saline (NSS) แล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ 1 * 10^8 CFU/mL ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากนั้นนำแผ่นทดสอบ (disc) ที่หยดสารละลายของสิ่งสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 ไมโครลิตร/แผ่นทดสอบ ซึ่งทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่ และทำแผ่นทดสอบควบคุม โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสิ่งสกัดเป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) และใช้สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แนะนำจาก NCCLS (National Committee on Clinical Laboratory Standard) เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน สำหรับเชื้อยีสต์และแบคทีเรียตามลำดับ ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ (inhibition zone) เปรียบเทียบกับ แผ่นทดสอบควบคุม (negative และ positive) ซึ่งแสดงความสามารถของสิ่งสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่นำมาใช้ในการทดลองแยกได้จากตัวอย่างดินในบริเวณจังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรีด้วยอาหาร Humic acid-Vitamin agar บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี Cross-streak บนอาหาร Yeast extract–Malt extract โดยที่เชื้อที่ใช้ในการทดลองคือ

4.1.1 KB 11-2-11

4.1.2 KB 11-2-9

4.1.3 KB 11-2-4

4.1.4 KB 10-6

4.1.5 KB 10-28

4.1.6 RB 2-25

4.1.7 *Micromonospora* sp. LK 7-1

4.2 ลักษณะทางฟีโนไทป์และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่คัดเลือก

4.2.1 KB 11-2-11

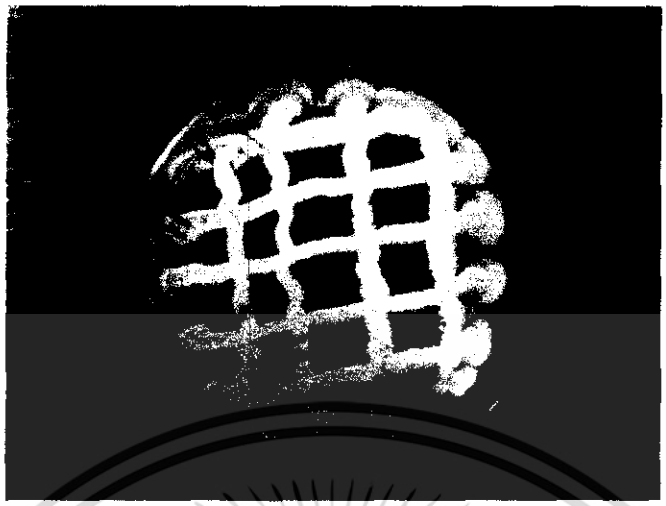
4.2.1.1 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Yeast extract – Malt extract

ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 11-2-11 เจริญบนอาหาร YM agar สามารถสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีขาวและสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีขาวไม่พบรงควัตถุที่ละลายน้ำได้แพร่ซึมในอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 10

ตารางที่3 แสดงคุณสมบัติทางการเจริญของไอโซเลต KB 11-2-11 บนอาหาร YM

ไอโซเลต	การเจริญ	สีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านล่าง	รงควัตถุ
KB 11-2-11	ดี	ขาว	ขาว	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่10 แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต KB 11-2-11

4.2.1.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 11-2-11

เชื้อไอโซเลต KB 11-2-11 สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือมากที่สุด 7%, พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5-8 และ 20-37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ, สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้ รวมทั้งสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไทรต์ได้ ดังตารางที่ 4

ตารางที่4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต KB 11-2-11

ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่เจริญได้	7 %
ช่วง pH ที่สามารถเจริญได้	5-8
ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้	20-37
Skim milk coagulation	+
Skim milk peptonization	+
Gelatin liquafaction	+
Nitrate reduction	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 11-2-11

เมื่อนำน้ำหมักเชื้อมาสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้วจะได้สารสกัดหยาบในส่วนต่างๆ คือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอล และ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ดังตารางที่ 5

ตารางที่5 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-11

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง(มม.)				
	B. subtilis	*C. albican*	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*
ชั้นเฮกเซน	-	-	-	-	-
ชั้นเอทิลอะซิเตต	78.5	-	-	15	35
ชั้นบิวทานอล	-	-	-	-	-
ชุดควบคุมเชิงบวก	11	-	40	30	50
ชุดควบคุมเชิงลบ	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ชุดควบคุมเชิงบวก : ใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) และ นิสเตติน(Nystatin)

ชุดควบคุมเชิงลบ : เมทานอล (Methanol) และ เฮกเซน (Hexane)

อาหารที่ใช้เลี้ยง : Meuller Hinton Agar และSaboraud's Dextose Agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ

สภาวะที่ใช้ทดลอง : บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 KB 11-2-9

4.2.2.1 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Yeast extract – Malt extract

ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 11-2-9 เจริญได้ดีบนอาหาร YM agar สามารถสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีน้ำตาลเข้มและสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีน้ำตาลเข้ม พบรงควัตถุที่ละลายน้ำได้แพร่ซึมในอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่11

ตารางที่6 แสดงคุณสมบัติทางการเจริญเติบโตของไอโซเลต KB 11-2-9 บนอาหาร Y.M.

ไอโซเลต	การเจริญ	สีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านล่าง	รงควัตถุ
KB 11-2-9	ดี	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม	น้ำตาลเข้ม

รูปที่11 แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต KB 11-2-9

4.2.2.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 11-2-9

เชื้อไอโซเลต KB 11-2-9 สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือมากที่สุด 7%, พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5-8 และ 20-37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ, สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้รวมทั้งสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไทรต์ได้ ดังตารางที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่7 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต KB 11-2-9

ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่เจริญได้	7%
ช่วง pH ที่สามารถเจริญได้	5-8
ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้	20-37
Skim milk coagulation	+
Skim milk peptonization	+
Gelatin liquafaction	+
Nitrate reduction	+

4.2.2.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 11-2-9

เมื่อนำน้ำหมักเชื้อสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้วจะได้สารสกัดหยาบในส่วนต่างๆ คือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอล และ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ดังตารางที่ 8

ตารางที่8 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต KB11-2-9

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง(มม.)				
	B. subtilis	*C. albican*	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*
ชั้นเฮกเซน	-	-	-	-	-
ชั้นเอทิลอะซิเตต	10	-	-	-	15
ชั้นบิวทานอล	-	-	-	10	-
ชุดควบคุมเชิงบวก	10	-	32.5	20	47.5
ชุดควบคุมเชิงลบ	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ ชุดควบคุมเชิงบวก : ใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) และ นิสเตติน(Nystatin)
ชุดควบคุมเชิงลบ : เมทานอล (Methanol) และ เฮกเซน (Hexane)
อาหารที่ใช้เลี้ยง : Meuller Hinton Agar และSaboraud's Dextose Agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ
สภาวะที่ใช้ทดลอง : บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส

