

รายงานการวิจัย

เรื่อง

กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์และการกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของ
เชื้อแอคติโนมัยสีททางทะเล

**Antimicrobial activity and preliminary determination of chemical
constituents of marine actinomycetes**



โดย

ผศ.ดร. จิตติ ท้าไว

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๖

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

เรื่อง

**กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์และการกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของ
เชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเล**

**Antimicrobial activity and preliminary determination of chemical
constituents of marine actinomycetes**



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

RCH

QR

82

-A35

จ 419 ก

2 - 2

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้
โดยไม่ได้รับอนุญาต หากมีการนำเอกสารนี้ไปตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง
i.....

เลขทะเบียน 115558

วัน,เดือน,ปี. 21 ส.ค. 2554

b. 19312089

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากโครงการทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ท้าว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์และการกำหนดองค์ประกอบทางเคมี
เบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเล

(ภาษาอังกฤษ) Antimicrobial activity and preliminary determination of
chemical constituents of marine actinomycetes

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปี 2553 จำนวนเงิน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

ผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.ดร. จิตติ ท้าว

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์ 02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

ในการศึกษาเพื่อหาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินตะกอนใต้ทะเล
ฝั่งอันดามัน จังหวัดกระบี่ สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้จำนวน 20 ไอโซเลต เชื้อแอคติโนมัย
ซีทเหล่านี้สามารถถูกจัดกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี รวมทั้งฤทธิ์การ
ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เป็น 3 กลุ่ม เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 1 สร้างเส้นใยอากาศสี
ขาว สปอร์มีลักษณะกลมต่อเป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 2 ไม่สร้างเส้นใย
อากาศ สปอร์มีลักษณะกลมเดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหารสีส้ม เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 3 สร้างเส้นใย
อากาศสีเหลือง สปอร์มีลักษณะสายยาวต่อกันเป็นเส้นตรง น้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยซีทตัวแทน
ในแต่ละกลุ่มถูกสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซีเตตและเอ็น-บิว
ทานอล และถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยเทคนิคการแพร่จากแผ่นดิस्क พบว่าสาร
สกัดขยายในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 3 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ
ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Micrococcus luteus*
ATCC 9341 ส่วนสารสกัดขยายในชั้นเฮกเซนและเอ็น-บิวทานอลไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์
ทดสอบ สำหรับสารสกัดขยายทุกชั้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 1 และ 2 ไม่แสดงฤทธิ์ต้าน
เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทำการแยกสารสกัดขยายในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่ม
ที่ 3 ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 9
ต่อ 1 และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ควบคู่ไปด้วยสามารถแยกสารได้ 5 ส่วน พบว่าสารใน
ส่วนที่ 1 2 และ 5 ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ในขณะที่สารส่วนที่ 3 และ 4 แสดงฤทธิ์
ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Micrococcus luteus ATCC 9341 ได้ เมื่อวิเคราะห์ห้วงค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารส่วนที่ 4 ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่า สารสกัดหยาบในส่วนนี้แสดงรูปแบบสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ ที่น่าสนใจ

Abstract

In the course of our investigation for the antibiotic-producing actinomycetes. Twenty actinomycete isolates were isolated from marine sediments collected in Andaman sea in Krabi province. These isolates could be grouped by morphological, physiological, biochemical characteristics including the antimicrobial activity into three groups. The actinomycetes in group I produced white aerial mycelia that usually bear long chain of spores in spiral type. Group II could not produce the aerial mycelia. This group produced single spore directly on orange substrate mycelia. Group III produced yellow with straight chain of spores. The fermentation broth of representative isolate in each group was extracted with three organic solvents, hexane, ethylacetate and n-butanol and were tested for anti-microbial activity by disc diffusion technique. The result revealed that crude ethyl acetate extract of actinomycete in group III exhibited the antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 while the crude extract in hexane and n-butanol part had no antimicrobial activity; moreover, all part of crude extract of actinomycete in group I and II could not inhibit the growth of test microorganisms. Crude ethyl acetate extract of actinomycete in group III was purified by silicagel column chromatography using dichloromethane and methanol (9:1) as solvent system. Antimicrobial assay-guided fractionation of the ethyl acetate extract yielded 5 fractions. The fractions of F1 F2 and F5 showed no antimicrobial activity while the fraction F3 and F4 exhibited significant antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341. Furthermore, the fraction F4 were analysed for the determination of chemical constituents by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and revealed that this fraction showed the interested signaling pattern of the $^1\text{H-NMR}$.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย	7
3.1 เชื้อแอกติโนมัยสปีท์ที่ใช้ในการทดลอง	7
3.2 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์	7
3.3 การคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น	7
3.4 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ	7
3.5 การสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ	8
3.6 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น	8
3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	8
3.8 การกำหนดองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี	9
3.9 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสปีท์	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	10
4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ	10
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีท	10
4.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทของตัวแทนในแต่ละกลุ่ม	12
4.4 การผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ในปริมาณมาก	18
4.5 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตต โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง	18
4.6 การแยกสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี	18
4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากส่วนที่แยกได้ โดย เทคนิค Agar disc diffusion และ ไซโอออโทกราฟ	19
4.8 การแยกและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ	21
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท	3
2	แสดงตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเล	6
3	แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้แต่ละไอโซเลต	10
4	แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP 2	13
5	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท	15
6	แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion	17
7	สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตที่แยกได้โดยเทคนิคคลอฟอร์มโทกราฟี	19
8	แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อไม่เจริญขององค์ประกอบของสารส่วนที่ 1 – 8 (F1-F8) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	20
9	แสดงระดับ R _i ขององค์ประกอบสารส่วนที่ 1 – 5 (F1 – F5) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 1	11
2	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 2	11
3	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 3	12
4	แสดงสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ จากสารสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 3 ไอโซเลต KB 3-1	21



