การคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล

Screening for Antimicrobial Activities of Marine Derived Actinomycetes

ธีรวัฒน์ อ่อนลมูล

Theerawat Onlamoon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานคริทร์

เลขหมู่ QR82.A35 ธ64 2552 ฉ.1

Bib Key 373588

11 มิ.ย. 2552

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล

ผู้เขียน นายธีรวัฒน์ อ่อนลมูล

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กรกนก อิงคนินันท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล
ผู้เขียน	นายธีรวัฒน์ อ่อนลมูล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทจำนวน 196 ตัวอย่าง ที่เตรียมจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทยจำนวน 49 สายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ถูกเลี้ยงในอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ อาหารสูตร A (ตะกอนดิน, สาหร่าย และเปลือกกุ้งป่น), อาหารสูตร B (glycerol และ soytone), อาหารสูตร C (polypeptone, soluble starch และ yeast extract) และอาหารสูตร D (peptone และ yeast extract) พบว่ามีสารสกัดหยาบจำนวน 112 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จากการทดสอบโดยวิธี colorimetric microdilution assay ที่มี AlamarBlue เป็นอินดิเคเตอร์ โดยเป็นสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. จำนวน 15 สายพันธุ์ และจากเชื้อกลุ่มที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ จำนวน 28 สายพันธุ์ โดยสารสกัดส่วนใหญ่ คือ 71 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC10231 รองลงมาเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis* TISTR459 และ *Staphylococcus aureus* ATCC25929 จำนวน 57, 29 และ 15 ตัวอย่าง ตามลำดับ แต่ไม่มีสารสกัดหยาบใดเลยที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 และ *Shigella sonnei* ซึ่งสายพันธุ์ CNA053 (unidentified) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร A ให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้สูงที่สุด ที่ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 4.69 µg/ml อย่างไรก็ตามสารสกัดนี้ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ ส่วนสายพันธุ์ CNA076 (มีค่าเทียบเคียง 99% กับสายพันธุ์ *Streptomyces* sp.) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร C สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC25929 ได้สูงที่สุด ที่ค่า MIC เท่ากับ 75 µg/ml และสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Enterococcus faecalis* TISTR459 ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA146 (unidentified) และ CNA100 (มีค่าเทียบเคียง 99% กับสายพันธุ์ *Streptomyces* sp.) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร A คือมีค่า MIC เท่ากับ 37.5 µg/ml ส่วนสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC10231 ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA093 (unidentified) ที่เลี้ยงในอาหาร

สูตร C และ D และสายพันธุ์ CNA097 (unidentified) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร D ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 9.38 μg/ml นอกจากนี้พบว่าอาหารสูตร A ให้จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบสูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 34.30 ของสารสกัดหยาบทั้งหมด ซึ่งส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 47 ตัวอย่างใน 59 ตัวอย่าง ส่วนอาหารสูตร B, C และ D ให้จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* ATCC10231 จำนวน 20, 20 และ 19 ตัวอย่างตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสารสกัดหยาบจากอาหารสูตร A ที่มีจำนวน 12 ตัวอย่าง

เมื่อทำการเลือกสารสกัดหยาบจำนวน 23 ตัวอย่าง ที่มีค่า MIC ต่ำที่สุด หรือมีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์สูง คือมีค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)/Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ต่ำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นโดยใช้ thin layer chromatography (TLC) และ high performance liquid chromatograhpy-diode array detector (HPLC-DAD) ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบมีองค์ประกอบของเอมีน, เทอร์พีนอยด์, แอลคาลอยด์ที่แตกต่างกัน และสามารถจัดกลุ่มสารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายกันได้ 9 กลุ่ม โดยวิเคราะห์จากผลไคโออาเรย์สเปกตรัม

Thesis Title	Screening for Antimicrobial Activities of Marine Derived Actinomycetes
Author	Mr. Theerawat Onlamoon
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2008

ABSTRACT

Antimicrobial activities of 196 crude extracts prepared from 49 marine derived actinomycetes (isolated from marine habitats in the south of Thailand) cultivated in media A (sediment, seaweed and shrimp shell powder), B (glycerol and soytone), C (polypeptone, soluble starch and yeast extracts) and D (peptone and yeast extracts) were evaluated. One hundred-twelve crude extracts from 15 strains of *Streptomyces* and 28 unidentified isolates exhibited antimicrobial activity against tested microorganisms using colorimetric microdilution assay with AlamarBlue as an indicator. Most of the crude extract (71 of 112) exhibited antimicrobial activities against *Candida albicans* ATCC10231. While 57, 29 and 15 of crude extracts exhibited antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* TISTR459 and *Staphylococcus aureus* ATCC25929, respectively. However, none of crude extracts was inhibitory against Gram-negative bacteria including *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and *Shigella sonnei*. The result showed that crude extract produced from strain CNA053 (unidentified isolate) cultivated in medium A exhibited lowest Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value of 4.69 μg/ml against *Bacillus subtilis*, however, it had no bactericidal activity. Crude extracts from strains CNA076 (99% homology to *Streptomyces* sp.) cultivated in medium C inhibited *Staphylococcus aureus* ATCC25929 with MIC of 75 μg/ml, while strains CNA146 (unidentified isolate) and CNA100 (99% homology to *Streptomyces* sp.) cultivated in medium A inhibited *Enterococcus faecalis* TISTR459 with MIC of 37.5 μg/ml. Moreover, the crude extracts produced from strains CNA093 (unidentified isolate) that cultivated in media C and D and CNA097 (unidentified isolate) that cultivated in medium D showed antifungal activity against *Candida albicans* ATCC10231 with MIC of 9.38 μg/ml. Cultivation in medium A provided the highest percentage of active crude extracts with antimicrobial activities at 34.3%. Majority of these crude

extracts were inhibitory against Gram-positive bacteria (47 of 59). Cultivation media B, C and D provided 20, 20 and 19 crude extracts with antifungal activity against (*Candida albicans* ATCC10231), respectively, compared to cultivation medium A which only gave 12 crude extracts with antifungal activity.

Twenty-three active crude extracts selected based on their MIC and minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) values were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). TLC chromatogram of the crude extracts revealed the present of amines, terpenoids and alkaloids, meanwhile nine groups of compounds were classified based on their diode array spectrum.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษาในงานวิจัย การค้นคว้าข้อมูล และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้รวมทั้งให้แนวคิด ในการทำงาน การดำเนินชีวิต และโอกาสที่ดีต่างๆ และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้กำลังใจ รวมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยให้สำเร็จด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ ดร. กรนก อิงคนินันท์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชเวทและพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์จุลินทรีย์ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ท่านคอยเป็นกำลังใจและให้โอกาสทางการศึกษามาโดยตลอด นักศึกษาและเจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตรสำหรับกำลังใจและความรู้สึกที่ดีเสมอมา ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วยที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ธีรวัฒน์ อ่อนลมูล

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(11)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	38
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	39
จุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และวัสดุสารเคมี	39
เครื่องมือ และอุปกรณ์	40
วิธีการทดลอง	41
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	52
4 สรุปผลการทดลอง	79
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก	87
ประวัติผู้เขียน	143

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	จำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท และรา	6
2.	สรุปสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล	28
3.	ผลของคาร์บอนต่อการสร้างเมตาโบไลท์ทุติยภูมิบางชนิด	30
4.	ผลของแหล่งของไนโตรเจนต่อการสร้างเมตาโบไลท์ทุติยภูมิบางชนิด	31
5.	ระบบ feedback ที่มีผลต่อการสร้างเมตาโบไลท์ทุติยภูมิ	32
6.	ประเภทของสารปฏิชีวนะแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี และตัวอย่างของสารในแต่ละประเภท	33
7.	ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด(Total viable count)	47
8.	สารเคมีที่ใช้ทดสอบหากลุ่มสารทางเคมีบนแผ่น TLC	51
9.	ระบบ mobile phase ของ HPLC ที่ใช้สำหรับแยกองค์ประกอบของสารสกัด	51
10.	จำนวนเชื้อแบคทีเรียจากทะเลที่พิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA	53
11.	แอคิโนมัยสีทที่แยกจากตะกอนดินและสิ่งมีชีวิตจากทะเลในประเทศไทยที่เทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA กับฐานข้อมูลธนาคารยีน	54
12.	จำนวนสารสกัดหยาบที่ทดสอบเทียบกับจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล	58
13.	จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงในอาหารต่างชนิด 4 สูตร	61
14.	สารสกัดหยาบที่คัดเลือกจำนวน 23 ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น	65
15.	การจัดกลุ่มของสารสกัดหยาบที่แยกจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลอาศัยข้อมูลตามไดโอดอาเรย์สเปกตรัม	69
16.	สารสกัดที่หาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *B. subtilis, Staphylococcus aureus, E. faecalis, Shigella sonnei, Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 150 μg/ml	89

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

17. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *B. subtilis, Staphylococcus aureus, E. faecalis*, *Shigella sonnei, Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัด 150 µg/ml..................................... 98

18. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *B. subtilis, Staphylococcus aureus, E. faecalis*, *Shigella sonnei, Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสาร 150 µg/ml.. 103

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	สูตรโครงสร้างของ Sulfamethoxazole (a), Ciprofloxacin (b) และ Linezolid (c)	3
2.	สูตรโครงสร้างของ Aspirin (a), Morphine (b), Quinine (c), Clarhamnoside (d), Carijenone (e) และ Violatinctamine (f)	4
3.	สูตรโครงสร้างของ altemicidin	9
4.	สูตรโครงสร้างของ marinone (a) และ debromomarinone (b)	10
5.	สูตรโครงสร้างของ Wailupemycin A (a), Wailupemycin B (b), Wailupemycin C (c), 3-epi-5- deoxyenterocin (d), Deoxyenterocin (e) และ Entrocin (f)	11
6.	สูตรโครงสร้างของ actinoflavoside	12
7.	สูตรโครงสร้างของ thiocoraline	12
8.	สูตรโครงสร้างของ salinamides A (a) และ salinamides B (b)	13
9.	สูตรโครงสร้างของ Iorneamides A (a) และ Iorneamides B (b)	14
10.	สูตรโครงสร้างของ 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide (a), diastereomeric4,11-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olides (b,c) และ4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide (d)	15
11.	สูตรโครงสร้างของ บิวทาโนไลด์ (a,b,c) และ 3-hydroxy-γ-butyrolactones (d,e,f,g)	16
12.	สูตรโครงสร้างของ lomaviticins A (a) และ lomaviticins B (b)	17
13.	สูตรโครงสร้างของ Kahakamides A (a) และ Kahakamides B (b)	18
14.	สูตรโครงสร้างของ Bonactin	19
15.	สูตรโครงสร้างของ Chandrananimycins A (a), Chandrananimycins B (b) และ Chandrananimycins C (c)	19
16.	สูตรโครงสร้างของ Himalomycins A (a) และ Himalomycins B (b)	20
17.	สูตรโครงสร้างของ (R)-10-methyl-6-undecanolide (a) และ (6R,10S)-10-methyl-6-dodecanolide (b)	21
18.	สูตรโครงสร้างของ diazepinomicin	21

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

19. สูตรโครงสร้างของ Helquinoline 22

20. สูตรโครงสร้างของ Abyssomicins 22

21. สูตรโครงสร้างของ trioxacarcins (a,b,c) 23

22. สูตรโครงสร้างของ Frigocyclinone 24

23. สูตรโครงสร้างของ Chloro-dihydroquinones (a, b, c และd) 25

24. สูตรโครงสร้างของ cyanthiwigins B (a), AF (b), AE (c), และ AG (d), R (e), S (f), E (g), และ AE (h) 26