4.2.3 KB 11-2-4

4.2.3.1 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Yeast extract – Malt extract

ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 11-2-4 ที่เจริญบนอาหาร YM agar พบว่าสามารถสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีขาวและสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีขาว พบรงควัตถุที่ละลายน้ำได้แพร่ซึมในอาหารดังแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 12

ตารางที่9 แสดงคุณสมบัติทางการเจริญเติบโตของไอโซเลต KB 11-2-4 บนอาหาร YM

ไอโซเลต	การเจริญ	สีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านล่าง	รงควัตถุ
KB 11-2-4	ดี	ขาว	ขาว	เขียวเข้ม

รูปที่12 แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต KB 11-2-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 11-2-4

เชื้อไอโซเลต KB 11-2-4 สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือมากที่สุด 7%, พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5-8 และ 20-37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ, สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้ รวมทั้งไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไทรต์ได้ ดังตารางที่ 10

ตารางที่10 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต KB 11-2-4

ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่เจริญได้	7%
ช่วง pH ที่สามารถเจริญได้	5-8
ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้	20-37
Skim milk coagulation	-
Skim milk peptonization	-
Gelatin liquafaction	+
Nitrate reduction	-

4.2.3.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 11-2-4

เมื่อนำน้ำหมักเชื้อสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้วจะได้สารสกัดหยาบในส่วนต่างๆ คือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอล และ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20ไมโครลิตร ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ดังตารางที่ 11

ตารางที่11 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต KB 11-2-4

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง(มม.)				
	B. subtilis	*C. albican*	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*
ชั้นเฮกเซน	-	-	-	-	-
ชั้นเอทิลอะซิเตต	-	-	-	-	-
ชั้นบิวทานอล	-	-	-	-	-
ชุดควบคุมเชิงบวก	10	-	27.5	25	50
ชุดควบคุมเชิงลบ	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ ชุดควบคุมเชิงบวก : ใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) และ นิสเตติน(Nystatin)
ชุดควบคุมเชิงลบ : เมทานอล (Methanol) และ เฮกเซน (Hexane)
อาหารที่ใช้เลี้ยง : Meuller Hinton Agar และSaboraud's Dextose Agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ
สภาวะที่ใช้ทดลอง : บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส

4.2.4 KB 10-6

4.2.4.1 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Yeast extract – Malt extract

ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 10-6 เจริญบนอาหาร YM agar สามารถสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีขาวและสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีขาวไม่พบรงควัตถุที่ละลายน้ำได้แพร่ซึมในอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 12 และภาพที่ 13

ตารางที่12 แสดงคุณสมบัติทางการเจริญเติบโตของไอโซเลต KB 10-6 บนอาหาร YM

ไอโซเลต	การเจริญ	สีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านล่าง	รงควัตถุ
KB 10-6	ดี	ขาว	ขาว	-

รูปที่13 แสดงลักษณะโคโลนีของไอโซเลต KB 10-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 10-6

เชื้อไอโซเลต KB 10-6 สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือมากที่สุด 7%, พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5-8 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ, สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้ รวมทั้งไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไทรต์ได้ ดังตารางที่ 13

ตารางที่13 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต KB 10-6

ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่เจริญได้	7 %
ช่วง pH ที่สามารถเจริญได้	5-8
ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้	37
Skim milk coagulation	+
Skim milk peptonization	+
Gelatin liquafaction	+
Nitrate reduction	-

4.2.4.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 10-6

เมื่อนำน้ำหมักเชื้อสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้วจะได้สารสกัดหยาบในส่วนต่างๆ คือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอล และ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ คือ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ดังตารางที่ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่14 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต KB 10-6

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง(มม.)				
	B. subtilis	*C. albican*	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*
ชั้นเฮกเซน	-	-	-	-	-
ชั้นเอทิลอะซิเตต	-	-	-	-	27.5
ชั้นบิวทานอล	-	-	-	-	-
ชุดควบคุมเชิงบวก	10	-	31.5	20	37.5
ชุดควบคุมเชิงลบ	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ชุดควบคุมเชิงบวก : ใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) และ นิสเตติน(Nystatin)

ชุดควบคุมเชิงลบ : เมทานอล (Methanol) และ เฮกเซน (Hexane)

อาหารที่ใช้เลี้ยง : Meuller Hinton Agar และSaboraud's Dextose Agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ

สภาวะที่ใช้ทดลอง : บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส

4.2.5 KB 10-28

4.2.5.1 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Yeast extract – Malt extract

ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 10-28 ที่เจริญได้ดีบนอาหาร YM agar พบว่าสามารถสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีขาวและสร้างเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) สีขาว ไม่พบรงควัตถุที่ละลายน้ำได้แพร่ซึมในอาหารดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่15 แสดงคุณสมบัติทางการเจริญเติบโตของไอโซเลต KB 10-28 บนอาหาร YM

ไอโซเลต	การเจริญ	สีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านล่าง	รงควัตถุ
KB 10-28	ดี	ขาว	ขาว	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.5.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 10-28

เชื้อไอโซเลต KB 10-28 สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือมากที่สุด 7%, พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6-8 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ, ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้รวมทั้งไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไทรต์ได้ดังตารางที่ 16

ตารางที่16 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต KB 10-28

ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่เจริญได้	7%
ช่วง pH ที่สามารถเจริญได้	6-8
ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้	37
Skim milk coagulation	-
Skim milk peptonization	-
Gelatin liquafaction	-
Nitrate reduction	-

4.2.5.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต KB 10-28

เมื่อนำน้ำหมักเชื้อสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้วจะได้สารสกัดหยาบในส่วนต่างๆ คือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอล และ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคือ *B. subtilis* ATCC 6633 ดังตารางที่ 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่17 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต KB 10-28

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง(มม.)				
	B. subtilis	*C. albican*	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*
ชั้นเฮกเซน	-	-	-	-	-
ชั้นเอทิลอะซิเตต	15	-	-	-	-
ชั้นบิวทานอล	-	-	-	-	-
ชุดควบคุมเชิงบวก	10	-	35	27	42.5
ชุดควบคุมเชิงลบ	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ชุดควบคุมเชิงบวก : ใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) และ นิสเตติน(Nystatin)

ชุดควบคุมเชิงลบ : เมทานอล (Methanol) และ เฮกเซน (Hexane)

อาหารที่ใช้เลี้ยง : Meuller hinton agar และSaboraud's dextose agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ