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

C. albicans = *Candida albicans*

E. coli = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

ISP = International *Streptomyces* Project

KB = Krabi province

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MeOH = methanol

MHA = Mueller-Hinton Agar

NMR = Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

n-BuOH = n-butanol

nm = nanometre

Ps. Aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

TLC = Thin Layer Chromatography

UV = Ultraviolet

μL = microlitre

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาที่ท้าวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มีมากขึ้นทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ถูกวิธี ตลอดจนสภาพแวดล้อมของโลกเปลี่ยนแปลงไปซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ดังที่ปรากฏในข่าวจากสื่อต่างๆ ของการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนชนิดใหม่ยังผลให้เกิดการเสียชีวิตต่อชีวิตทรัพย์สิน และเศรษฐกิจทางการเกษตรโดยรวม แนวทางแก้ปัญหานี้แนวทางหนึ่ง คือเร่งหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ยับยั้งและกำจัดเชื้อโรคคือยาเหล่านั้น จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้านการผลิตสารปฏิชีวนะเป็นประโยชน์ด้านหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลากหลายทั้งโครงสร้างและการออกฤทธิ์ รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ง่าย

จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบว่าแอคติโนมัยซีทเป็นกลุ่มจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด

จุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์แตกกิ่งก้านสาขาและมีลักษณะโคโลนิคล้ายเชื้อราแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จึงจัดเป็น prokaryote ผนังเซลล์ประกอบด้วย muramic acid และ diaminopimelic acid ซึ่งต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งประกอบไปด้วย chitin และ glucans แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินทั่วไป พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ในดินร้อยละ 10-50 คือเชื้อแอคติโนมัยซีท นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัสดุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนลึกของหน้าดิน ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรของแอคติโนมัยซีทได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (Goodfellow and Williams, 1983) จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีท (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้งหมด (ตารางที่ 1) เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น เช่น *Streptoverticillium*, *Kitasatospora*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nonomuria*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycalotopsis*, *Kibdellosporangium*, *Pseudonocardia*, *Actinosporangium*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planobispora*, *Planomonospora* เป็นต้น (Bérdy, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลจะเห็นว่า การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากสกุลอื่นๆ นั้นยังมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเทียบกับเชื้อสกุล *Streptomyces* ทั้งนี้ อาจเป็นผลจากการขาดการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคในการแยกเพื่อให้ได้เฉพาะเชื้อสกุลนั้นๆ รวมทั้งขาดการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานและการกระจายตัว (distribution) ของเชื้อจากแหล่งธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากสกุลอื่นๆ รวมทั้งสกุล *Streptomyces* จากแหล่งธรรมชาติที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ และทดสอบฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ ตลอดจนตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหายากจากน้ำหมักเชื้อ โดยเห็นว่าทะเลด้านฝั่งทะเลอันดามัน เป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่น่าสนใจแหล่งหนึ่งในประเทศไทยซึ่งยังมีการศึกษา และทำการวิจัยทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อต่างๆ เพียงเล็กน้อย

เนื่องจากทะเลฝั่งทะเลอันดามันยังคงความเป็นธรรมชาติที่สมบูรณ์ กอปรกับมีความหลากหลายของสัตว์ และพืชทะเลสูงมาก ดังนั้น แนวโน้มของการกระจายตัวและความหลากหลายของจุลินทรีย์จึงน่าจะมีสูง และมีความแตกต่างไปจากแหล่งธรรมชาติแหล่งอื่น ด้วยลักษณะอันจำเพาะของของแหล่งธรรมชาติและความหลากหลายทางด้านชีวภาพอาจส่งผลให้การค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากสายพันธุ์ใหม่หรือเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสารเดิมที่เคยค้นพบมาก่อนเพิ่มสูงขึ้น และเนื่องจากปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวนมากได้พัฒนาตัวเองจนสามารถต้านยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมากขึ้น ดังนั้น การศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเหล่านี้ จึงจำเป็นต้องดำเนินการต่อไป

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไม่ว่าจะเป็นสารที่สกัดได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ล้วนเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการวิจัยเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ สำหรับนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคดังกล่าว จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทจัดเป็นทรัพยากรจุลินทรีย์แหล่งสำคัญ เนื่องจากเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดและ โอกาสที่จะค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ยังคงมีอยู่สูง

ทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารทุติยภูมิจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทตลอดจนการศึกษาร่องรอยองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหายากเบื้องต้นเพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญที่จะนำไปศึกษาด้านเภสัชศาสตร์เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท (Bérdy, 2005)

Streptomycetaceae:		Thermomonosporaceae:	
<i>Streptomyces</i>	~8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatospora</i>	37	<i>Microbispora</i>	54
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynnema</i>	51
Microellobosporia	11	<i>Nocardiosis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Microtetraspora/Nonomuria</i>	26/21
Micromonosporaceae:		<i>Thermomonospora</i>	19
(<i>Actinoplanetes</i>)		<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Thermoactinomyces</i>	14
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Thermopolyspora</i>	1
<i>Dactylosporangium</i>	58	<i>Thermoactinopolyspora</i>	1
Micromonosporaceae (ต่อ)		Mycobacteriaceae:	
<i>Ampullariella</i>	9	(<i>Actinobacteria</i>)	
<i>Glycomyces</i>	2	<i>Nocardia</i>	(357)
<i>Catenuloplanes</i>	3	<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Catellatospora</i>	1	<i>Arthrobacter</i>	25
Pseudonocardiaceae:		<i>Brevibacterium</i>	17
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Amycalotopsis/Nocardia</i>	120/357	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Kibdellosporangium</i>	34	Other (unclassified) species:	
<i>Pseudonocardia</i>	27	<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Amycolata</i>	12	<i>Microellobosporia</i>	11
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Frankia</i>	7
<i>Actinopolyspora</i>	1	<i>Westerdykella</i>	6
Streptosporangiaceae:		<i>Kitasatoa</i>	5
(<i>Maduromycetes</i>)		<i>Synnenomyces</i>	4
<i>Streptosporangium</i>	79	<i>Sebekia</i>	3
<i>Streptoalloteichus</i>	48	<i>Elaktomyces</i>	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท
- 1.2.2 เพื่อทำการสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีท
- 1.2.3 เพื่อทำการตรวจสอบและกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทนั้น
- 1.2.4 เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบนั้น