25. สูตรโครงสร้างของ Marinomycin A (a) และ B (b) 27

26. กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะ 35

27. แผนภูมิต้นไม้แบบ Neighbor-joining ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลโดยใช้โปรแกรม CLASTAL X 1.83 ค่าสนับสนุนทางสถิติใช้ bootstrap มีค่าเท่ากับ 1000 ของจำนวนในการทำซ้ำและมีค่า Bar=0.02 K_{nuc} 57

28. จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis, S. aureus, E. faecalis* และ *C. albicans* ที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหารสูตร A, B, C และD 60

29. ร้อยละของจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงในอาหารสูตร A, B, C และ D 61

30. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบ CNA093 เลี้ยงในสูตรอาหาร A, B, C และ D ปรากฏกลุ่มสาร terpenoid, amino acid และ alkaloid 62

31. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบที่พบกลุ่มสารเอมีน และกรดอะมิโน จากการทดสอบกับสาร Ninhydrin 66

32. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบที่พบกลุ่มสารเทอร์พีน และเทอร์พีนอยด์ จากการทดสอบกับสาร Vanillin 67

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
33.	โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบที่พบกลุ่มสารแอลคาลอยด์ จากการทดสอบกับสาร Wagner............	68
34.	โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA083A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1........................	70
35.	ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA083A..	70
36.	โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA078A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2........................	71
37.	ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA078A..	71
38.	โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA097C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3........................	72
39.	ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA097C..	72
40.	โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA146A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 4........................	73
41.	ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA097C..	73
42.	โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA093D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 5........................	74
43.	ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA093D..	74
44.	โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA080A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 6........................	75
45.	ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA080A..	75
46.	โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA069B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 7........................	76
47.	ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA069B..	76

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ | หน้า

48. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA099D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 8........................ 77
49. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA099D.. 77
50. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA100A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 9........................ 78
51. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA100A.. 78
52. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA053B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1........................ 104
53. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA053B.. 104
54. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA074D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1........................ 105
55. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA074D.. 105
56. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA079B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1........................ 106
57. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA079B.. 106
58. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA083A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1........................ 107
59. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA083A.. 107
60. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA077A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2........................ 108
61. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA077A.. 108
62. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA078A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2........................ 109
63. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA078A.. 109

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

64. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA078B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2........................ 110
65. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA078B.. 110
66. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA079C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2........................ 111
67. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA079C.. 111
68. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA079D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2........................ 112
69. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA079D.. 112
70. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA075B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2........................ 113
71. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA075B.. 113
72. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA076B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3........................ 114
73. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA076B.. 114
74. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA086D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3........................ 115
75. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA086D.. 115
76. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA097C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3........................ 116
77. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA097C.. 116
78. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA097D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3........................ 117
79. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA097D.. 117

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

80. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA099C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 4.......................... 118
81. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA099C.. 118
82. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA103D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 4.......................... 119
83. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA103D. 119
84. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA146A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 4.......................... 120
85. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA146A.. 120
86. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA093C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 5.......................... 121
87. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA093C.. 121
88. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA093D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 5.......................... 122
89. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA093D.. 122
90. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA080A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 6.......................... 123
91. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA080A.. 123
92. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA069B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 7.......................... 124
93. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA069B.. 124
94. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA099D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 8.......................... 125
95. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA099D.. 125
96. โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA100A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 9.......................... 126
97. ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA100A.. 126

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะของเซลล์เป็นเส้นใย และมีลักษณะโคโลนีคล้ายกำมะหยี่สีต่างๆ ได้แก่ สีขาว, เหลือง และเทา เป็นต้น นอกจากนี้ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของแบคทีเรียชนิดนี้คือ การที่มีปริมาณ guanine และ cytosine เป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรมในเซลล์มากกว่าร้อยละ 55 (Goodfellow and Brard, 1980) แอคติโนมัยสีทสามารถพบได้ในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ ป่าชายเลน ใต้ทะเล เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความสำคัญทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจเนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้างสาร secondary metabolite ที่สามารถใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ยาปฏิชีวนะ รงควัตถุ และเอนไซม์ เป็นต้น โดยเฉพาะใน Genus *Streptomyces* ที่สามารถผลิตยาปฏิชีวนะ คิดเป็นร้อยละ 75 สารปฏิชีวนะที่มีรายงาน (Miyadoh, 1993) จากคุณสมบัติในการเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายทำให้งานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลซึ่งได้มีการแยกก่อนหน้านี้ เนื่องจากพบว่าในปัจจุบันนี้มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะสำหรับใช้ในการรักษาการติดเชื้อดังกล่าวเกิดเพิ่มมากขึ้นทำให้การรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ มีประสิทธิภาพลดลง ในทางกลับกันการเพิ่มขึ้นของการอุบัติของโรคที่เกิดจากเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) อันเป็นผลมาจากภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immuno compromise) ที่พบเพิ่มมากขึ้น เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้ป่วยที่มีสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (HIV) หรือผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ สามารถทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนจากการติดเชื้อราและรวมทั้งแบคทีเรียทั่วไปได้ง่าย (Boudemagh *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาและวิจัยเพื่อค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อใช้ในการักษาโรคดังกล่าว

อย่างไรก็ตามการศึกษาทางด้านสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยสีทที่ผ่านมาโดยส่วนใหญ่จะเป็นแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดิน หรือแหล่งตัวอย่างที่อยู่บนบกเสียเป็นส่วนใหญ่ การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับแอคติโนมัยสีทที่แยกจากทะเลเริ่มเป็นที่สนใจเมื่อไม่นานมานี้ และผลที่ได้พบว่าแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลนั้นมีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆหลายชนิด และมีความเป็นไปได้มากที่สารปฏิชีวนะที่สร้างโดยแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลจะมีความสำคัญในการพัฒนายาในการรักษาโรคต่างๆ จากตัวอย่างรายงานที่พบว่า

แอคติโนมัยสีทในทะเลเป็นแหล่งของสารชีวภาพ เช่น สารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ caspofungine และ torbinafine (Boudemagh *et al.*, 2005) สารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น frigocyclinone (Bruntner *et al.*, 2005) และ cyanthiwigin B (Peng *et al.*, 2006) สารที่ยับยั้งการเจริญของมะเร็ง เช่น glaciapyrroles (Macherla *et al.*, 2005) สารที่ต้านการอักเสบ เช่น salinamides (Moore *et al.*, 2004) เป็นต้น

เมื่อพิจารณาถึงภูมิศาสตร์ที่ตั้งของประเทศไทยซึ่งอยู่บริเวณใกล้เส้นศูนย์สูตร และมีชายฝั่งทะเลยาวนับพันกิโลเมตรและจัดได้ว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพในทะเลที่สูงมากแห่งหนึ่งของโลกจึงมีความเหมาะสมและเป็นไปได้อย่างยิ่งที่จะศึกษาถึงชนิดและความหลากหลายแอคติโนมัยสีทจากทะเลในประเทศไทย และแนวทางการใช้ประโยชน์ของจุลินทรีย์กลุ่มนี้เพื่อผลิตสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สำหรับพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

บทตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของสารปฏิชีวนะ

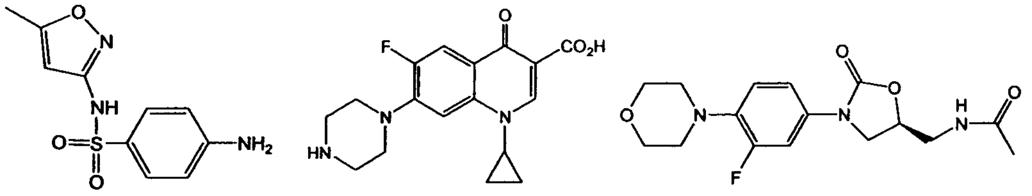
สารปฏิชีวนะ (antibiotic) คือ สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่ความเข้มข้นของสารต่ำ เช่น สารต้านแบคทีเรีย(antibacterial compounds), สารต้านไวรัส (antiviral compounds), สารต้านรา (antifungal compounds) และสารต้านปรสิต (antiparasitic compounds) สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนี้จัดเป็นสารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญแต่มีหน้าที่ และประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยเฉพาะโดยทั่วไปจุลินทรีย์จะผลิตสารปฏิชีวนะในระยะการเจริญช่วงปลาย log phase จนถึงช่วง stationary phase อันเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มมีการเจริญ คุณสมบัติและประโยชน์ที่สำคัญประการหนึ่งของสารปฏิชีวนะคือการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เจริญในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน ซึ่งต้องมีการแข่งขันเพื่อนำมาซึ่งสารอาหาร สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงไปได้ ทำให้จุลินทรีย์ที่สร้างสารดังกล่าวนั้นสามารถแข่งขันและรอดชีวิตอยู่ในธรรมชาติได้ดีหรือนานขึ้น

2. แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการสังเคราะห์ทางเคมี

การสังเคราะห์สารทางเคมีเพื่อผลิตเป็นสารปฏิชีวนะนั้นมีน้อยเมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะจากแหล่งธรรมชาติ ตัวอย่างสารปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น sulfonamides

(ภาพที่ 1a) เป็นสารปฏิชีวนะตัวแรกที่ถูกสังเคราะห์ทางเคมีในปี ค.ศ.1930 ต่อมาในปี ค.ศ. 1962 พบสาร quinolones จากส่วนเหลือของกระบวนการสังเคราะห์สาร chloroquine จากนั้น quinolones (ภาพที่ 1b)ก็ถูกพัฒนาเรื่อยมาจนได้ ciprofloxacin และสารปฏิชีวนะชนิดอื่น ถัดมาในปี ค.ศ. 1979 ได้สังเคราะห์สาร oxazolidinone (ภาพที่ 1c) และได้พัฒนาเป็นสารปฏิชีวนะชนิดอื่น เช่น linezolid เป็นต้น (Blunt *et al.*, 2005)



Sulfamethoxazole (a) Ciprofloxacin (b) Linezolid (c)

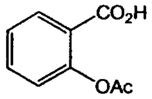
ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ Sulfamethoxazole (a), Ciprofloxacin (b) และ Linezolid (c)

Figure 1. Structures of Sulfamethoxazole (a), Ciprofloxacin (b) and Linezolid (c).