สภาวะที่ใช้ทดลอง : บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส

4.2.6 RB 5-22

4.2.6.1 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Yeast extract – Malt extract

ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต NRB 5-22 ที่เจริญได้ดีบนอาหาร YM agar พบว่าสามารถสร้างเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) สีขาวและสร้างเส้นใยอากาศ(Aerial mycelium) สีขาว พบรงควัตถุที่ละลายน้ำได้แพร่ซึมในอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่18 แสดงคุณสมบัติทางการเจริญของไอโซเลต RB 5-22 บนอาหาร YM

ไอโซเลต	การเจริญ	สีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านล่าง	รงควัตถุ
RB 5-22	ดี	ขาว	ขาว	สีมะกอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.6.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต RB 5-22

เชื้อไอโซเลต RB 5-22 สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือมากที่สุด 4%, พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6-8 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ, สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้รวมทั้งสามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไทรต์ได้ ดังตารางที่ 19

ตารางที่19 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต RB 5-22

ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่เจริญได้	4%
ช่วง pH ที่สามารถเจริญได้	6-8
ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้	37
Skim milk coagulation	+
Skim milk peptonization	+
Gelatin liquafaction	+
Nitrate reduction	+

4.2.6.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต RB 5-22

เมื่อนำน้ำหมักเชื้อสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้วจะได้สารสกัดหยาบในส่วนต่างๆ คือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอล และ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคือ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ดังตารางที่20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่20 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต RB 5-22

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง(มม.)				
	B. subtilis	*C. albican*	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*
ชั้นเฮกเซน	-	-	-	-	-
ชั้นเอทิลอะซิเตต	-	-	-	-	12.5
ชั้นบิวทานอล	-	-	-	-	-
ชุดควบคุมเชิงบวก	10	-	35	17.5	45
ชุดควบคุมเชิงลบ	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ชุดควบคุมเชิงบวก : ใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) และ นิสเตติน(Nystatin)

ชุดควบคุมเชิงลบ : เมทานอล (Methanol) และ เฮกเซน (Hexane)

อาหารที่ใช้เลี้ยง : Meuller Hinton Agar และSaboraud's Dextose Agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ

สภาวะที่ใช้ทดลอง : บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส

4.2.7 *Micromonospora* sp. LK 7-1

4.2.7.1 ลักษณะการเจริญบนอาหาร Yeast extract – Malt extract

ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต LK 7-1 ที่เจริญได้ดีบนอาหาร YM agar พบว่าสามารถสร้างเส้นใยอาหาร(Substrate mycelium)สีขาวและสร้างเส้นใยอากาศ(Aerial mycelium) สีส้มไม่พบรงค์วัตถุที่ละลายน้ำได้แพร่ซึมในอาหารดังแสดงในตารางที่21

ตารางที่21 แสดงคุณสมบัติทางการเจริญของไอโซเลต LK 7-1 บนอาหาร YM

ไอโซเลต	การเจริญ	สีของโคโลนีด้านบน	สีของโคโลนีด้านล่าง	รงควัตถุ
LK 7-1	ดี	ส้ม	ขาว	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.7.2 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต LK 7-1

เชื้อไอโซเลต LK 7-1สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือมากที่สุด 4%, พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5-9 และ 20-40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ, สามารถย่อยสลายโปรตีนในนมและเจลาตินได้รวมทั้งไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไทรต์ได้ดังตารางที่ 22

ตารางที่22 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลต LK 7-1

ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่เจริญได้	4 %
ช่วง pH ที่สามารถเจริญได้	5-9
ช่วงอุณหภูมิที่สามารถละลายได้	20-40
Skim milk coagulation	+
Skim milk peptonization	+
Gelatin liquafaction	+
Nitrate reduction	-

4.2.6.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลต LK 7-1

เมื่อนำน้ำหมักเชื้อสกัดโดยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้วจะได้สารสกัดหยาบในส่วนต่างๆ คือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน, สารสกัดหยาบในชั้นบิวทานอล และ สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคือ *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 ดังตารางที่ 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่23 แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากสิ่งสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต LK 7-1

สิ่งสกัดหยาบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง(มม)				
	B. subtilis	*C. albican*	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*
ชั้นเฮกเซน	-	-	-	-	-
ชั้นเอทิลอะซิเตต	14	-	7	27	10
ชั้นบิวทานอล	-	-	-	-	-
ชุดควบคุมเชิงบวก	8	-	32.5	20	37.5
ชุดควบคุมเชิงลบ	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ชุดควบคุมเชิงบวก : ใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) และ นิสเตติน(Nystatin)
ชุดควบคุมเชิงลบ : เมทานอล (Methanol) และ เฮกเซน (Hexane)
อาหารที่ใช้เลี้ยง : Meuller Hinton Agar และSaboraud's Dextose Agar สำหรับเชื้อ แบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ
สภาวะที่ใช้ทดลอง : บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส