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาตรวจสอบและกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนใต้ทะเลในจังหวัดกระบี่ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีชั้นบาง นำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disk diffusion จากนั้นเลือกสารสกัดหยาบที่แสดงกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ที่ดีมากำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิคทาง spectroscopy เช่น $^1\text{H-NMR}$ ตลอดจนตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทนั้นๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของโครงการวิจัย

- 1.4.1 สามารถสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือก ตลอดจนตรวจสอบและกำหนดองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบนั้นๆ ได้
- 1.4.2 ทราบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบนั้นๆ
- 1.4.3 การวิจัยครั้งนี้อาจค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์สูง ซึ่งจะเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญทางสาธารณสุขต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีหรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

จุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยซีทเป็น แบคทีเรียแกรมบวก เซลล์แตกกิ่งก้านสาขาและมีลักษณะโคโลนีสคล้ายเชื้อราแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จึงจัดเป็น prokaryote พผนังเซลล์ประกอบด้วย muramic acid และ diaminopimelic acid ซึ่งต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งประกอบไปด้วย chitin และ glucans แอกติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินทั่วไป พบว่าจำนวนประชากรของเชื้อจุลินทรีย์ในดินร้อยละ 10-50 คือเชื้อแอกติโนมัยซีท นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัตถุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนของลิ้นของหน้าดิน ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรของแอกติโนมัยซีท ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (Goodfellow and Williams, 1983) เชื้อแอกติโนมัยซีทที่หายากมีหลายสกุลได้แก่ *Dactylosporangium*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Saccharopolyspora*, *Chainia*, *Nocardiopsis*, *Ampullariella*, *Amycolatopsis*, *Kitasatospora*, *Pseudonocardia*, *Saccharothrix*, *Microtetraspora*, *Microellobospora*, *Streptoalloteichus*, *Actinosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Actinosynema*, *Planobispora*, *Microbispora*, *Planomonospora* และ *Saccharomonospora* (Oki, 1994)

แอกติโนมัยซีททางทะเล (marine actinomycetes) พบได้ทั่วไปในท้องทะเล และการกระจายตัวของเชื้อแอกติโนมัยซีทในแต่ละแหล่งก็แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในท้องทะเลและสิ่งมีชีวิตที่เป็นผู้ให้อาศัย เช่น แอกติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ และสาหร่ายแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) ได้แก่เชื้อในสกุล *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* และ *Salinispora* หรือแอกติโนมัยซีทที่อาศัยเป็นอิสระทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายสารพบในซากตะกอน (sediment) ต่างๆได้ท้องทะเลได้แก่ เชื้อในสกุล *Actinomadura*, *Actinosynnema*, *Amycolatopsis*, *Frankia*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis*, *Nonomurea*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*, *Salinispora*, *Streptomyces*, *Streptosporangium* และ *Verrucosispora*

จากการศึกษาเชื้อแอกติโนมัยซีทในทะเล พบว่ามีเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยา รักษาโรคได้ (Kin, 2006) (ข้อมูลในปี 2003-2008, ตารางที่ 2)

จากลักษณะอันจำเพาะของทะเลไทย ที่ยังคงความเป็นธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ กอปรกับมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีสัตว์และพืชทะเลจำนวนมาก ดังนั้นแนวโน้มของการกระจายตัวและความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์จึงน่าจะมียู่สูง และมีความแตกต่างไปจากแหล่งธรรมชาติแห่งอื่น โอกาสที่จะค้นพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่ผลิตสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้าง

แตกต่างจากสารเดิมที่เคยค้นพบมาก่อนจึงมีโอกาสดอกขึ้นข้างมาก นอกจากนี้แล้วยังพบว่า การศึกษาวิจัยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเลในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมากเมื่อเทียบกับต่างประเทศ ดังนั้นการศึกษาระยะแรกของเชื้อและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจและท้าทาย และน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการวิจัยและพัฒนาในการหาสารที่มีฤทธิ์ใหม่ๆ จากทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีททางทะเล

Compound	Source	Activity	References
Diazepinomicin (ECO-4601)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacterial; Anticancer; Anti-inflammatory	Charan <i>et al.</i> , 2004
3,6-disubstitutedindoles	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	Sanchez Lopez <i>et al.</i> , 2003
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Bruntner <i>et al.</i> , 2005
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Macherla <i>et al.</i> , 2005
Gutingimycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Maskey <i>et al.</i> , 2004
Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacterial	Asolkar <i>et al.</i> , 2004
8-amino-[1,4]diazonane-2,5-dione	<i>Streptomyces acrimycini</i>	Antitumour	Hernández <i>et al.</i> , 2004
Komodoquinone A	<i>Streptomyces</i> sp.	Neuritogenic activity	Itoh <i>et al.</i> , 2003
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Macherla <i>et al.</i> , 2005
Marinomycins	<i>Marinispora</i>	Antibacterial; Anticancer	Kwon <i>et al.</i> , 2006
Mechercharmycins	<i>Thermooactinomycetes</i> sp.	Anticancer	Kanoh <i>et al.</i> , 2005
leucyl-4-hydroxyproline	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumour	Hernández <i>et al.</i> , 2004
Salinosporamide A (NPI-0052)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer	Feling <i>et al.</i> , 2003
Cebulactams	<i>Saccharopolyspora cebuensis</i>	Antibacterial; Antioxidant	Pimentel-Elardo <i>et al.</i> , 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อแอสกีโนมัยสีทที่ใช้ในการทดลอง

เป็นเชื้อแอสกีโนมัยสีททางทะเลจำนวน 20 ไอโซเลต ที่แยกได้จากดินตะกอนใต้ทะเลฝั่งอันดามันจังหวัดกระบี่