ที่มา : Blunt และคณะ (2005)

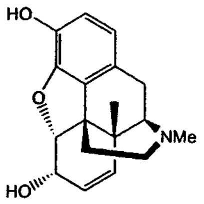
2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติ

ธรรมชาติเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เนื่องจากมีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะได้จาก พืช, สัตว์ และจากจุลินทรีย์ ในกลุ่มพืชได้มีการพัฒนาและใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นยารักษาโรคมานาน โดยเป็นพืชสมุนไพรต่างๆ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้ เช่น aspirin, morphine และ quinine (ภาพที่ 2) เป็นต้น และเริ่มมีความสนใจสิ่งมีชีวิต และจุลินทรีย์จากทะเล ในการเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากในทะเลมีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากสัตว์ เช่น clarhamnoside ได้จากฟองน้ำสายพันธุ์ *Agelas clathrodes*, carijenone ได้จากปะการังสายพันธุ์ *Carijoa multiflora* และสาร violatinctamine ได้จากเพรียงหัวหอมสายพันธุ์ *Cystodytes violatinctus* เป็นต้น ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้จากทะเลมีความสนใจมากในการหาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง รวมทั้งยาที่รักษาโรคชนิดอื่นๆ ด้วย ได้มีรายงานในปี ค.ศ.2003 ได้มีการค้นพบสารชนิดใหม่ที่ได้จากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเล ถึงจำนวน 656 ชนิด (Blunt *et al.*, 2005)



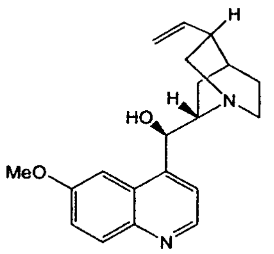
Aspirin

(a)



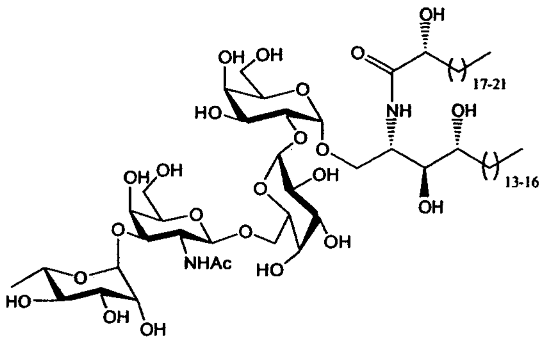
Morphine

(b)



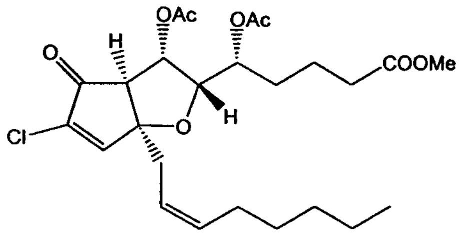
Quinine

(c)



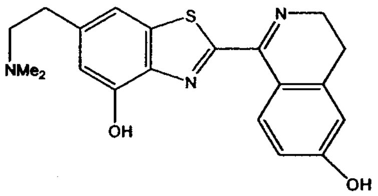
Clarhamnoside

(d)



Carijenone

(e)



Violatinctamine

(f)

ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของ Aspirin (a), Morphine (b), Quinine (c), Clarhamnoside (d), Carijenone (e) และ Violatinctamine (f)

Figure 2. Structures of Aspirin (a), Morphine (b), Quinine (c), Clarhamnoside (d), Carijenone (e) and Violatinctamine (f).

ที่มา : Blunt และคณะ (2005)

หากจะจำแนกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารดังกล่าวจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ รา และแบคทีเรีย

2.2.1 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยเชื้อรา

เชื้อราจัดเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะที่สำคัญหลายชนิด เช่น Penicillins เป็นยาปฏิชีวนะชนิดแรกโดยได้เชื้อ *Penicillium notatum* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในช่วงกว้าง สาร Cephalosporin ที่สร้างโดยเชื้อรา *Cephalosporium* หรือสาร fusidic acid ที่สร้างโดย *Fusidium coccineum* และสารปฏิชีวนะ cyclosporin A ที่สร้างโดย *Trichoderma polysporum* เป็นต้น

2.2.2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

- แบคทีเรียแกรมลบ

แบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้แก่ *Pseudomonas* ที่สามารถผลิตสาร mupirocin, pirrolnitrin และ sulfazecin หรือเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของ Myxobacteria ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น althiomycin, pyrrolnitrin, ambruticin, sorangicin A และ B เป็นต้น

- แบคทีเรียแกรมบวก

แบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ส่วนใหญ่จะได้แก่ *Bacillus* เช่น *B. licheniformis* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะเช่น bacitracin และ *B. polymyxa* จะสร้างสารปฏิชีวนะ polymyxin เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่มของแอคติโนมัยสีทที่จัดว่าเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดกลุ่มหนึ่งในการผลิตสารปฏิชีวนะโดยประมาณกันว่าสารปฏิชีวนะที่มีรายงานร้อยละ 75 จะได้มาจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดิน เช่น *Nocardia lactamdurans* ที่สร้างสารปฏิชีวนะ nocardicin, rifamycins และ ristocetin เป็นต้น ตัวอย่างสารปฏิชีวนะจาก *Sreptomycetes* เช่น actinomycin D, echinomycin, sporaviridin A1, filipin, enterocin, maltophilin และ pyridindolol เป็นต้น ส่วนสารปฏิชีวนะที่ได้จาก *Micromonospora* พบทั้งบนบกและในทะเล เช่น BU-4664L และ Ikarugamycin เป็นต้น

ตารางที่ 1 จำนวนสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแบคทีเรีย, แอคติโนมัยสีท และรา

Table 1. Antibiotics production from bacteria, actinomycetes and fungi.

Taxonomic group	Number of antibiotics
Bacteria, other than actinomycetes	950
Actinomycetes	4600
Fungi	1600

ที่มา : Crueger และ Crueger (1990)

3. ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความหลากหลายอาทิ เช่น ทรงกลม ท่อน และสร้างเส้นสายคล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใย แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่จะสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศหรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) มีทั้งแบบที่เป็นลักษณะสปอร์ที่ไม่มีถุงหุ้ม (conidia), เป็นเม็ดเดียว และเรียงต่อกันเป็นสาย นอกจากนี้ยังมีแบบที่สร้างสปอร์อยู่ในอับสปอร์ (sporangium) แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ ได้แก่สกุล *Oerskoviae* (Cross and Goodfellow, 1973)

การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยทั่วไปจะอาศัยวิธีการตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่ม 4 (William, 1989) ซึ่งได้จำแนกประเภทของแอคติโนมัยสีทออกเป็นกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ประกอบด้วย Nocardioforms, Multilocular sporangium, Actinoplanetes, Streptomycetes, Maduromycetes, Thermomonospora, Thermoactinomycetes และกลุ่มอื่นๆ ที่ยังไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มข้างต้นได้

3.1 Nocardioforms

Nocardioforms เป็นกลุ่มที่เส้นใยมีการแตกหักเป็นแท่งหรือกลม แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 13 สกุล คือ *Nocardia, Rhodococcus, Faenia, Pseudonocardia, Saccharomonospora, Saccharopolyspora, Actinopolyspora, Amycolata, Amycolatopsis, Oerakovia, Nocardioides, Promicromonospora* และ *Intrasporangium* กลุ่มนี้ทุกสกุลเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ ยกเว้น *Oerskoviae* ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ เชื้อในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์เป็นแบบที่ I ที่มีน้ำตาล LL – DAP และ glycine เป็นองค์ประกอบ ในสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* ที่ผนังเซลล์จะมี mycolic acid และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type A (Arabinose และ Galactose)

3.2 Actinomycetes with Multilocular Sporangium

เชื้อในกลุ่มนี้ใช้ลักษณะ multilocular sporangium เป็นหลักในการจำแนกประเภทแยกออกจากเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มอื่นๆ แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 3 สกุล ดังนี้ *Dermatophilus, Geodermatophilus* และ *Frankia* ซึ่งมีลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แตกต่างกัน เชื้อสกุล *Geodermatophilus* มีเส้นสายง่ายๆ ที่ยังไม่พัฒนามากนัก thullus ทั้งหมดสร้างเป็น sporangium ส่วนสกุล *Dermatophilus* เส้นสายจะมีการพัฒนามากขึ้นมีการสร้าง multilocular sporangium แบบยาว และสกุล *Frankia* มีการสร้าง sporangium และ filament ทั้งบริเวณ intercalary swelling ตอนปลายหรือบนกิ่ง lateral branches ทั้ง 3 สกุลจะไม่พบการสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศ

3.3 Actinoplanetes

แอคติโนมัยสีทในกลุ่ม Actinoplanetes มีทั้งสิ้น 5 สกุล ดังนี้ *Actinoplanes, Ampullariella, Pilimelia, Dactylosporangium* และ *Micromonospora* เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนมากอาศัยอยู่ในน้ำ เพราะเป็นกลุ่มที่มีสปอร์เคลื่อนที่ได้ในน้ำในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตยกเว้น *Micromonospora* ลักษณะสำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ ติดสีแกรมบวก non acid fast และมีการเจริญโดยไม่มีการแตกหัก มีการแตกกิ่งก้านแล้วสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่มีผนังกั้น เส้นใยมีการพัฒนาน้อยคือจะเห็นเพียงเส้นใยบางๆ เชื้อในกลุ่มนี้มี DAP ที่ผนังเซลล์แบบ Meso – DAP และ OH – DAP และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type D (Xylose และ Arabinose)

ในสกุล *Micromonospora* ที่สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile spore) ในลักษณะเดี่ยวๆไม่มีก้านหรือมีเพียงสั้นๆมักพบรวมเป็นกลุ่ม มีลักษณะกลม รูปไข่หรือวงรี ผนังหนาบางครั้งพบตุ่มหรือหนามที่ผนัง พวกที่สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (motile spore) ใน sporangia หรือ vesicles ซึ่งมีการพัฒนาให้ไปอยู่ที่ส่วนปลายของ sporangiophore มีทั้งขนาดสั้นและยาว สปอร์มักถูกสร้างอยู่ใน sporangium ที่ถูกปกคุมไว้ด้วยกิ่งก้านที่แตกหัก หรือเส้นใย ลักษณะของ sporogenous hyphae มีลักษณะเส้นตรงหรือขดเป็นเกลียว ส่วนของ mutisporous sporangia มีหลายรูปร่างคือ cylindrical, bottle shaped, flask shaped, campanulate, lobate, digitate, subspherical, ovoid, pyriform หรือ irregular เป็นต้น

3.4 Streptomycetes และสกุลที่เกี่ยวข้อง

แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ดังนี้ *Streptomyces, Streptoverticillium, Kineosporia* และ *Sporichthya* ลักษณะที่สำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ เส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น สามารถสร้างเส้นใยชูขึ้นมาในอากาศ เมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์เป็นลูกโซ่ มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป ผิวของโคโลนีมีลักษณะย่นๆเมื่อมีอายุมาก ที่ผิวหน้าของเส้นใยมีลักษณะเป็นฝุ่นผง ซึ่งก็คือสปอร์ที่สร้างขึ้นนั้นเอง เชื้อในกลุ่มนี้มี DAP ที่ผนังเซลล์เป็นแบบ LL – DAP

3.5 Maduromycetes

แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 7 สกุล ดังนี้ *Actinomadura, Microbispora, Microtetraspora, Planobispora, Planomonospora, Spirillospora* และ *Streptosporangium* แอคติมัยสีทในกลุ่มนี้ต้องการอากาศในการเจริญ เป็นแกรมบวก สร้างเส้นใยที่มีการแตกแขนงไม่มีสปอร์ แต่มีเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศซึ่งมีการสร้าง arthrospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้น หรือใน sporangia ที่มี จำนวนสปอร์ 1 ถึงหลายสปอร์ขึ้นไป ผนังเซลล์เป็นแบบที่ III มี DAP เป็น Meso – DAP (Lechevalier and Lechevalier, 1971) น้ำตาลที่อยู่ในผนังเซลล์คือน้ำตาล 3-O-methyl –D-galactose (madurose)