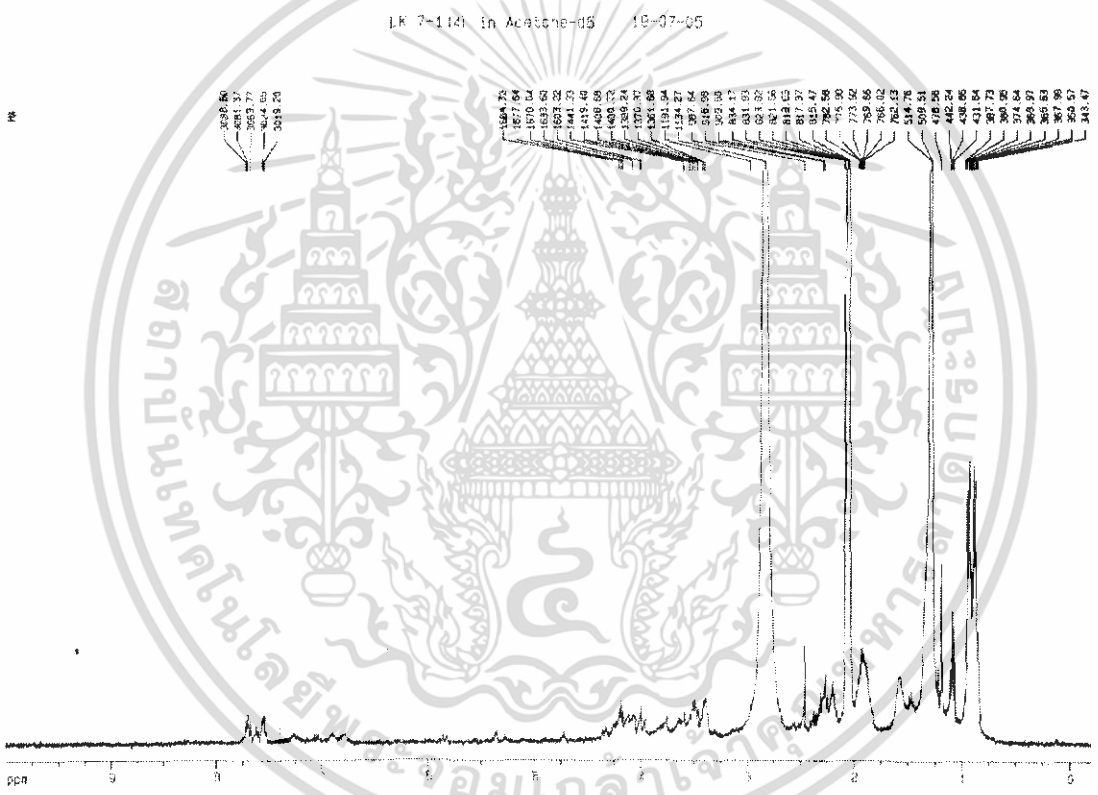
จากผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสิ่งสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ พบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด โดยที่สิ่งสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนและชั้นบิวทานอลนั้นไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ จากการทดสอบพบว่ามี 3 ไอโซเลต คือ KB 11-2-11, KB 10-28 และ *Micromonospora* sp. LK 7-1 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจเนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมากกว่าชุดควบคุมเชิงบวก(Positive control) ที่ใช้ตามคำแนะนำจาก NCCLS ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ *Micromonospora* sp. LK 7-1 มาศึกษาเพื่อแยกและศึกษาโครงสร้างสารเบื้องต้นจากสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดหยาบ ในชั้นเอทิลอะซิเตต เนื่องจากเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทส์หายากและแสดงผลออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีคือ สามารถทำการยับยั้งเชื้อ *B.subtilis* และ *M.luteus* ได้ดีกว่าชุดควบคุมเชิงบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การแยกสิ่งสกัดหยาบด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี

เมื่อทำการสกัดน้ำหมักเชื้อ *Micromonospora* sp. LK 7-1 ปริมาณ 20 ลิตร ด้วยเอทิลอะซิเตตได้สิ่งสกัดหยาบปริมาณ 1.88 กรัม และนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีโดยใช้ Sephadex LH 20 เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) และใช้เมทานอล 100 % เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) ได้ผลดังรูปที่ 9

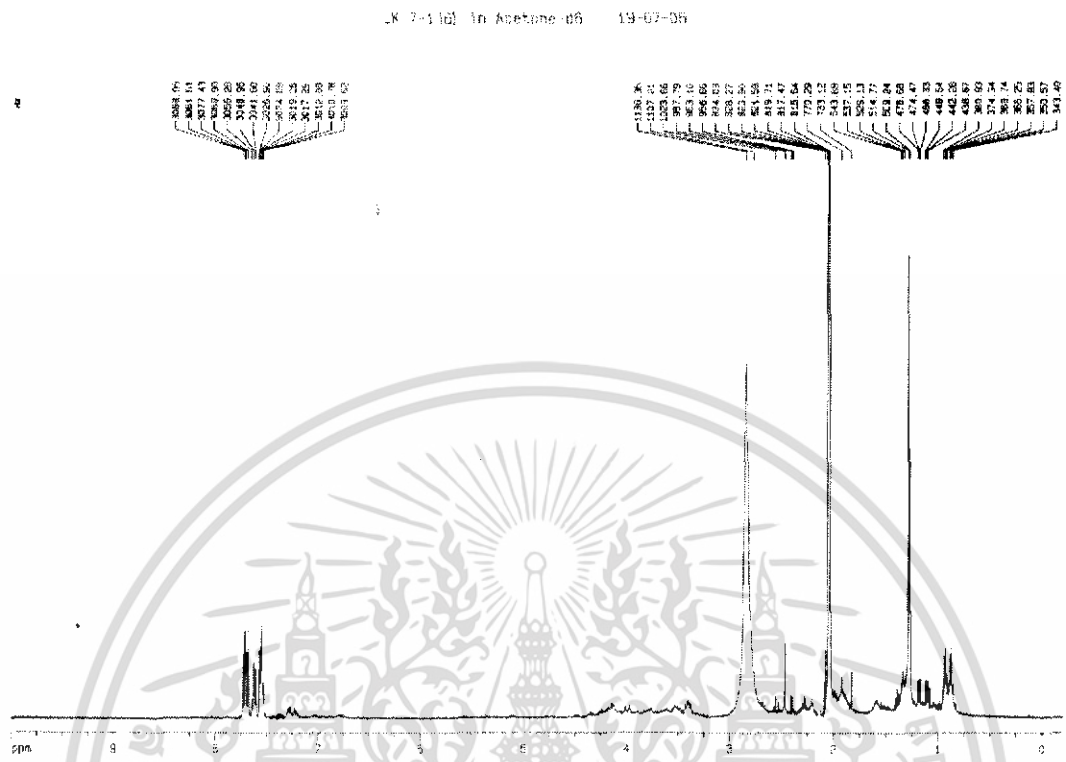
จากรูปที่ 9 นำเอา Fraction ที่ 003-2-1, 003-2-2, 003-2-3, 003-2-4 และ 003-2-5 มาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 400 MHz



รูปที่14 แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-1

จะพบได้ว่า Fraction 003-2-1 เป็น Fraction ที่ประกอบด้วยสารผสมหลายตัวซึ่งยังไม่บริสุทธิ์จึงยังไม่สามารถทำนายโครงสร้างอย่างคร่าวๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