3.2 การเก็บรักษาเชื้อที่บริสุทธิ์

ทำการเก็บรักษาเชื้อในรูปแบบอาหารเยือกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาด้วยกระบวนการ deep freeze ใน 10% glycerol และในรูปแบบ lyophilization

3.3 การคัดเลือกเชื้อขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วย จูลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยลากจูลินทรีย์ทดสอบให้ขีดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจูลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จูลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้ จากการศึกษานี้จะสามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเชื้อแอสกีโนมัยสีทไอโซเลตใดสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์ต้านจูลินทรีย์ได้ จากนั้นจะทำการคัดเลือกเชื้อที่แสดงฤทธิ์ต้านจูลินทรีย์ไปทดสอบในขั้นต่อไป

3.4 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO_3) โดยเติม inoculum 1% ของ seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซีเตตและบิวทานอล แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในแต่ละส่วน และนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นโดยโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

3.6 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี เช่น โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยตัวทำละลายที่สามารถละลายสารสกัดหยาบนั้นได้หมด จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาจุดลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง ที่เคลือบด้วยสารซิลิกา (เฟสคงที่) และนำไปจุ่มลงในภาชนะปิดที่มีระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม รอจนกระทั่งตัวทำละลายพาสารขึ้นจนถึงระยะที่กำหนด ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจสอบสารองค์ประกอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และใช้สารเคมี เช่น Anisaldehyde ในการตรวจสอบ

3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี agar diffusion Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกับในข้อ 3.3 นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาบบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำแผ่นดิสก์ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 μ L/disc (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำชุดควบคุมเชิงลบโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัดและชุดควบคุมเชิงบวกโดยใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นดิสก์ (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การกำหนดองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี

เมื่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบของแต่ละเชื้อแล้วจะทำการคัดเลือกสารสกัดหยาบจากเชื้อที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีมากำหนดองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี ดังนี้

3.8.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

เป็นเทคนิคที่ทำให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีของโครงสร้างสาร โดยจะใช้ข้อมูลจาก 1-D NMR (^1H NMR) อิทธิพลของหมู่ฟังก์ชันต่างๆในโครงสร้างจะมีผลต่อตำแหน่งของโปรตอน โดยจะแสดงให้เห็นเป็นค่า chemical shift ของโปรตอนที่ตำแหน่งแตกต่างกันไป และการเกิด splitting pattern รูปแบบต่างๆ รวมถึงค่า coupling constant จะเป็นองค์ประกอบในการหาโครงสร้างของสาร

3.9 การตรวจสอบลักษณะทางลักษณะทางสีวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยสีท

ตรวจสอบลักษณะทางจุลชีววิทยาโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International Streptomyces Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shirling and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งการทดลองนี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อและบ่งบอกลักษณะของเชื้อคร่าวๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินดินตะกอนใต้ทะเลฝั่งอันดามัน จังหวัดกระบี่ มาทำการแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีท พบว่าสามารถแยกเชื้อแอสคิโนมัยซีทได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต จากดินตะกอนตัวอย่างที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างในช่วง 7.8- 8.2 ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่แยกได้แต่ละไอโซเลต

ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	พีเอช	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ดินตะกอน	กระบี่	7.8	KB1	KB1-1, KB1-2, KB1-3, KB1-4, KB1-5, KB1-6
ดินตะกอน	กระบี่	7.7	KB2	KB2-1, KB2-2, KB2-3, KB2-4
เศษปะการัง	กระบี่	8.2	KB3	KB3-1, KB3-2, KB3-3, KB3-4, KB3-5, KB3-6, KB3-7, KB3-8, KB3-9, KB3-10

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอสคิโนมัยซีท

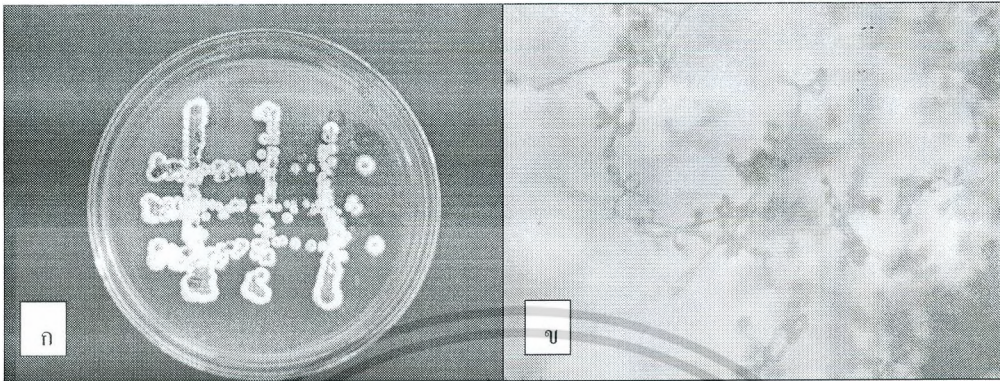
ในจำนวนเชื้อแอสคิโนมัยซีททั้งหมด 20 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่เจริญได้ดีในอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีเทาเข้มม่วง (dark grayish purple) มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) มีการสร้างรงควัตถุเป็นสีเทาหม่น (light grayish olive) สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเกลียว (รูปที่ 1) มีสมาธิ 6 ไอโซเลต ได้แก่ KB1-1, KB1-2, KB1-3, KB1-4, KB1-5 และ KB1-6

สมาธิในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 6 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 4-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

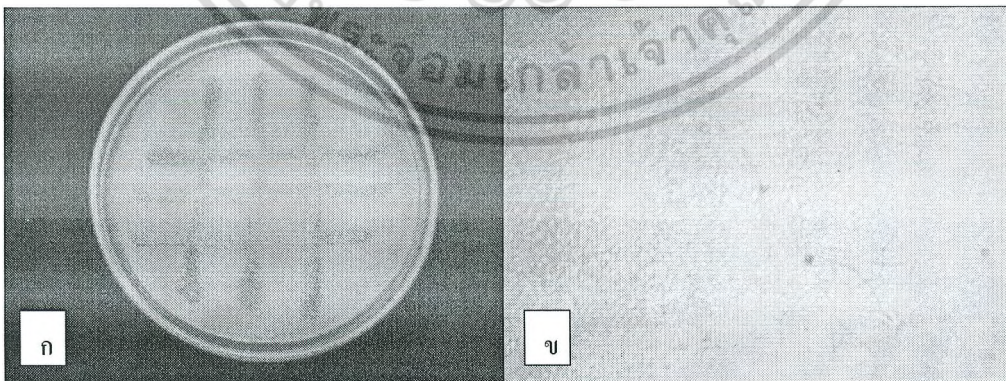
โปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (ตารางที่ 4 และ 5)