3.6 Thermomonospora และสกุลที่เกี่ยว

แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล คือ *Thermomonospora, Actinosynnema, Nocardioosis* และ *Streptoalloteichus* กลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ และสร้าง สปอร์อยู่บนเส้นใยที่แตกกิ่งก้านชูขึ้นในอากาศ ผนังเซลล์เป็นแบบที่ III มี DAP เป็น Meso – DAP ไม่มี mycolic acid มี menaquinone ที่มี isoprenoid จำนวน 9 – 10 หน่วย (MK-9, MK-10) การเรียงตัวและลักษณะของสปอร์จะแตกต่างกันไปตามแต่ละสกุล

3.7 Thermoactinomycetes

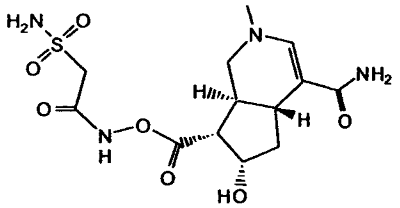
กลุ่มนี้มีเพียง 1 สกุลคือ *Thermoactinomyces* ซึ่งเป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งในกลุ่มนี้จะมีเอ็นโดสปอร์ ที่มีคุณสมบัติของเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียครบถ้วน คือเจริญได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส มี G+C Content ต่ำกว่าพวกแอคติโนมัยสีททั่วๆไป แต่ไปมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพวก *Bacillus* และมีการพัฒนาสร้างเส้นใยอย่างดี แต่มีสัณฐานวิทยาที่ต่างจากพวก *Bacillus* และมีการสร้างเส้นใยชูขึ้นในอากาศ *T. dichotomous* มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองในขณะที่สายพันธุ์อื่นจะมีลักษณะโคโลนีสีขาว ทุกสปีชีส์เป็นพวกต้องการอากาศในการเจริญ เป็นพวกที่ชอบย่อยสลายเศษซาก และเกือบทั้งหมดเป็นพวกที่ชอบเจริญในที่มีอุณหภูมิสูง ผนังเซลล์กลุ่มนี้เป็นแบบที่ III แต่จะไม่มีลักษณะของน้ำตาล และ amino acid ส่วน menaquinone เป็นแบบไม่อิ่มตัวเช่น MK-7 หรือ MK-9 ในสปอร์มี dipicolinic acid อยู่ด้วย

3.8 กลุ่มอื่นๆ

แอคติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ดังนี้ *Glycomyces, Kibdelosporangium, Kitasatosporia* และ *Saccharothrix* ซึ่งยังเป็นกลุ่มที่ยังหาความสัมพันธ์กับแอคติโนมัยสีทกลุ่มอื่นๆไม่ได้

4. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล

ในระยะ 15 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลเพิ่มมากขึ้น เช่น Takahashi และคณะ (1989) แยกเชื้อจากทะเลบริเวณ Gamo, Miyagi ประเทศญี่ปุ่น พบว่า *Streptomyces sioyaensis* สายพันธุ์ SA-1758 ที่แยกได้สามารถสร้างสาร altemicidin (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp.

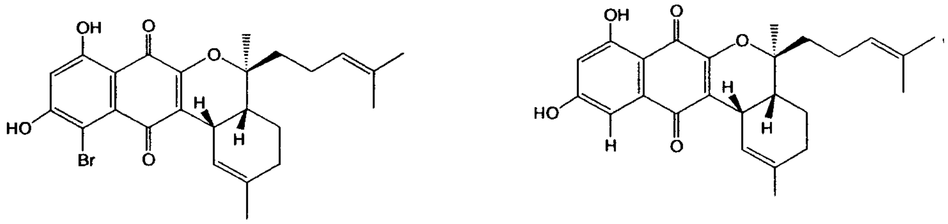


ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของ altemicidin

Figure 3. Structure of altemicidin.

ที่มา : Takahashi และคณะ (1989)

Pathirana และคณะ (1992) รายงานการแยกแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNB-632 จากตะกอนดินบริเวณชายหาด Torrey Pines เมืองซานดิเอโก รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกาโดยวิธี serial dilution พบว่าแอคติโนมัยสีทที่แยกได้มีลักษณะโดยทั่วไปที่ไม่สร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ มีเส้นใย vegetative สีน้ำตาล แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNB-632 นี้สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรที่มี soluble starch เป็นองค์ประกอบหลัก) ซึ่งเป็นสารชนิด sesquiterpenoid naphthoquinones คือ marinone และ debromomarinone (ภาพที่ 4) สารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก โดยที่ marinone มีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis* (MIC เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ debromomarinone มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *S. pneumoniae* และ *S. pyogenes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.0-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



(a) (b)

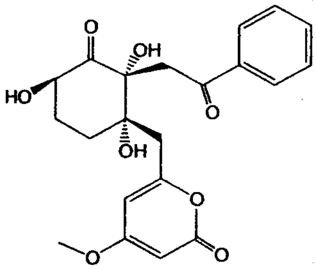
ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของ marinone (a) และ debromomarinone (b)

Figure 4. Structures of marinone (a) and debromomarinone (b).

ที่มา : Pathirana และคณะ (1992)

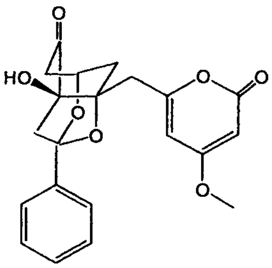
Bernan และคณะ (1994) รายงานการแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ LL-31F508 จากตะกอนดิน ในบริเวณแนวน้ำขึ้นน้ำลงที่ Key West รัฐฟลอริดา โดยพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสาร bioxalomycins ที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus* sp. และ *Enterococcus* sp. โดยใช้ supernatant ที่ได้จากน้ำหมักในการทดสอบ

Sitachitta และคณะ (1996) รายงานแยก *Streptomyces* สายพันธุ์ BD-26T จากตะกอนดินบริเวณชายหาด Wailupe ทางตะวันตกเฉียงใต้ของรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา จากการศึกษาทางลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ ลักษณะของโคโลนีมีผิวเรียบสีขาว และมีเส้นใยแบบ cylindrical arthrospore และเมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว Marine 2216 (Marine Broth 2216, Diffco) พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตสารในกลุ่ม α-pyrone-containing-metabolite ทั้งหมด 6 ชนิด โดยเป็นสารชนิดใหม่ 4 ชนิด ได้แก่ Wailupemycin A, Wailupemycin B, Wailupemycin C, และ3-epi-5- deoxyenterocin และเป็นสารที่มีการรายงานแล้ว 2 ชนิดได้แก่ deoxyenterocin และentrocin (ภาพที่ 5) จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี paper disk method พบว่าสาร Wailupemycin A มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และมี inhibiton zone เท่ากับ 0.5906 นิ้ว (ความเข้มข้นของสารที่ใช้สอบเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) และสาร 3-epi-5-deoxyenterocin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* โดยมีขนาด inhibition zone เท่ากับ 18 มิลลิเมตร (ความเข้มข้นของสารที่ใช้สอบเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อดิสก์เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ส่วนสาร Wailupemycin B และ Wailupemycin C ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

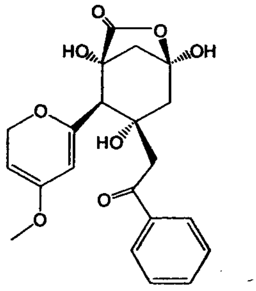


(6)

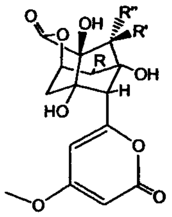
(a)



(b)



(c)



(d) R=R'=H, R"=CCPh

(e) R=H, R'=COPh, R"=H

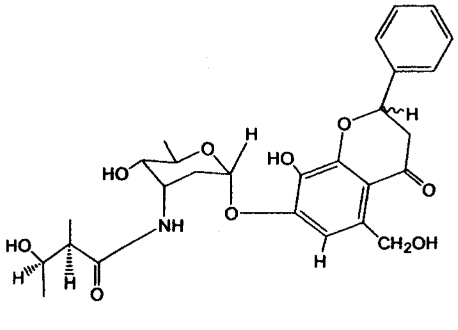
(f) R=OH, R'=COPh, R"=H

ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างของ Wailupemycin A (a), Wailupemycin B (b), Wailupemycin C (c), 3-epi-5- deoxyenterocin (d), Deoxyenterocin (e) และ Entrocin (f)

Figure5. Structures of Wailupemycin A (a), Wailupemycin B (b), Wailupemycin C (c), 3-epi-5- deoxyenterocin (d), Deoxyenterocin (e) and Entrocin (f).

ที่มา : Sitachitta และคณะ (1996)

Jiang และคณะ (1997) แยกแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNB-689 จากตะกอนดินดำจากชายหาดในเมือง Christchurch ประเทศนิวซีแลนด์ โดยวิธี serial dilution จากการจำแนกเชื้อโดยวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์โดยวิธี Fatty Acid Methyl Ester Analysis ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีความคล้ายคลึงกับ *Staptomyces halstedii* เท่ากับ 0.436 และสามารถแยกสาร actinoflavoside (ภาพที่ 6) ได้จากน้ำหมัก โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* ได้ดีอีกทั้งยังยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus pneumoniae*, *S. pyrogenes*, *S. aureus* และ *Micrococcus luteus* ได้เล็กน้อย โดยมีค่า MIC เท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

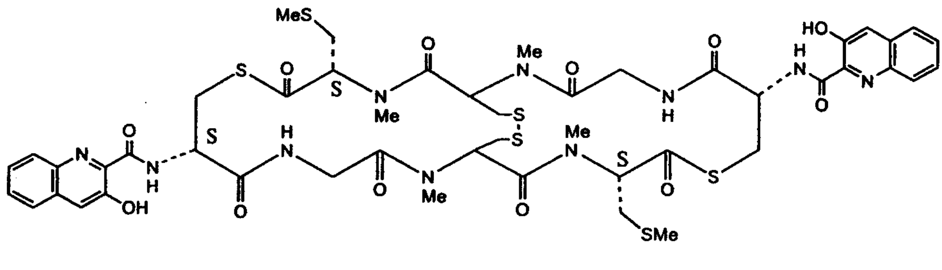


ภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างของ actinoflavoside

Figure 6. Structure of actinoflavoside.

ที่มา : Jiang และคณะ (1997)

Romero และคณะ (1997) รายงานการแยกแอคติโนมัยสีท สายพันธุ์ L-13-ACM2-092 ซึ่งต่อมาได้จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* และมีคุณสมบัติในการสร้างสารชนิดใหม่ในกลุ่ม depsipeptide คือ thiocoraline (ภาพที่ 7) ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด P-388, A-549 และ MEL-28 cell lines และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการออกฤทธิ์ของ thiocoraline จะเกิดจากจับกับ supercoiled DNA และทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ภายในเซลล์

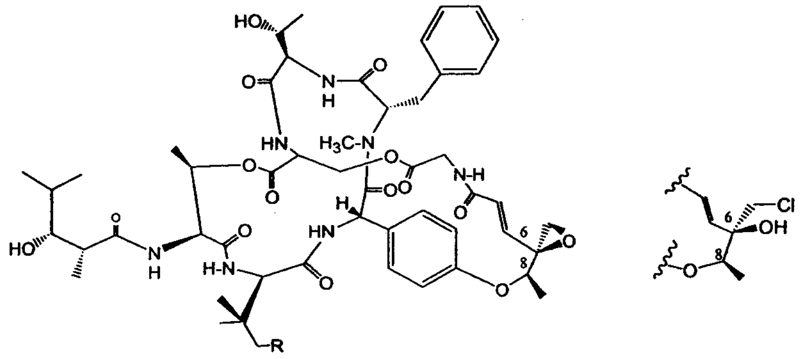


ภาพที่ 7 สูตรโครงสร้างของ thiocoraline

Figure 7. Structure of thiocoraline.