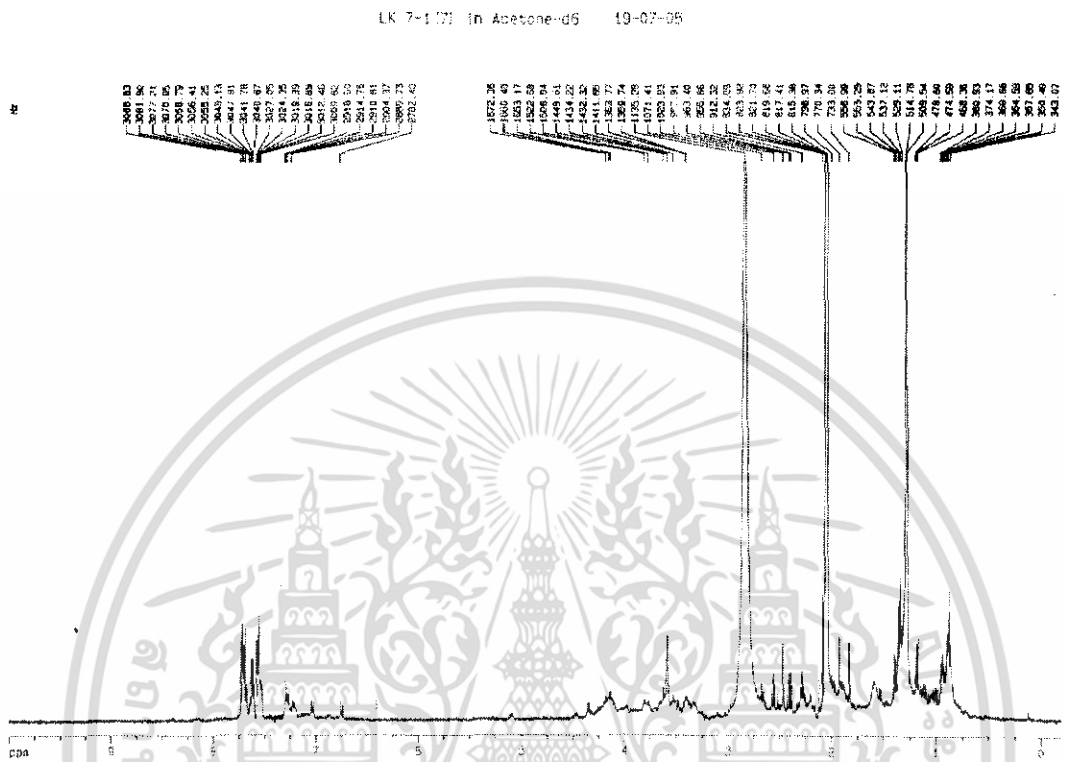
รูปที่ 15 แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-2

Fraction 003-2-2 เป็น Fraction ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์สังเกตได้จากสเปคตรัม H-NMR พบว่าสารใน Fraction นี้ประกอบด้วยหมู่เมทิลอยู่ 2 หมู่ ที่ค่า Chemical shift ที่ 1-2 ppm และแสดง Methine proton ของ Aromatic ringที่ค่า ค่าเคมมิคัลชิฟ (Chemical shift) ที่ 7-8 ppm ดังนั้นสามารถทำนายได้ว่าสารสกัดภายในFraction นี้ประกอบด้วยอะโรมาติกริง (Aromatic ring) และมีหมู่เมทิลแทนที่ (Substitute) อยู่บนอะโรมาติกริง (Aromatic ring) คาดว่าสารใน Fraction นี้จะเป็นสารในกลุ่มของแอนทราควิโนน (Anthraquinone) เนื่องจาก

1) สารสกัดในกลุ่มของแอนทราควิโนน (Anthraquinone) มีสีเหลืองเข้มซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่พบได้บ่อยในแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์สกุล *Micromonospora*

2) ใน ^{1}H-NMR สเปกตรัมแสดง Characteristic peak ของสารในกลุ่มแอนทราควิโนน (Anthraquinone)

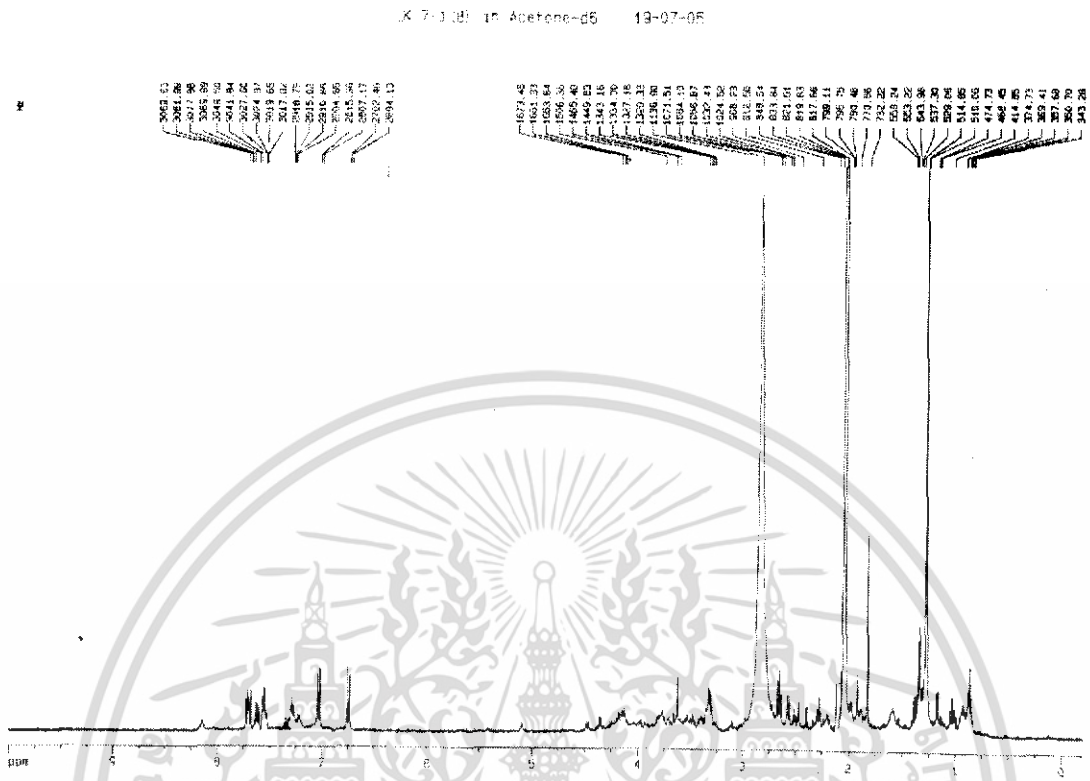
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-3

Fraction 003-2-3 นี้จาก ^{1}H-NMR spectrum พบว่า Fraction นี้ประกอบด้วยสารผสมสองชนิดสังเกตได้พีกมี 2 พีก ปรากฏขึ้นที่ค่าเคมมิคัลชิฟที่ 6-7 ppm และยังมีสารตัวเดียวกันกับ Fraction 003-2-2 ที่ค่า Chemical shift ที่ 7-8 ppm ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า Fraction นี้ประกอบด้วยสารผสมสองตัว