รูปที่ 1. แสดงลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอสเพอร์จิลลัส กลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสเพอร์จิลลัสที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มน้ำตาล ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ และสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 2) มีสมาชิก 4 ไอโซเลต ได้แก่ KB2-1, KB2-2, KB2-3, KB2-4

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 4 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่สามารถย่อยแป้งได้เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้ทุก ไอโซเลตผลิตสารทุติยภูมิที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด (ตารางที่ 4 และ 5)

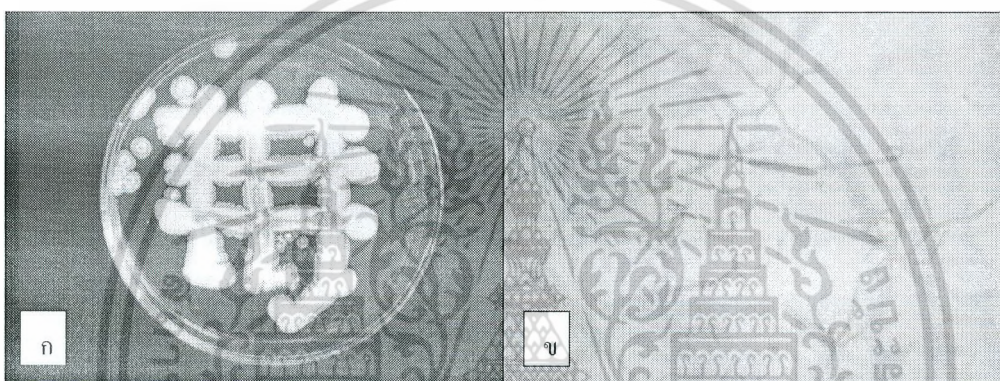


รูปที่ 2. แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอสเพอร์จิลลัส กลุ่มที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองส้มเข้ม (strong orange yellow) มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองอ่อน (brilliant yellow) มีการสร้างรงควัตถุเป็นสีเหลืองสว่าง (vivid yellow) สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเส้นตรงบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 3) มีสมาชิก 10 ไอโซเลต ได้แก่ KB3-1, KB3-2, KB3-3, KB3-4, KB3-5, KB3-6, KB3-7, KB3-8, KB3-9, KB3-10

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 ช่วงความเป็นกรดต่างที่ 4.5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม ตกตะกอนโปรตีนในนม ย่อยสลายแป้ง รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *S. aureus* *B. subtilis* และ *M. luteus* ได้ (ตารางที่ 4 และ 5)



รูปที่ 3. แสดงลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอกติโนมัยสีทกลุ่มที่ 3

4.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากนำหมักเชื้อแอกติโนมัยสีทของตัวแทนในแต่ละกลุ่ม

ได้ทำการสกัดนำหมักเชื้อจากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิดตามลำดับความเป็นขั้วได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอ็น-บิวทานอล ผลที่ได้พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตตของเชื้อกลุ่มที่ 3 แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดหยาบในชั้นเอ็น-บิวทานอล และเฮกเซนของเชื้อกลุ่มดังกล่าวไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ใดๆ ในขณะที่สารสกัดหยาบในทุกชั้นของเชื้อในกลุ่มที่ 1 และ 2 ไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด

จากเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นพบว่ามี 10 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มที่ 3 ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี โดยพบว่าสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซิเตตแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* *B. subtilis* และ *M. luteus* ดังแสดงในตารางที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP 2

กลุ่มที่	ไอโซเลต	การเจริญ ^a	สีของโคโลนีด้านบน ^b	สีของโคโลนีด้านล่าง ^c	รงควัตถุ ^d	สปอร์
1	KB1-1	ค1	สีขาว	สีเทาเข้มม่วง	สีเทา มะกอก	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	KB1-2	ค1	สีขาว	สีเทาเข้มม่วง	สีเทา มะกอก	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	KB1-3	ค1	สีขาว	สีเทาเข้มม่วง	สีเทา มะกอก	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	KB1-4	ค1	สีขาว	สีเทาเข้มม่วง	สีเทา มะกอก	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	KB1-5	ค1	สีขาว	สีเทาเข้มม่วง	สีเทา มะกอก	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	KB1-6	ปานกลาง	สีขาว	สีเทาเข้มม่วง	สีเทา มะกอก	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
2	KB2-1	ค1	สีส้ม น้ำตาล	สีส้มน้ำตาล	-	สปอร์เดี่ยว
	KB2-2	ค1	สีส้ม น้ำตาล	สีส้มน้ำตาล	-	สปอร์เดี่ยว
	KB2-3	ปานกลาง	สีส้ม น้ำตาล	สีส้มน้ำตาล	-	สปอร์เดี่ยว
	KB2-4	ค1	สีส้ม น้ำตาล	สีส้มน้ำตาล	-	สปอร์เดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีท (ต่อ)

กลุ่ม ที่	ไอโซเลต	การเจริญ ^a	สีของโคโลนี ด้านบน ^b	สีของโคโลนี ด้านล่าง ^c	รงควัตถุ ^d	สปอร์
3	KB3-1	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว
	KB3-2	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว
	KB3-3	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว
	KB3-4	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว
	KB3-5	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว
	KB3-6	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว
	KB3-7	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว
	KB3-8	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว
	KB3-9	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว
	KB3-10	ดีมาก	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์สาย ตรง ยาว