ที่มา : Romero และคณะ (1997)

Moore และคณะ (1999) ได้แยกเชื้อ *Streptomyces* sp. จากผิวด้านนอกของแมงกระพรุน *Cassiopeia xamachana* บริเวณอ่าวฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา และเมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตท มาแยกด้วย reversed phase HPLC จะได้สาร salinamides โดยมีอนุพันธ์ของ salinamides ทั้งหมด 5 ชนิดคือ salinamides A, B, C, D และ E โดยที่ salinamides A และ B (ภาพที่ 8) ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อทดสอบกับเซลล์ใบหูของหนูที่ความเข้มข้น 50.0 ไมโครกรัมต่อ 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้ salinamides A และ B ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus pneumoniae* และ *Staphylococcus pyrogenes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 4.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ



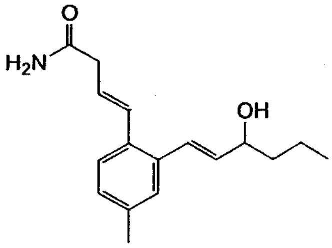
(a) (b)

ภาพที่ 8 สูตรโครงสร้างของ salinamides A (a) และ B (b)

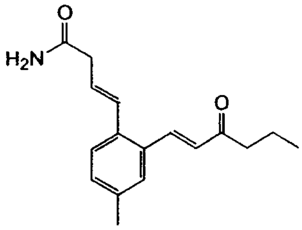
Figure 8. Structures of salinamides A (a) and B (b).

ที่มา : Moore และคณะ (1999)

Capon และคณะ (2000) รายงานการแยกสาร lorneamides A และ B (ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นสารอะโรมาติกเอไมด์ชนิดใหม่ที่อยู่ในกลุ่ม tri-aklyl-substituted benzenes ที่แยกได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ MST-MA190 ซึ่งแยกได้จากทรายจากชายหาดบริเวณเมือง Lorne รัฐวิคตอเรีย ประเทศออสเตรเลีย เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารดังกล่าวพบว่า lorneamides A สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้ โดยมีค่า LD_{99} เท่ากับ 50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



(a)



(b)

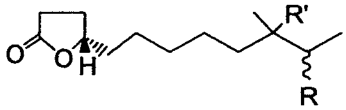
ภาพที่ 9 สูตรโครงสร้างของ Iorneamides A (a) และ B (b)

Figure 9. Structures of Iorneamides A (a) and B (b).

ที่มา : Capon และคณะ (2000)

Mukku และคณะ (2000) ค้นพบสารในกลุ่ม actinomycin ทั้งหมด 7 ชนิด จากน้ำหมักของแอคติโนมัยสีท *Streptomyces coelicolor* สายพันธุ์ B5632 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YMG และจากน้ำหมักของแอคติโนมัยสีท *Streptomyces coelicolor* สายพันธุ์ B3497 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YMG โดยเป็นสารที่รายงานแล้ว 4 ชนิด และเป็นสารกลุ่มบิวทิโนไลด์ชนิดใหม่อีก 3 ชนิด ได้แก่สาร 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide, สาร diastereomeric-4,11-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olides และสารคีโตบิวทาโนไลด์ คือ 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide (ภาพที่ 10) โดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวแยกได้จากตะกอนดินโคลนบริเวณป่าชายเลน เมือง Auckland ประเทศนิวซีแลนด์ และจากการทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Mucor miehei* (Tu284) และ *Streptomyces viridochromogenes* (Tu57) ได้

Zheng และคณะ (2000) ได้ศึกษาการแยกแอคติโนมัยสีทจากสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ เช่น sea hare, ดอกไม้ทะเล และพืชทะเลอื่นๆ พบว่าแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* และ *Micromonospora* โดยสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ถึง 43.6% ของสารสกัดทั้งหมด และนอกจากนี้เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (cytotoxic activity) โดยวิธี MTT assay และ DNA target activity ต่อเซลล์ P-388 lymphocytic leukemia และเซลล์มะเร็งลำไส้ พบว่าร้อยละ 20 ของสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งดังกล่าว



(a) R=H, R'=OH

(b/c) R=OH, R'=H (diastereomeric structure)

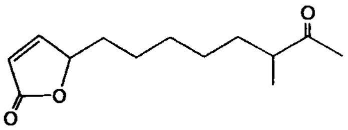
(d) R= ⌇ =O, R'=H

ภาพที่ 10 สูตรโครงสร้างของ 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide (a), diastereomeric-4,11-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olides (b,c) และ 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide (d)

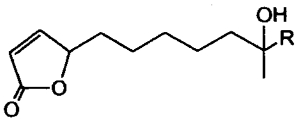
Figure 10. Structures of 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide (a), Diastereomeric-4,11-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olides (b,c) and 4,10- dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide (d).

ที่มา : Mukku และคณะ (2000)

Cho และคณะ (2001) สามารถแยกสารได้ 7 ชนิด โดยจัดอยู่ในกลุ่มบิวทาโนไลด์ 3 ชนิด(ภาพที่ 11a-c) และกลุ่ม 3-hydroxy-γ-butyrolactones 4 ชนิด (ภาพที่ 11d-g) และพบว่าเป็นสารใหม่ 6 ชนิด เป็นกลุ่ม lactone metabolites และสารที่มีการรายงานไว้แล้ว คือ (-)-blastmycinolactol ซึ่งสารทั้งหมดดังกล่าวแยกได้จาก *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดินโคลนใต้ทะเลที่ระดับความลึก 25 เมตร บริเวณ Tongyoung Bay ประเทศเกาหลี ลักษณะที่สำคัญของเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสปอร์สีขาว ที่ไม่มีถุงหุ้มบนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสาร lactone metadolites ทั้ง 7 ชนิด โดยวิธี paper disk diffusion พบว่าสารในกลุ่ม 3-hydroxy-γ-butyrolactones สามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* โดยมีค่า inhibition zone เท่ากับ 19.0 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 50.0 ไมโครกรัมต่อดิสก์

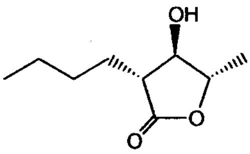


(a)

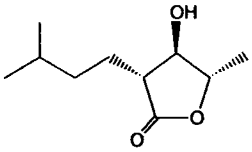


(b) R=CH_3

(c) R=CH_2CH_3

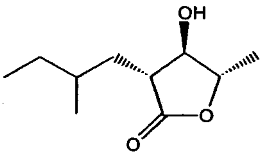


(d)



(e)

(f) epimer at C-2



(g)

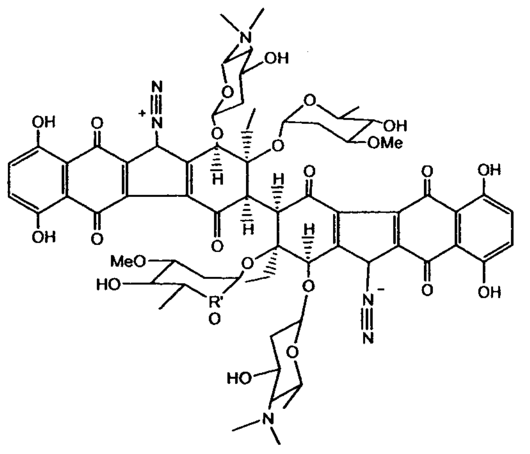
ภาพที่ 11 สูตรโครงสร้างของ butenolides (a,b,c) และ 3-hydroxy-γ-butyrolactones (d, e, f, g)

Figure 11. Structures of butenolides (a,b,c) and 3-hydroxy-γ-butyrolactones (d, e, f, g).

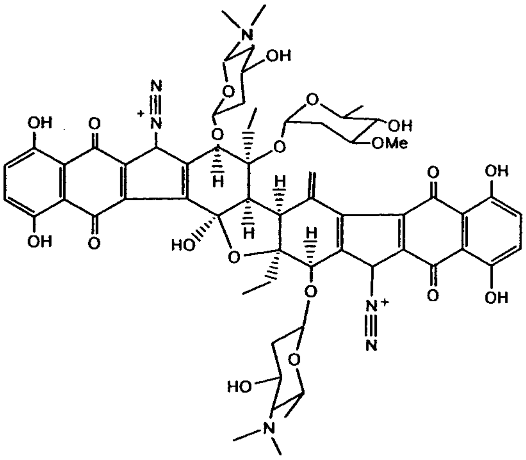
ที่มา : Cho และคณะ (2001)

He และคณะ (2001) ได้รายงานการแยกแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ LL-371366 จากเพรียงหัวหอมในทะเล เมื่อเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารที่มีน้ำทะเลและเรซิน HP20 พบว่าเชื้อสามารถผลิตสาร lomaviticins A และ B (ภาพที่ 12) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus faecillum* โดยมีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Schumacher และคณะ (2001) สามารถแยกเชื้อ *Nocardiopsis dasonvillei* จากตะกอนดินบริเวณชายหาด Kahaka เกาะ Kauai รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ผลิตสาร Kahakamides A และ B (ภาพที่ 13) ซึ่งจัดเป็นสาร indole nucleosides ชนิดใหม่โดยพบว่า kahakamide A สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี disk-diffusion



(a)

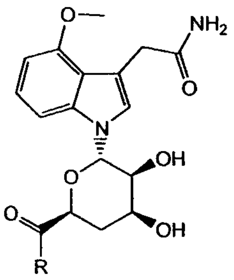


(b)

ภาพที่ 12 สูตรโครงสร้างของ lomaviticins A (a) และ B (b)

Figure 12. Structures of lomaviticins A (a) and B (b).

ที่มา : He และคณะ (2001)



(a) R=OCH_3

(b) R=NH_2

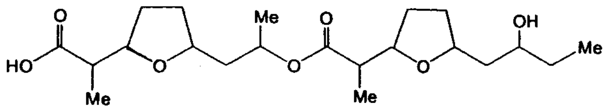
ภาพที่ 13 สูตรโครงสร้างของ Kahakamides A (a) และ B (b)

Figure 13. Structures of Kahakamides A (a) and B (b).