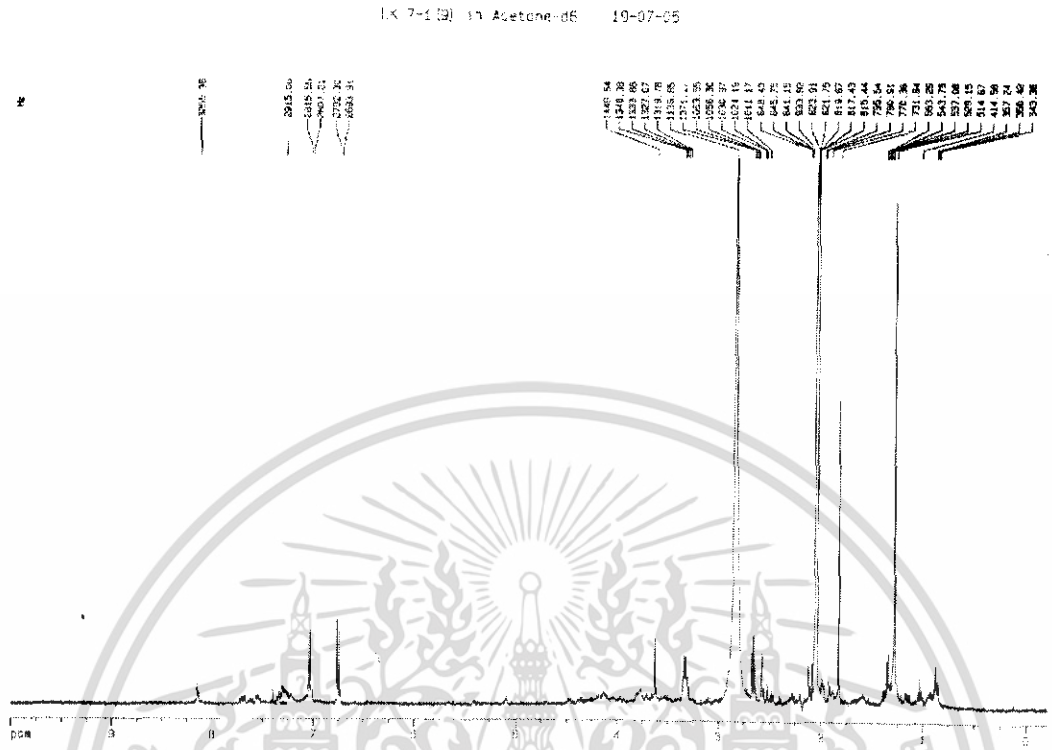
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่17 แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-4

Fraction 003-2-4 นี้จาก ^{1}H-NMR spectrum พบว่า Fraction นี้ประกอบด้วยสารผสมสองชนิดสังเกตได้พีกมี 2 พีก ปรากฏขึ้นที่ค่าเคมมิคัลชิฟที่ 6-7 ppm และยังมีสารตัวเดียวกันกับ Fraction 003-2-2 ที่ค่าเคมมิคัลชิฟที่ 7-8 ppm ซึ่งจากพีกจะเห็นได้ว่าลักษณะพีกของสารตัวแรกเริ่มที่จะมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า Fraction นี้ประกอบด้วยสารผสมสองตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 แสดงลักษณะพีกที่ได้จาก Fraction 003-2-5

Fraction 003-2-5 นี้จาก ^{1}H-NMR spectrum พบว่าประกอบด้วยสารค่อนข้างบริสุทธิ์ซึ่งเป็นสารที่ประกอบด้วยหมู่เมทิล 2 หมู่ ซึ่งแสดงในช่วงค่าเคมมิคัลชิฟที่ 1-3 ppm และแสดง Methine proton ของอะโรมาติกริง ที่ค่าเคมมิคัลชิฟที่ 6-7 ppm จากข้อมูลสามารถทำนายได้ว่าสารใน Fraction นี้เป็นสารจำพวกควิโนน (Quinone) และมีหมู่เมทิลแทนที่ในอะโรมาติกริงอยู่ 2 หมู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเมื่อทำการเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ไอโซเลตมาได้ 7 ไอโซเลต คือ KB 11-2-11, KB 11-2-9, KB 11-2-4, KB 10-6, KB 10-28, RB 5-22 และ *Micromonospora* sp. LK7-1 โดยที่เชื้อไอโซเลตส่วนใหญ่แล้วสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือสูงสุด คือ 7% ซึ่งมีเพียงสองไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือสูงสุด 4% คือ ไอโซเลต RB 5-22 และ *Micromonospora* sp.LK7-1 และเชื้อทุก ๆ ไอโซเลตมีช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็น 5-8 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ เมื่อนำมาทำการสกัดตามลำดับความเป็นขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้ เอทิลอะซิเตต, เฮกเซน และ เอ็น-บิวทานอล นำมาทำการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วย Agar Disc Diffussion Method โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 พบว่าสิ่งสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตต แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด ส่วนสิ่งสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน และบิวทานอล นั้นจะไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ จากการทดลองมีไอโซเลตที่น่าสนใจ 3 ไอโซเลต คือ OKB 11-2-11, KB 10-28 และ *Micromonospora* sp. LK 7-1 ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพดี โดยเทียบกับชุดควบคุมเชิงบวก (positive control)

ทำการเลือกเชื้อไอโซเลต *Micromonospora* sp. LK 7-1 มาเพาะเลี้ยงเพื่อทำการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี โดยใช้เซฟาเด็กซ์ แอลเฮช - 20 เป็นเฟสคงที่ และใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ได้สารเกือบบริสุทธิ์ 2 ชนิด เมื่อนำสารที่ทำการแยกได้มาศึกษาโครงสร้างทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อ *Micromonospora* sp. LK 7-1 น่าจะประกอบด้วยสารประกอบหลัก 2 ตัว ซึ่งคาดเดาได้ว่าเป็นสารในกลุ่มแอนทราคิวโนน(Anthraquinone) และสารในกลุ่มคิวโนน (Quinone)

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ทั้ง 7 ไอโซเลตแล้วพบว่ามี 3 ไอโซเลตที่น่าสนใจ คือ KB 11-2-11, KB 10-28 และ *Micromonospora* sp. LK7-1 ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพน่าสนใจแต่เนื่องจากการทดลองมีเวลาไม่เพียงพอในการนำมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ ดังนั้นถ้ามีเวลาในการศึกษาเพียงพอเราควรนำไอโซเลตที่มีความน่าสนใจไปทำการศึกษาต่อในขั้นต่อไป เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาถึงโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของไอโซเลตที่ทำการศึกษา และสามารถนำไปพัฒนาต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กุสุมา แจ่มดี. 2543. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทส์ที่สร้างสารปฏิชีวนะจากดินในป่าชายเลน. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีวอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. ครั้งที่4. กรุงเทพ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาลิน จุลศิริ. 2540. ยาต้านจุลชีพ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยมหิดล.

สายสมร ลำยอง. 2524. สารปฏิชีวนะและปฏิกิริยาการต่อต้านจุลินทรีย์. เชียงใหม่ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมใจ ศิริโภค. 2545. จุลชีววิทยาอุสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินวิโรฒ.