หมายเหตุ **a** = การเจริญบนอาหารต่างๆ โดยรวม

b = สีโคโลนีด้านบนของเชื้อในอาหารต่างๆ โดยรวม

c = สีโคโลนีด้านล่างของเชื้อในอาหารต่างๆ โดยรวม

d = สีรงควัตถุที่ละลายน้ำในอาหารต่างๆ โดยรวม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียชนิดที่

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)										พีเอช						อุณหภูมิ (°C)						Skim milk					Antimicrobial activities				
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	17	40	45	50	Peptonization	Coagulation	Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>				
1	KB1-1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-			
	KB1-2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-			
	KB1-3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-			
	KB1-4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-			
	KB1-5	+	+	+	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	W	+	-	-	-	-	-	-	-			
	KB1-6	+	+	+	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-			
2	KB2-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	KB2-2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-			
	KB2-3	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-			
	KB2-4	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion

ชื่อกลุ่ม ที่	สารสกัดหยาบ (50 มก/มล)	บริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone, mm*)					
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
1	เฮกเซน (Hexane)	-	-	-	-	-	-
	เอธิลอะซิเตต (EtOAc)	-	-	-	-	-	-
	เอ็น-บิวทานอล (n-BuOH)	-	-	-	-	-	-
	เมทานอล (MeOH)	-	-	-	-	-	-
2	เฮกเซน (Hexane)	-	-	-	-	-	-
	เอธิลอะซิเตต (EtOAc)	-	-	-	-	-	-
	เอ็น-บิวทานอล (n-BuOH)	-	-	-	-	-	-
	เมทานอล (MeOH)	-	-	-	-	-	-
3	เฮกเซน (Hexane)	14	12	10	-	-	-
	เอธิลอะซิเตต (EtOAc)	21	28	18	-	-	-
	เอ็น-บิวทานอล (n-BuOH)	18	22	14	-	-	-
	เมทานอล (MeOH)	12	14	11	-	-	-

หมายเหตุ * รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ (เส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ = 6 มิลลิเมตร)

ขนาดของบริเวณการยับยั้งตั้งแต่ 10 มิลลิเมตรขึ้นไป ถือว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4.4 การผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบในปริมาณมาก

จากการนำเชื้อแอสคิโนมัยซีตัวแทนในกลุ่มที่ 3 คือไอโซเลต KB3-1 มาเลี้ยงในอาหาร yeast extract – malt extract เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบ ต่อนาที ปริมาตร 10 ลิตร นำส่วนของน้ำหมักมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ทำการระเหยภายใต้เครื่อง ระเหยระบบสูญญากาศทำให้ได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเหนียวข้นสีส้มน้ำตาลปริมาณ 643 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ 6.43

4.5 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตโดยเทคนิคโครมาโท กราฟีแบบชั้นบาง

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางด้วยระบบตัว ทำละลาย ไคลอโรโรมีเทนต่อเมทานอลอัตราส่วน 9: 1 และทำการตรวจสอบโดยการส่องภายใต้แสง ปกติพบแถบสารสีเหลืองส้มจำนวน 1 แถบ ที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.62 เมื่อนำไปส่องภายใต้แสง อัลตราไวโอเลตที่ความยาว 254 นาโนเมตร พบแถบสารสีดำ (Quenching band) จำนวน 4 แถบ ที่ ระดับ R_f เท่ากับ 0.15 0.21 0.3 และ 0.51 และพบแถบสารเรืองแสงสีฟ้าที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.62 เมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

4.6 การแยกสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารสกัดหยาบที่ได้ปริมาณ 643 มิลลิกรัม มา แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วยระบบตัวทำละลายคือ ไคลอโรโรมีเทนต่อเมทานอลอัตราส่วน 9:1 สามารถแยกสารเป็นส่วน ต่างๆ (Fraction) ได้ทั้งหมด 52 ส่วน นำแต่ละส่วน (Fraction) มาตรวจสอบรูปแบบโดยเทคนิคโคร มาโทกราฟีแบบชั้นบาง พบรูปแบบของสารที่คล้ายคลึงกัน 5 รูปแบบ โดยองค์ประกอบของสาร สกัดส่วนที่ 1 (F1) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ 1 – 12 ปริมาณ 114.4 มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบแถบ สารสีเหลืองส้มจำนวน 1 แถบ ที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.62 เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความ ยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ไม่พบแถบสารใดๆ เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบแถบสารสีฟ้าเรืองแสง องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 2 (F2) ประกอบด้วย ลำดับส่วนที่ 13 – 22 ปริมาณ 156.9 มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบแถบสารสีเหลืองส้ม จำนวน 1 แถบ ที่ ระดับ R_f เท่ากับ 0.62 เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบแถบ สารสีดำจำนวน 1 แถบ ที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.51 เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบแถบสารสีฟ้าเรืองแสงที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.62 องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 3 (F3) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ 23 – 33 ปริมาณ 89.6 มิลลิกรัม ที่แสงปกติพบไม่พบ เมื่อส่อง ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบแถบสารสีดำจำนวน 2 แถบ ที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.51 ในปริมาณมาก และ 0.3 ในปริมาณน้อย เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความ

ยาว 365 นาโนเมตร ไม่พบแถบสารเรืองแสง องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 4 (F4) ประกอบด้วย ลำดับส่วนที่ 34 – 47 ปริมาณ 244.5 มิลลิกรัม ที่แสงปกติไม่พบแถบสี เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบแถบสารสีดำจำนวน 2 แถบ ที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.21 ในปริมาณน้อยและ 0.3 ในปริมาณมาก เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาว 365 นาโนเมตร ไม่พบแถบสารเรืองแสง องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 5 (F5) ประกอบด้วยลำดับส่วนที่ 48 – 52 และส่วนที่เหลือจากการชะคอลัมน์ ปริมาณ 35.6 มิลลิกรัม ที่แสงปกติไม่พบแถบสี เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบแถบสารสีดำจำนวน 2 แถบ ที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.15 และ 0.21 เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาว 365 นาโนเมตร ไม่พบแถบสารเรืองแสง ดังตารางที่ 7 หลังจากนั้นนำแต่ละส่วนที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar diffusion