ที่มา : Schumacher และคณะ (2001)

Woo และคณะ (2002) ได้แยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ AP77 จากบ่อเลี้ยงสาหร่าย *Porphyra* spp. ในประเทศญี่ปุ่น เมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว ZoBell2216 พบว่าสามารถแยก heterologous protein ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 หน่วย คือ SAP1, SAP2 และ SAP3 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pyhium porphyrae* ซึ่งก่อโรคจุดแดง (Red Rot) ในสาหร่าย *Porphyra* spp.(MIC เท่ากับ 1.65 ไมโครกรัมต่อดิสก์) และเชื้อรา *Pythium ultimum* (MIC เท่ากับ 6.3 ไมโครกรัมต่อดิสก์) และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งในระดับ *In Vitro* และ *In Vivo* พบว่าโปรตีนดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่าย *Porphyra yezoensis* ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 700.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเป็นพิษต่อเซลล์ dermal fibroblasts ที่ระดับความเข้มข้น 250.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจัดอยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ทั้งสองชนิด จึงมีแนวคิดที่จะนำยีนจาก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ AP77 ไปตัดต่อกับยีน *Porphyra* spp. เพื่อสร้างสาหร่าย *Porphyra* spp. ที่ทนต่อการติดเชื้อ *Pythium porphyrae* ที่ก่อโรคจุดแดง (Rea Rot) ได้ดียิ่งขึ้น

Schumacher และคณะ (2003) ได้แยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ BD21-2 จากตะกอนดินน้ำตื้นบริเวณหาดKailua เกาะ Oahu รัฐฮาวาย และพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตสาร Bonactin (ภาพที่ 14) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniea*, *Staphylococcus aureus*, *Alicagenes faecalis*, *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยมีค่า inhibition zone ในช่วง 7-10 มิลลิเมตร เมื่อใช้ Bonactin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร

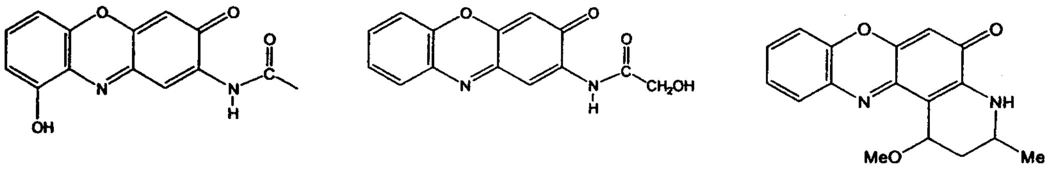


ภาพที่ 14 สูตรโครงสร้างของ Bonactin

Figure 14. Structure of Bonactin.

ที่มา : Schumacher และคณะ (2003)

Maskey และคณะ (2003) ได้รายงานการแยก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ M048 ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ chandrananimycins A , B และ C (ภาพที่ 15) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus subtilis, Chlorella sorokiniana, Chlorella vulgaris, Rhizomucor miehei, Scenedesmus subspicatus* และ *Staphylococcus aureus* รวมทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจิญของเซลล์มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งไตอีกด้วย



(a) (b) (c)

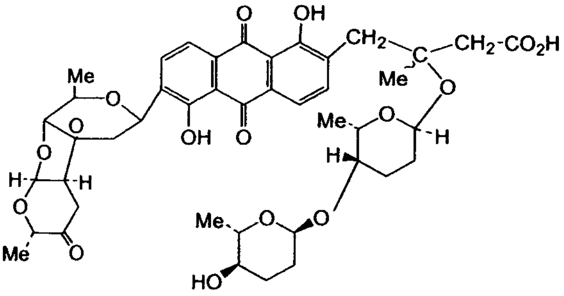
ภาพที่ 15 สูตรโครงสร้างของ Chandrananimycin A (a), B (b) และ C (c)

Figure 15. Structures of Chandrananimycin A (a), B (b) and C (c).

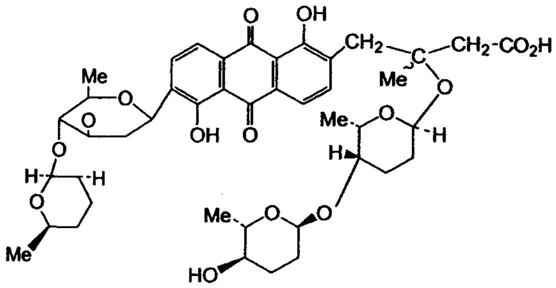
ที่มา : Maskey และคณะ (2003)

Maskey และคณะ (2003) ได้รายงานการแยก *Streptomyces* sp จากทะเลสายพันธุ์ B6921 สามารถผลิตสารในกลุ่มสารปฏิชีวนะ Anthracycline ที่เป็นชนิดใหม่ คือ himalomycins A และ B (ภาพที่ 16) ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างชนิดให้ม่ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร



(a)



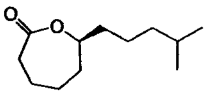
(b)

ภาพที่ 16 สูตรโครงสร้างของ Himalomycins A (a) และ B (b)

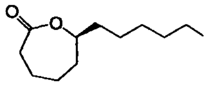
Figure 16. Structure of Himalomycins A (a) and B (b).

ที่มา : Maskey และคณะ (2003)

Strizke และคณะ (2004) สามารถแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B6007 จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลนในประเทศปาปัวนิวกินี จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rDNA ของเชื้อดังกล่าว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albogriseolus* ถึง 99% และจากการทดลองเติมหมู่เมทิลในสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบสาร caprolactones ชนิดใหม่ 2 ชนิดคือ (R)-10-methyl-6-undecanolide และ (6R, 10S)-10-methyl-6-dodecanolide (ภาพที่ 17) และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า caprolactones ทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Sreptomyces olivivaceus*, *Staphylococcus aureus*, *Mucor mihei* และ *Candida albicans* ได้ปานกลางแต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Bacillus subtitlis* นอกจากนี้ caprolactones ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HM0Z (gastric adenocarcinoma), HepG2 (Hepatocellular carcinoma) และ MCF7 (breast adeno-carcinoma) ตลอดไปจนถึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสาหร่าย เช่น *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* และ *Scenedemus subspicatus* ได้อีกด้วย



(a)



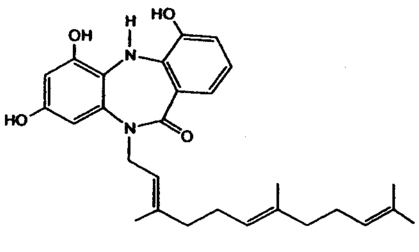
(b)

ภาพที่ 17 สูตรโครงสร้างของ (R)-10-methyl-6-undecanolide (a) และ (6R,10S)-10-methyl-6-dodecanolide (b)

Figure 17. Structures of (R)-10-methyl-6-undecanolide (a) and (6R,10S)-10-methyl-6-dodecanolide (b).

ที่มา : Maskey และคณะ (2003)

Charan และคณะ (2004)ได้รายงานการแยก *Micromonospora* สายพันธุ์ DPJ12 จากเพรียงหัวหอม (Ascidiacea) สายพันธุ์ *Didemnum proliferum* Kott จากเกาะ Shishijima ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Bennett's broth พบสารชนิดใหม่ในกลุ่มของ dibenzodiazepine alkaloid คือ diazepinomicin (ภาพที่ 18) ที่มีโครงสร้างหลักของ dibenzodiazepine และ farnesyl side chain พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

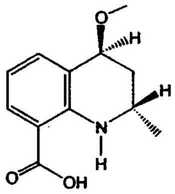


ภาพที่ 18 สูตรโครงสร้างของ diazepinomicin

Figure 18. Structure of diazepinomicin.

ที่มา : Charan และคณะ (2004)

Asolkar และคณะ (2004) ได้รายงานการแยกสาร Helquinoline (ภาพที่ 19) จากแอคติโนมัยสีท *Janibacter limosus* ที่แยกได้จากทะเล และเมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย, เชื้อรา และสาหร่ายของสารดังกล่าว โดยใช้ paper disks ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร และมีความเข้มข้นของสาร 30 มิลลิกรัมต่อดิสค์ พบว่า Helquinoline มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis, Streptomyces viridochromogenase* TÜ 57, *Staphylococcus aureus* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli, Candida albicans* และ *Mucor miehei* รวมทั้งไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris, Chlorella sorokiniana* และ *Scenedesmus subspicatus* อีกด้วย

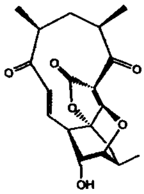


ภาพที่ 19 สูตรโครงสร้างของ Helquinoline

Figure 19. Structure of Helquinoline.

ที่มา : Asolkar และคณะ (2004)

จากรายงานของ Riedlinger และคณะ (2004) ที่ได้แยกสาร abyssomicin (ภาพที่ 20) จาก *Verrucosispora* สายพันธุ์ AB-18-032 ที่แยกได้จากทะเล ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม polycyclic polyketides พบว่าสาร abyssomicin C ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ดี

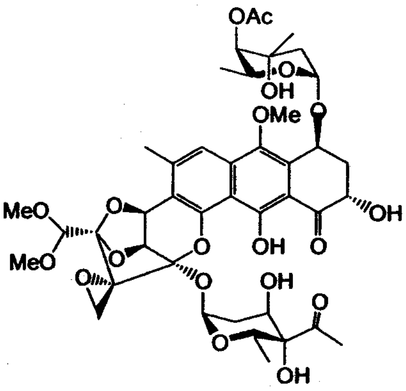


ภาพที่ 20 สูตรโครงสร้างของ Abyssomicin

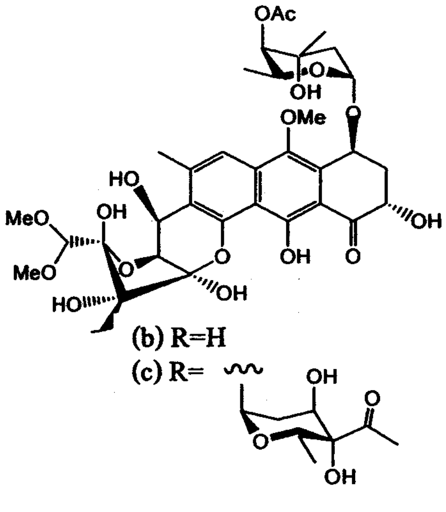
Figure 20. Structure of Abyssomicin.

ที่มา : Riedlinger และคณะ (2004)

จากรายงานของ Maskey และคณะ (2004) ที่แยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B8652 จากทะเล พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสาร trioxacarcins (ภาพที่ 21) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. subtilis* โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA นอกจากนี้สารดังกล่าวยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง sacroma และ leukemia P388 ตลอดจนเชื้อก่อโรคมาลาเรียได้อีกด้วย



(a)

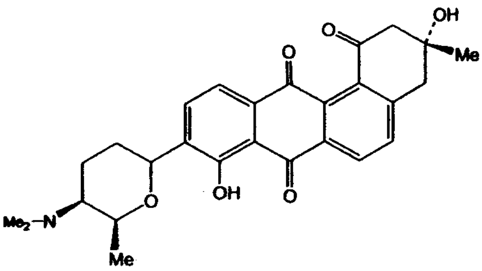


ภาพที่ 21 สูตรโครงสร้างของ trioxacarcins (a, b, c)

Figure 21. Structures of trioxacarcins (a, b, c).

ที่มา : Maskey และคณะ (2004)

จากรายงานของ Bruntner และคณะ (2005) ซึ่งได้ทำการแยก *Streptomyces griseus* สายพันธุ์ NTK 97 จากมหาสมุทรแอนตาร์กติก พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทดังกล่าวสามารถผลิตสาร Frigocyclinone (ภาพที่ 22) ที่มีโครงสร้างซึ่งประกอบด้วย tetrangomycin ต่อกับ aminodeoxysugar ossamine โดยพันธะ C-glycosidic linkage จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดังกล่าวพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

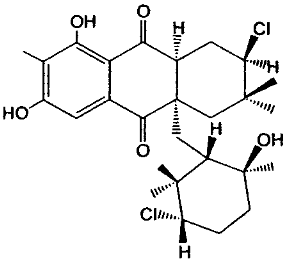


ภาพที่ 22 สูตรโครงสร้างของ Frigocyclinone

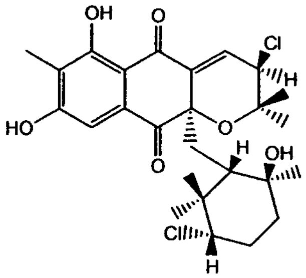
Figure 22. Structure of Frigocyclinone.