Alcamo, E. 1994. Foundamentals of Microbiology. 4th compiler. USA : The Benjamin/Cummings. Publishing Company, Inc.

Atlas, R. 1997. Handbook of Microbiological Media, L. C. Parks, editor. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press.

Axxora. 2005. Gentamycin. [Online]. Available : http://www.axxora.com/antibiotics-LKT-G1658/opfa.1.1.LKT-G1658.450.4.1.html

Axxora. 2005. Netilmicin. [Online]. Available : http://www.axxora.com/antibiotics-LKT-G1658/opfa.1.1.LKT-G1658.450.4.1.html

Isaac, S. and D. Jennings. 1995. Microbial Culture. UK : Bios Scientific Publishers Limited.

Bérdy, János 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *The journal Antibiotics*. 58: 1-26

Epochem Co., Ltd. 2006. Neomycin. [Online]. Available : http://www.epochem.com/products/pharm/1405-10-3.htm

Kalakoutskii. L. V. and N. Agre. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Review*. 40(2):469-524.

Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore : The William&Wilkins.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. 2005. Kanamycin. [Online]. Available : http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/glossary /kanamyc.html

Pharama informatic. 2005. Spectinomycin. [Online]. Available : http://www.pharmainformatic.com /assets/images/FusidicAcid.jpg

Oki, T. 1994. S4-8 Recent Progress of Antibiotics Research In Application Control of Microorganisms in Asia. edited by. Komagata *et al.*, Japan : International Science and Technology Exchange Center.

RxList The Internet Drug Index. 2005. Streptomycin. [Online]. Available : http://www.rxlist.com/cgi/generic2/streptomycin.htm

Tortora, G. J., B. R. Funke. and C. L. Case. 1992. Microbiology. 4th compiler. California : The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc

Williams, S. T., M. E. Shape. and J. G. Holt. 1989. Bergey's manual and Systematic Bacteriology. Volumn 4. Baltimore : The Williams & Willkins Company.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

Yeast extract - Malt Extract Agar (YM)

- Yeast Extract	4 กรัม
- Glucose	4 กรัม
- Malt Extract	1 กรัม
- น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

Nutrient Agar (NA)

- Beef Extract	3 กรัม
- Peptone	5 กรัม
- Agar	15 กรัม
- น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

Mueller Hinton Agar

- เป็นอาหารสำเร็จรูปปริมาตรที่ใช้ 38 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Beef,infusion from	300 กรัม
Casamino Acids,Technical	17.5 กรัม
Starch	1.5 กรัม
Agar	17.0 กรัม
pH 7.3	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sabouraud's Dextrose Agar (SDA)

- เป็นอาหารสำเร็จรูปปริมาตรที่ใช้ 65 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

Enzymatic Digest of Casein	10.0 กรัม
Dextrose	40.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
pH 5.6	

หมายเหตุ ไวต่อแสง เมื่อใช้เสร็จต้องปิดฝาให้สนิท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการ swab

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) จำนวน 1 ลูป ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ10 มิลลิลิตร

2. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เชื้อผสมเข้ากันนำไปเทียบความขุ่นกับ McFarland Standard No 0.5

3. นำไม้พันสำลีมาจุ่มลงในหลอดเชื้อก่อโรค ระวังอย่าให้สำลีชุ่มมากเกินไป แล้วนำไม้พันสำลีนั้นมาทาลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทา 3 ทิศทาง

Agar Disc Diffussion Method

การวิเคราะห์ผลผลิตโดยวิธีการทางชีววิทยา Agar Disc Diffusion Method เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของสารชีวภาพโดยอาศัยหลักการแพร่ ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้อาหารวุ้นผสมเชื้อทดสอบเทลงในจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง จากนั้นจึงนำกระดาษกรองรูปวงกลม (paper disc) ดูดซับสารที่ต้องการวิเคราะห์วางลงบนอาหารวุ้น หรือเจาะรูอาหารวุ้นเป็นรูปทรงกระบอก แล้วใส่สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ลงไป สารที่ต้องการวิเคราะห์จะแพร่ออกไปตามแนวรัศมีรอบๆบริเวณที่วางแผ่นกระดาษหรือบริเวณที่เจาะรู ทำให้ยับยั้งหรือส่งเสริมการเจริญของเชื้อทดสอบได้ เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (inhibition zone) หรือบริเวณการเจริญ (growth zone) ของเชื้อทดสอบจะแปรตามปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (สมใจ, 2545)

วิธีการทำ Agar Disc Diffussion Method

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ เตรียมอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) สำหรับยีสต์และรา

2. เตรียมสารละลายแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ โดยเตรียมให้สารละลายมีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No.0.5

3. ทำการทา (swab) เชื้อจุลินทรีย์แขวนลอยที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No.0.5 ลงบนอาหารที่เตรียมไว้

4. นำสารสกัดที่ต้องการทดสอบมาทำการละลายด้วยตัวทำละลายที่สามารถละลายได้ โดยให้ความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อ 20 ไมโครลิตร เมื่อทำการละลายเรียบร้อยแล้วทำการหยดลงบนแผ่นทดสอบ (Disc)

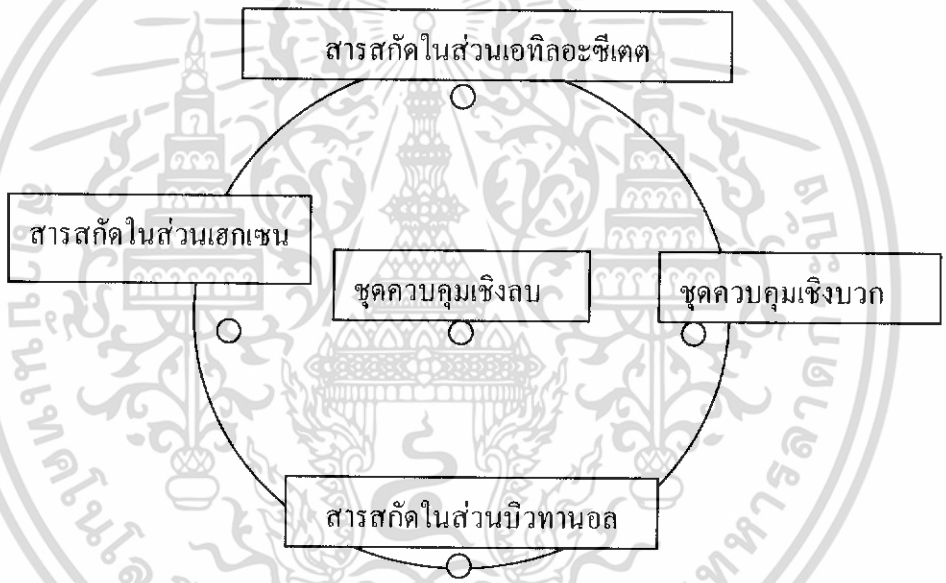
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ทำตัวควบคุม 2 ชนิด คือ ชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control) และชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) โดยชุดควบคุมเชิงลบ จะเป็นส่วนของตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารสกัด ส่วนชุดควบคุมเชิงบวก เป็นส่วนของยาปฏิชีวนะ (ชุดควบคุมเชิงบวก:แอมพิซิลิน (Ampicillin) ใช้กับแบคทีเรีย, ชุดควบคุมเชิงลบ:นิสเตติน (Nystatin) ใช้กับ ยีสต์และรา) โดยจะหยดลงแผ่นทดสอบ (disc)