ตารางที่ 7 สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตดที่แยกได้โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

องค์ประกอบ สารส่วนที่	ลำดับส่วนที่	น้ำหนัก ของสาร (มิลลิกรัม)	ระดับ R_f ของแถบสาร		
			แสงปกติ	แสง UV ความยาว 254 nm.	แสง UV ความยาว 365 nm.
F1	1-12	114.4	0.62	-	0.62
F2	13-22	159.9	0.62	0.51	0.62
F3	23-33	89.6	-	0.3, 0.51	-
F4	34-47	224.5	-	0.21-0.3	-
F5	48-52	35.6	-	0.15, 0.21	-
รวม	และส่วนที่เหลือจาก การชะคอลัมน์	624			

4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากส่วนที่แยกได้ โดยเทคนิค Agar disc diffusion และ ไบโอบีโอโทกราฟี

จากการแยกสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบรูปแบบของสารจำนวน 5 รูปแบบ จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Agar disc diffusion โดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 1 2 และ 5 (F1 F2 และ F5) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 3 และ 4 (F3 และ F4) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* *B. subtilis* และ *M. luteus* ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อไม่เจริญขององค์ประกอบของสารส่วนที่ 1 – 8 (F1-F8) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

องค์ประกอบ สารส่วนที่	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (มิลลิเมตร)					
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
F1	-	-	-	-	-	-
F2	-	-	-	-	-	-
F3	10.5	9.5	11.0	-	-	-
F4	21.0	19.5	19.0	-	-	-
F5	-	-	-	-	-	-

จากการแยกเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางโดยใช้ระบบตัวทำละลายไซคลอโรมีเทนต่อเมทานอลอัตราส่วน 9:1 และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคไบโอออโตกราฟ (bioautographic method) พบว่า องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 1 (F1) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในทุกตำแหน่งแถบสารใดๆ องค์ประกอบของสารสกัดในส่วนที่ 2 (F2) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในทุกตำแหน่งแถบสารใดๆ เช่นกัน องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 3 (F3) พบว่าแถบสารที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* *B. subtilis* และ *M. luteus* ในขณะที่แถบสารที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.51 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ใดๆ องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 4 (F4) พบว่าแถบสารที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* *B. subtilis* และ *M. luteus* ในขณะที่แถบสารที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.21 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ใดๆ องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 5 (F5) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในทุกตำแหน่งแถบสารใดๆ ดังตารางที่ 9

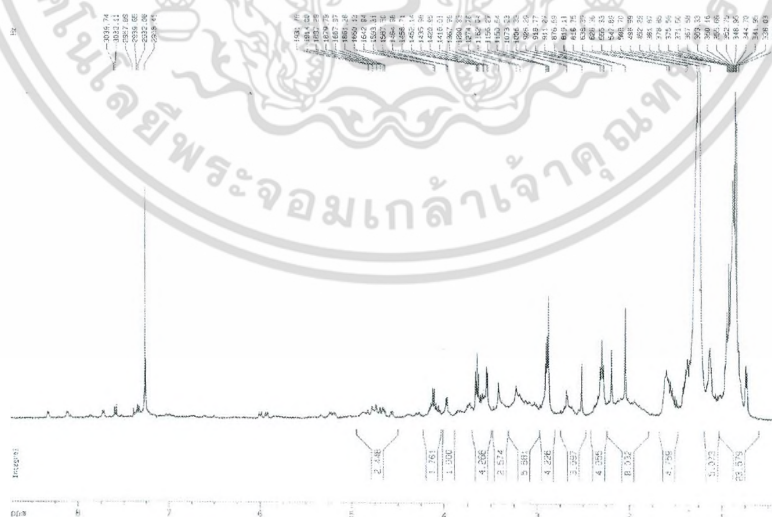
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงระดับ R_f ขององค์ประกอบสารส่วนที่ 1 – 5 (F1 – F5) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

องค์ประกอบ สารส่วนที่	ระดับ R_f ของสาร					
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
F1	-	-	-	-	-	-
F2	-	-	-	-	-	-
F3	0.3	0.3	0.3	-	-	-
F4	0.3	0.3	0.3	-	-	-
F5	-	-	-	-	-	-

4.8 การแยกและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

ได้ทำการคัดเลือกสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อแอสคิโนมัยซีที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี มาพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิคทาง spectroscopy เช่น $^1\text{H-NMR}$ พบว่า สารสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อไอโซเลต KB 3-1 แสดงลักษณะรูปแบบของ $^1\text{H-NMR}$ ที่น่าสนใจ (รูปที่ 4) นั่นคือ พบสัญญาณของ aromatic proton ที่ช่วง δ_{H} 7.2-8.3, สัญญาณของ olefinic proton ที่ช่วง δ_{H} 6.0, สัญญาณของโปรตอนที่อยู่ติดกับ Heteroatom ที่ช่วง δ_{H} 4.0-5.2 และสัญญาณของ sp^3 -proton ที่ช่วง δ_{H} 1.0-3.0



รูปที่ 4. แสดงสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ จากสารสกัดหยาบของน้ำหมักเชื้อแอสคิโนมัยซีกลุ่มที่ 3 ไอโซเลต KB 3-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทจากตัวอย่างดินตะกอนใต้ทะเลฝั่งอันดามัน จังหวัดกระบี่ สามารถทำการแยกเชื้อแอสกีโนมัยซีทได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต และได้ทำการศึกษาลักษณะ สันฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อแอสกีโนมัยซีทที่แยกได้นั้นสามารถเจริญได้ดีใน อาหาร Yeast extract - Malt extract agar และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ในโทนสีขาว และเหลือง สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในโทนสีเทาม่วง และเหลือง น้ำตาล ลักษณะ ของสปอร์ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของภาพ 1,000 เท่า มีลักษณะขดเป็นเกลียวเป็น ส่วนใหญ่ รองลงมาคือลักษณะตรง บางชนิดเป็นสปอร์เดี่ยว ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถจัดกลุ่ม เชื้อแอสกีโนมัยซีทออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีเทาเข้มม่วง (dark grayish purple) มีการสร้างเส้นใยอากาศสีขาว (white) มีการสร้างรงควัตถุเป็นสีเทาหมอก (light grayish olive) สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเกลียว

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมน้ำตาล ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่ สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ และสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองส้มเข้ม (strong orange yellow) มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองอ่อน (brilliant yellow) มีการสร้างรงควัตถุเป็นสีเหลือง สว่าง (vivid yellow) สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเส้นตรงบนเส้นใยอาหาร

ในการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอสกีโนมัยซีทที่คัดแยกด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าร้อยละ 50 ของเชื้อแอสกีโนมัยซีททั้งหมดมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารสกัดหยาบที่ได้นี้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดยสารสกัดหยาบใน ชั้นเอทิลอะซิเตตของเชื้อแอสกีโนมัยซีทกลุ่มที่ 3 เท่านั้น ที่แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 3 ชนิด คือ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ในขณะที่สารสกัดหยาบทุกชั้นของเชื้อแอสกีโนมัยซีทกลุ่มที่ 1 และ 2 ไม่แสดงฤทธิ์ ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบใดๆ ดังนั้นจึงเลือกเชื้อแอสกีโนมัยซีทตัวแทนในกลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซ เลต KB3-1 นำมาเลี้ยงเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะในปริมาณมากซึ่งได้ปริมาณสารสกัดหยาบประมาณ 643 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 6.43 เมื่อนำสารสกัดหยาบมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค คอลัมน์โครมาโตกราฟีและตรวจสอบรูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบชั้นบาง สามารถแยกสารออกเป็น 5 รูปแบบ จากนั้นนำแต่ละส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar diffusion พบว่าองค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 3 (F3) และส่วนที่ 4 (F4) แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *M. luteus* ได้ ในขณะที่องค์ประกอบของสารสกัดส่วนที่ 1 (F1) 2 (F2) และ ส่วนที่ 5 (F5) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบใดๆ โดยองค์ประกอบของสารส่วนที่ 3 (F3) และ (F4) ในแถบสารที่ระดับ R_f เท่ากับ 0.3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี เมื่อนำสารสกัดหยาบของเชื้อไอโซเลต KB3-1 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ พบว่าสารนี้แสดงรูปแบบสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ ที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเชื้อแอคติโนมัยซีตส์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. จากการวิจัยครั้งนี้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีตส์ที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี จึงควรมีการวิจัยต่อเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ถึงระดับสกุลและสปีชีส์
2. สารทุติยภูมิที่เชื้อแอคติโนมัยซีตส์เหล่านี้สร้างมีความน่าสนใจมาก เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้ค่อนข้างดี จึงควรทำการวิจัยต่อในเชิงการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารทุติยภูมิที่เชื้อสร้างขึ้น เพื่องานวิจัยที่สมบูรณ์ต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- Asolkar, R. N., Schroder, D., Heckmann, R., Lang, S., Wagner-Dobler, L. H. -2004.
Helquinoline, a new tetrahydroquinoline antibiotic from *Janibacter limosus* Hell. *J Antibiot* (Tokyo). 57:17-23.
- Berdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiotics*. 58: 1-26.
- Bruntner, C., Binder, T., Pathomaree, W., Goodfellow, M., Bull, A. T., Potterat, O., Puder, C., Horer, S., Schmid, A., Bolek, W. 2005. Frigocyclinone, a novel langucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. *J Antibiot*. (Tokyo). 58:346-349.
- Charan, R. D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X., Carter, G. T. 2004.
Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp. *J Nat Prod*. 67:1431-1433.
- Feling, R. H., Buchanan, G.O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2003.
Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 42:355-357.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol*. 37: 189-216.
- Hernández, I. L. C., Macedo, M. L., Berlinck, R. G. S., Ferreira, A. G. and Godinho, M. J. L. 2004. *J. Braz. Chem. Soc.*, 15, 441
- Itoh, T., Kinoshita, M., Aoki, S., Kobayashi, M. 2003. Komodoquinone A, a novel neutritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *J Nat Prod*. 66:1373-1377.
- Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M., Shizuri, Y. 2005.
Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J Antibiot (Tokyo)*. 58:289-292.
- Kin, S. L. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Option in Microbiology*. 9:245-251.
- Kwon, H. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., Fenical, W. 2006. Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus '*Marinispora*'. *J Am Chem Soc* . 128:1622-1632.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lorian, V. 1980. Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore: The Williams & Wilkins. pp.161-207.
- Macherla, V. R., Liu, J., Bellows, C., Teisan, S., Lam, K. S., Potts, B. C. M. 2005. Glaciapyrroles A, B and C, pyrrolonesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. Isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod.* 68:780-783.
- Maskey, R. P., Sevvana, M., Uson, I., Helmke, E., Laatsch, H. 2004. Gutingimycin: a highly complex metabolite from a marine streptomycete. *Angew Chem Int Ed Engl.* 43:1281-1283.
- Pimentel-Elardo, S. M., Tobias, A. M., Gulder, J., Hentschel, U., Bringmann, G. 2008. Cebulactams A1 and A2, new macrolactams isolated from *Saccharopolyspora cebuensis*, the first obligate marine strain of the genus *Saccharopolyspora*. *Tetrahedron Letters.* 49:6889-6892.
- Sanchez Lopez, J. M., Martinez, I. M., Perez, B. J., Fernandez, P. J. L. and Canedo Hernandez, L. M. 2003. New Cytotoxic indolic metabolites from a marine *Streptomyces*. *J Nat Prod.* 66:863-864.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Physiological properties *In Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.
- Williams, S.T. and Cross, T. 1977. Actinomycetes : Slide and coverslip methods *In Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.



หนังสือเป็นสมบัติของท่าน
โปรดช่วยกันรักษา

www.lib.kmitl.ac.th

สำนักหอสมุดกลาง โทร. 0 2739 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้