ที่มา : Bruntner และคณะ (2005)

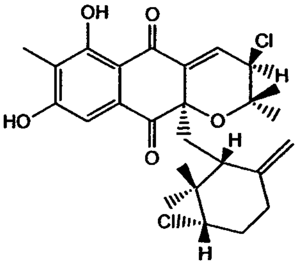
จากรายงานของ Soria-Mercado และคณะ (2005) ที่แยกและจำแนกแอคติโนมัยสีทจากตะกอนดินในทะเล ที่ระดับความลึก 152 เมตร บริเวณเมือง La Jolla รัฐแคลิฟอร์เนีย ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA พบว่าเชื้อดังกล่าวจัดอยู่ใน family *Streptomyctaceae* และสามารถสร้างสาร Chloro-dihydroquinones 4 ชนิด โดยจัดเป็นสารชนิดใหม่ 3 ชนิด (ภาพที่ 23a-c) และพบสารที่เคยมีรายงานแล้ว 1 ชนิด (ภาพที่ 23d) สารทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) และยังพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT-116 ได้อีกด้วย



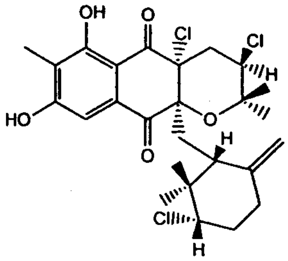
(a)



(b)



(c)



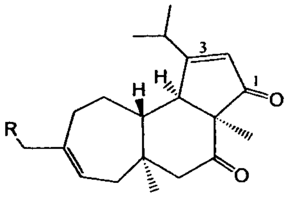
(d)

ภาพที่ 23 สูตรโครงสร้างของ Chloro-dihydroquinones (a, b, c, d)

Figure 23. Structures of Chloro-dihydroquinones (a, b, c, d).

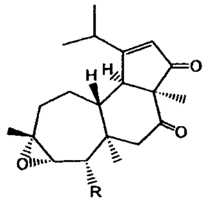
ที่มา : Soria-Mercado และคณะ (2005)

Peng และคณะ (2006) ได้รายงานการแยก *Streptomyces* NRRL 5690 และ *Streptomyces spheroides* จากฟองน้ำสายพันธุ์ *Myrmekioderma styx* บริเวณเกาะจาไมก้า โดยพบว่าสามารถสร้างสาร cyanthiwigin ชนิดใหม่ และ *Streptomyces* NRRL 5690 จะผลิตสาร cyanthiwigins B, AF, AE และ AG (ภาพที่ 24) โดยที่สารที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ คือ cyanthiwigin R (ภาพที่ 24) ส่วน *S. spheroides* สามารถผลิตสาร cyanthiwigin B, cyanthiwigins S, E และ AE (ภาพที่ 24) เมื่อทดสอบฤทธิ์การเจริญของจุลินทรีย์ของ cyanthiwigin B ร่วมกับ curcuphenol พบว่า cyanthiwigin B ส่งผลให้ curcuphenol ออกฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น กล่าวคือสามารถยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* (ค่า IC_{50}>15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), *Cryptococcus neoformans* (ค่า IC_{50}= 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), *Streptomyces aureus* (ค่า IC_{50}= 6.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีค่า IC_{50}= 7.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



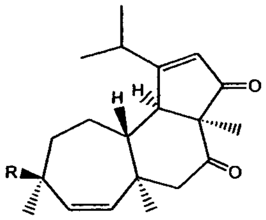
(a) R=H

(b) R=OH



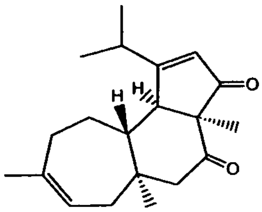
(c) R=H

(d) R=OH

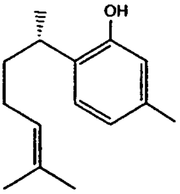


(e) R=OOH

(f) R=OH



(g)



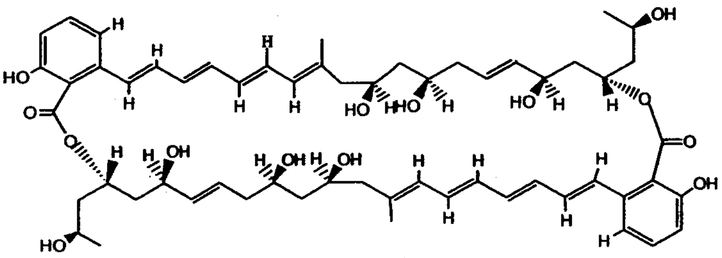
(h)

ภาพที่ 24 สูตรโครงสร้างของ cyanthiwigins B (a), AF (b), AE (c), และ AG (d), R (e), S (f), E (g), และ AE (h)

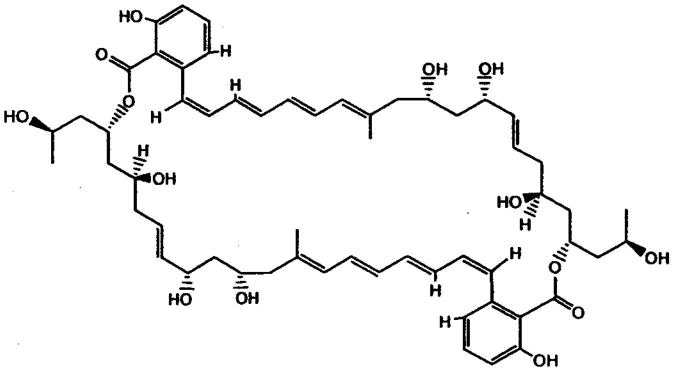
Figure 24. Structures of cyanthiwigins B (a), AF (b), AE (c) และ AG (d), R(e), S (f), E (g) and AE (h).

ที่มา : Peng และคณะ (2006)

จากรายงานของ Kwon และคณะ (2006) ที่ค้นพบโครงสร้างของสารชนิดใหม่ marinomycins A-D จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตะกอนดินในทะเลที่ระดับความลึก 56 เมตร บริเวณเมือง La Jolla รัฐแคลิฟอร์เนีย แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จัดอยู่ในจีนัส *Marinospora* ที่สามารถสร้างสาร marinomycin A และ B (ภาพที่ 25) ซึ่งเป็น macrodiolides ที่ประกอบด้วย dimeric 2-hydroxy-6-alkenyl-benzoin acid lactones ต่อเชื่อมกับสาย tetraene-pentahydroxy polyketide ทั้งนี้สาร marinomycin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดย marinomycin A สามารถยับยั้งการเจริญของ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) ด้วยค่า MIC_{90} เท่ากับ 0.13 μM



(a)



(b)

ภาพที่ 25 สูตรโครงสร้างของ Marinomycin A (a) และ B (b)

Figure 25. Structure of Marinomycin A (a) and B (b).

ที่มา : Kwon และคณะ (2006)

ตารางที่ 2 สรุปสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล

Table 2. Summary of antimicrobial compounds from marine derived actinomycetes.

Strain	Compound	Activitie	Type	Reference
Streptomyces sioyaensis	Altemicidin	Anticancer and antibacterial	Alkaloid	Takahashi *et al.*, 1989
CNB-632	Marinone and debromomarinone	Antibacteria	Alkaloid	Pathirana *et al.*, 1992
Streptomyces sp. LL-31F508	Bioxalomycins	Antibacteria	Quinone	Bernan *et al.*, 1994
Streptomyces sp. BD-26T	α-pyrone-contaning-metabolite	Antibacteria	Pyrone	Sitachitta *et al.*, 1996
CNB-689	Antinoflavoside	Antibacteria	Glycosides	Jiang *et al.*, 1997
Micromonospora	Thiocoraline	Antibacteria and anticancer	Depsipeptide	Romero *et al.*, 1997
Streptomyces sp.	Salinamides A and B	Antibacteria and anti-informatory	Depsipeptide	Moore *et al.*, 1999
MST-MA190	Iorneamides A and B	Antibacteria	Aromatic amide	Capon *et al.*, 2000
Streptomyces coelicolor	Actinomycin	Antibacteria	Polypeptide	Mukku *et al.*, 2000
Streptomyces sp.	Lactone metabolites and 3-hydroxy-γ-butyrolactones	Antifungal	Polypeptide	Cho *et al.*, 2001
LL-371366	Lomaviticins A and B	Antibacteria	Glycoside	He *et al.*, 2001
Nocardiopsis dasonvillei	Kahakamides A and B	Antibacteria	N-glycoside	Schumacher *et al.*, 2001
Streptomyces sp. AP77	Hetrologous protein	Antifungal	Protein	Woo *et al.*, 2002
Streptomyces sp. BD21-2	Bonactin	Antibacteria	Glucosamine	Schumacher *et al.*, 2003

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Table 2. (Continue)

Strain	Compound	Activitie	Type	Reference
Actinomadura sp. M048	Chandrananimycins A and B	Antimicrobial and anticancer	Alkaloid	Maskey *et al.*, 2003
Streptomyces sp. B6921	Himalomycins A and B	Antibacteria	Quinone	Maskey *et al.*, 2003
Streptomyces sp. B6007	(R)-10-methyl-6-undecanolide and (6R,10S)-10-methyl-6-dodecanolide	Antibacteria, anticancer and antialgae	Lactone	Strizke *et al.*, 2004
Micromonospora strain DPJ12	Diazepinomicin	Antibacteria	Alkaloid	Charan *et al.*, 2004
Janibacter limosus	Helquinoline	Antibacteria	Alkaloid	Asolkar *et al.*, 2004
Verrucosispora AB-18-032	Abyssomicins	Antibacteria	Polyketide	Riedlinger *et al.*, 2004
Streptomyces strain B8652	Trioxcarcins	Antibacteria and anticancer	Aminoglycoside	Maskey *et al.*, 2004
Streptomyces griseus NTK 97	Frigocyclione	Antibacteria	Alkaloid	Bruntner *et al.*, 2005
Streptomycetaceae	Chloro-dihydroquinones	Antibacteria and anticancer	Alkaloid	Soria-Mercado *et al.*, 2005
Streptomyces spheroids	Cyanthiwigin	Antibacteria	Diterpene	Peng *et al.*, 2006
Marinospora	Marinomycin A and B	Antibacteria and anticancer	Macrolide	Kwon *et al.*, 2006

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

5.1 แหล่งคาร์บอน

สารที่เป็นแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ โดยจุลินทรีย์จะสลายสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งที่ให้พลังงานที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดที่เล็กลง เช่น กรดอะมิโน, นิวคลีโอไทด์, วิตามิน, คาร์โบไฮเดรต และ กรดไขมัน เป็นต้น จากนั้นสารเหล่านี้จะถูกนำไปสร้างเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีความจำเป็นต่อเซลล์ เช่น โปรตีน, โคเอนไซม์, กรดนิวคลีอิก, มิวโคเปปไทด์, โพลีแซคคาร์ไรด์ และ ไขมัน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างสารต่างๆ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น น้ำตาลกลูโคส, กลีเซอรอล และน้ำตาลซูโคส เป็นต้น

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการสร้างเมตาโบไลท์ทุติยภูมิ

Table 3. Carbon sources regulation for secondary metabolites production.