6. เมื่อแผ่นทดสอบ(Disc) แห้งแล้วก็ทำการวางลงบนอาหารที่ทำการทา (swab) เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบไว้แล้ว

7. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และ 30 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อยีสต์และรา ทำการบ่มไว้ 24 ชม.

8. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น



รูป19 รูปแสดงการทดสอบฤทธิ์การต้านทานเชื้อจุลินทรีย์โดย Agar Disc Diffussion Method

การทำ McFarland standard No. 0.5

1. เตรียมสารละลายแบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$) ความเข้มข้น 0.048 โมลต่อลิตร (1.17 % w/v $BaCl_2 . H_2O$)

2. เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.18 โมลต่อลิตร (1% w/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำสารละลายแบเรียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิตร ผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 99.5 มิลลิตร

4. นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดความยาวคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.008-0.1

การทำ Bioautographic method

1. นำสิ่งสกัดหยาบที่ได้จากชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์มาละลายด้วยเอทิลอะซีเตต ให้มีความเข้มข้นของสาร 1 มิลลิกรัมต่อ 20ไมโครลิตร

2. หยดสารลงบนแผ่น TLC ใช้ siliga gel 60 F_{254} Precoated บนแผ่นอะลูมิเนียมเป็นตัวดูดซับ (Stationary phase) และใช้ ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (CH_2Cl_2 :CH_3OH) ในอัตราส่วน 9:1 ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase)

3. ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV ที่มีความยาวคลื่น 245 และ 365

4. เตรียมอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud's dextrose (SDA) สำหรับยีสต์และรา

5. นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทา (Swab) ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* , *Candida albicans* , *Bacillus subtilis* และ *Micrococcus luteus*

6. นำแผ่น TLC ที่ผ่านการ developed ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) วางลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

7. สังเกตผลโดยวัดดูบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบริเวณ spot ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

Escherichia coli

รูปร่างเป็นท่อนตรง เจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจน และไร้ออกซิเจนปกติเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบมากในลำไส้ของคนและสัตว์ แต่มีเชื้อ E. coli บางซีโรไทป์ (serotype) ที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วง ได้ในคนและในสัตว์ โดยการปนเปื้อนในเชื้อในอาหารและน้ำดื่ม ปวดท้องอย่างรุนแรง ต่อมาถ่ายเป็นเลือดปน หรือเลือดสด บางรายไม่ ถ่ายเป็นเลือด อาจอาเจียน ไม่มีไข้ หรือมีไข้เล็กน้อย ไม่มีมูกปน ระยะฟักตัวของ โรค 3-9 วัน ในส่วนที่ เรียกว่า Submucosal edema มีการหดตัวอย่างรุนแรง ลำไส้ขดงอ และมีเลือดคั่ง

Pseudomonas aeruginosa

เป็นเชื้อก่อโรคประเภทฉวยโอกาสโดยจะเข้าทำให้เกิดโรคขณะร่างกายอ่อนแอ เป็นแบคทีเรียแกรมลบต้องการอากาศในการหายใจ มีลักษณะเป็นท่อนอยู่ใน Family ของ *Pseudomonadaceae* โดยถิ่นที่อยู่นั้นพบได้ทั่วไปทั้งในดินและน้ำนอกจากนั้นยังพบตามผิวของพืชและสัตว์บางชนิดด้วย สามารถชักนำให้ก่อโรคในพืชได้ด้วยและยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ, การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ, โรคผิวหนัง, การติดเชื้อในอวัยวะภายในพบในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง, ผู้ป่วยที่เกิดจากแผลไฟไหม้หากมีการติดเชื้อจะมีอัตราการตายถึง 50%

Candida albicans

เป็นยีสต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-20 ไมโครเมตร มีการสร้างเส้นสายเทียม (Pseudohyphae) ขณะทำการแบ่งเซลล์โดยปกติจะมีลักษณะเซลล์เป็นวงรีเป็นเซลล์เดี่ยวมีการขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ แต่เมื่ออยู่ในอุณหภูมิของร่างกายมนุษย์จะมีการสร้างเส้นสาย (Hypha) ออกมา โดย *Candida albicans* เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Candidiasis โดยพบในร่างกายมนุษย์ปกติด้วยแต่จะไม่แสดงอาการของโรค แต่เมื่อร่างกายอ่อนแอเชื้อจะแสดงอาการออกมาในลักษณะของเชื้อฉวยโอกาส การติดเชื้อจะติดเชื้อที่ผิวหนัง, เยื่อเมือกหรืออาจติดในกระแสเลือดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus subtilis

เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase สามารถพบได้ทั่วไปในดินอยู่ในจีนัส bacillus สามารถสร้าง Endospore โดยจะทนสภาวะที่ไม่เหมาะสมมากๆได้ *Bacillus subtilis* เป็นพวกที่ต้องการอากาศอย่างแท้จริง *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่ไม่ทำอันตรายต่อมนุษย์โดยตรงแต่จะเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นเหตุให้เกิดอาหารเป็นพิษ โดยสปอร์สามารถอยู่รอดได้ในอาหารที่ให้ความร้อนสูงและยังทำให้เกิดเมือกในขนมปัง

Micrococcus luteus

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีลักษณะกลมเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารอยู่ใน Family ของ *Micrococcaceae* ลักษณะถิ่นที่อยู่พบได้ทั่วไปในดิน, ฝุ่นละออง, น้ำ และอากาศ นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบนผิวหนังของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยพบในมนุษย์บริเวณปาก, เยื่อเมือก, ทางเดินหายใจ นอกจากนี้ *Micrococcus luteus* พบจากการติดเชื้อจากการรักษาในโรงพยาบาลด้วย *Micrococcus luteus* สามารถทนต่อความแห้งและปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่สูงได้เป็นอย่างดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้