Secondary metabolite	Essential carbon source	Non- essential carbon source
Actinomycin	Glucose, glycerol	Fructose, galactose
Cephalosporins	Glucose, glycerol, maltose	Sucrose, galactose
Kanamycin	Glucose	Mannose, starch
Penicillin	Glucose, galactose, fructose sucrose	Lactose
Streptomycin	Glucose	
Tetracyclin	Glucose	

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sanchez และ Demain (2002)

5.2 แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยทั่วไปความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบ

อินทรีย์ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ ได้แก่ แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย และไนเตรท เป็นต้น ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้อยู่ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือ ยูเรีย เป็นต้น

ตารางที่ 4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิบางชนิด

Table 4. Nitrogen sources regulation for secondary metabolite production.

Secondary metabolite	Essential nitrogen source	Non-essential nitrogen source
Actinomycin	L-glutamate, L-alanine, L-phenylalanine, D-valine	L-Isoleucine
Actinorhodin	NH_4^+	NH_4^+
Penicillin	NH_4^+, L-lysine	L-glutamate
Rifamycin	NH_4^+	Nitrate
Streptomycin	NH_4^+	L-Proline
Tetracyclin	NH_4^+	Lactose

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sanchez และ Demain (2002)

5.3 แหล่งฟอสเฟต

ในกระบวนการหมักฟอสเฟตโดยทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณฟอสเฟตสูงจะจำกัดการผลิตสารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิของจุลินทรีย์ ดังนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้แหล่งฟอสเฟตของจุลินทรีย์ย่อมจะส่งผลต่อการผลิตสารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก ตัวอย่างเช่น *Streptomyces clavuligerus* จะสามารถสร้างสาร clavulanic acid และ cephamycin แต่เมื่อเติมฟอสเฟตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า clavulanic acid จะถูกยับยั้งจึงสามารถที่จะแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันโดยการควบคุมแหล่งฟอสเฟต ซึ่งสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อการควบคุมแหล่งฟอสเฟต ได้แก่ aminoglycosides, teteacyclines, macrolides, polyenes และ polyether ionophores เป็นต้น

5.4 ระบบ Feedback

ในการสังเคราะห์สารโดยจุลินทรีย์มักจะมีการควบคุมด้วยระบบ feedback control ที่สามารถแยกได้เป็นแบบ feedback inhibition คือ การที่สารสุดท้ายในวิถีสังเคราะห์ไปจับกับเอนไซม์ที่ allosteric site ทำให้ยับยั้งไม่ให้ substrate สามารถจับได้ และแบบ feedback repression คือ การที่สารสุดท้ายไปขัดขวางไม่ให้เกิดการถอดรหัสของยีนมาเป็น mRNA ที่จะสังเคราะห์มาเป็น

เอนไซม์ที่ใช้ในวิถีการสังเคราะห์สารที่ต้องการได้ ตัวอย่างเช่น *Streptomyces fradiae* สร้าง tylosin ซึ่งสารจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ S-adenosyl-L-methionine (SAM):macrocin *O*-methyltransferase เป็นต้น

ตารางที่ 5 ระบบ feedback ที่มีผลต่อการสร้างสารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิ

Table 5. Feedback regulation in secondary metabolite production.

Secondary metabolite	Enzyme	Feedback mechanism
Bacitracin	Bracitracin synthetase	Inhibition
Chloramphenicol	Arylamine synthetase	Repression
Cycloheximide	Unknown	Unknown
Indolmycin	Initial enzyme	Inhibition
Kanamycin	Acetyltransferase	Repression
Puromycin	*O*-Methyltransferase	Inhibition
Tetracycline	Anhydrotetracycline oxygenase	Inhibition
Tyiosin	(SAM):macrocin *O*-methyltransferase	Inhibition

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sanchez และ Demain (2002)

6. การจัดจำแนกและกลไกของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

สารปฏิชีวนะสามารถแบ่งได้เป็นหลายประเภทตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ประเภทของสารปฏิชีวนะแบ่งตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี และตัวอย่างสารในแต่ละประเภท

Table 6. Classification of antibiotics based on their chemical structure and their examples.

Type	Example
1. Carbohydrate-contating antibiotics	
Pure sugars	Nojirimycin
Aminoglycosides	Streptomycin
Orthosomycins	Everninomicin
N-Glycosides	Streptothricin
C-Glycosides	Vancomycin
Glycolipids	Moenomycin
2 Macrocyclic lactones	
Macrolide antibiotics	Erythromycin
Polyene antibiotics	Candicidin
Ansamycins	Rifamycin
Macrotetrolides	Tetranactin
3. Quinones and related antibiotics	
Tetracyclines	Tetracycline
Anthracycline	Adriamycin
Naphthoguinones	Actinorthodin
Benzoquinones	Mitomycin
4. Amino acid and peptides antibiotics	
Amino acid derivertives	Cycloserine
β-Lactam antibiotics	Penicillin
Peptide antibiotics	Bacitracin

ตารางที่ 6 (ต่อ)

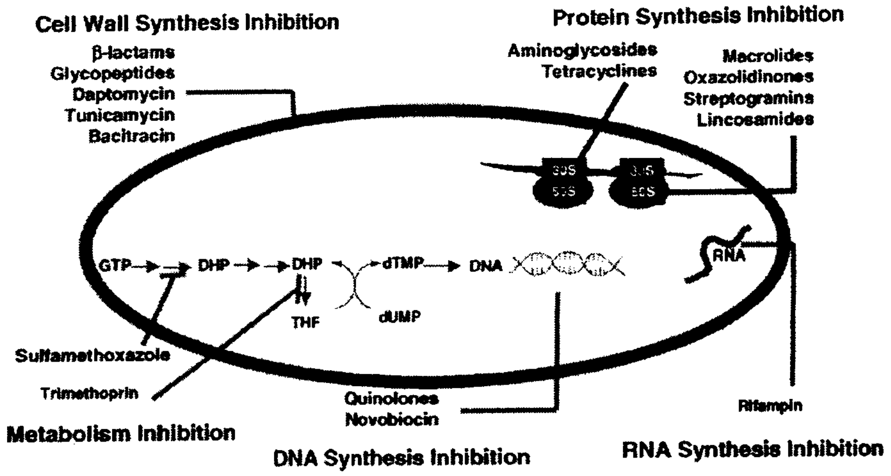
Table 6. (Continue)

Type	Example
Chromopeptides	Actinomycins
Depsipeptides	Valinomycin
Chelate-forming peptides	Bleomycins
5. Heterocyclic antibiotics containing nitrogen	
Nucleoside antibiotics	Polyoxins
6. Heterocyclic antibiotics containing oxygen	
Polyether antibiotics	Monensin
7. Alicyclic derivatives	
Cycloalkane derivatives	Cycloheximide
Steroid antibiotics	Fusidic acid
8. Aromatic antibiotics	
Benzene derivatives	Chloramphenicol
Condensed aromatic antibiotics	Grisiofulvin
Aromatic ether	Novobiocin
9. Aliphatic antibiotics	
Compounds containing phosphorus	Fosfomycins

ที่มา: Crueger และ Crueger (1990)

กลไกของสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ หรือมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แต่มีสารปฏิชีวนะบางชนิดที่มีกลไกลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต่างกันออกไป สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ เช่น penicillin และ glycopeptides เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น chloramphenicol streptomycin และ tetracycline เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ เช่น rifampin และ novobiocin สารปฏิชีวนะที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น polymyxin B และ ketokonazole เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์สารเมตาโบไลท์ที่จำเป็น เช่น sulfanilamide ซึ่งมีโครงสร้างคล้าย para-aminobenzoic acid (PABA) สามารถยับยั้งการสังเคราะห์

กรดโฟลิกซึ่งเป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์พิวรีน ไพริมิดีน และกรดอะมิโนหลายชนิด (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะ

Figure 26. Mode of action of antibacterial compounds.

ที่มา: Singh และ Barrett (2006)

7. วิธีการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

โดยทั่วไปการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นที่นิยมในการระดับห้องปฏิบัติการจะมีอยู่ด้วยกัน 2 ประเภทคือ การทดสอบในอาหารเหลวโดยการเจือจางสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ (dilution broth assay) และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในอาหารแข็งโดยการวัดขนาดบริเวณที่ยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดจากสารที่ทดสอบ โดยทั่วไปนิยมใช้แผ่นกระดาษหรือการเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมสารที่ต้องการทดสอบลงไป

7.1 วิธี dilution broth assay

เป็นวิธีที่นำสารที่ต้องการทดสอบมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมกับเชื้อที่ต้องการทดสอบการยับยั้ง แล้วเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลงไป วิธีการนี้สามารถใช้หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการทดสอบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC)ได้ และสามารถพัฒนาไปสู่วิธีการที่สามารถสังเกตผลการยับยั้งที่สะดวก และรวดเร็วเช่นวิธี colourimetric microdilution broth ซึ่งใช้ AlamarBlue เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ โดยปกติ Alamar Blue จะมีสีครามซึ่งอยู่ในรูป resazurin เมื่อถูกรีดิวซ์จะเปลี่ยนเป็นสีแดง ซึ่งอยู่ในรูป resorufin การ

เปลี่ยนแปลงของสีจากปฏิกิริยารีดักชันจะมีความจำเพาะกับ NADPH / NADP, FAD, FMNH / FMN และ NADH / NAD ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ จึงทำให้วิธีทดสอบดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบอย่างแท้จริง นอกจากนี้ข้อดีของการใช้ Alamar Blue นอกจากไม่เป็นพิษต่อเซลล์แล้วยังไม่ไวต่อการสลายตัวอันเนื่องมาจากแสง และปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีดังกล่าว ยังสามารถสังเกตได้ง่ายด้วยตาเปล่า (สุภานันท์ แซ่ลิ้ม, 2548) ทำให้มีความสะดวกกว่าเมื่อเทียบกับการที่ไม่เติม indicator ซึ่งการสังเกตการเจริญของเชื้อจะทำได้ยากกว่า และต้องอาศัย microplate reader ในการวัดค่าความขุ่นว่าเพื่อบ่งบอกว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตหรือไม่

7.2 วิธีแพร่ของสารที่ต้องการทดสอบ (diffusion assay)

วิธีการจัดการยับยั้งโดยการแพร่ของสารที่ต้องการทดสอบในอาหารแข็ง สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้เช่น (Jorgensen *et al.*, 1999)

7.2.1 Disc diffusion method

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก โดยมีการปรับปรุงมาจากวิธีของ Kirby – Bauer ซึ่งมีวิธีการดังนี้ คือ เตรียมแบคทีเรียทดสอบโดยการใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะตรงยอดโคโลนีของเชื้อทดสอบที่มีลักษณะคล้ายกัน 4 – 5 โคโลนี ใส่ลงใน tryptic soy broth หรือ Mueller Hinton broth ซึ่งมีปริมาณหลอดละ 2 – 5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 5 ชั่วโมง นำไปเทียบความขุ่นมาตรฐาน หรือ standard McFarland หรืออาจวัด optical density ด้วย spectrophotometer ที่ 625 นาโนเมตร (ควรมีค่า O.D. ระหว่าง 0.08 – 1.10) ถ้าเชื้อขุ่นมากไปควรเจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อหรืออาหารเหลว จนได้ปริมาณเชื้อประมาณ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเพาะลงบนอาหาร โดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

- ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อพอหมาด ๆ แล้วนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จนทั่ว วางทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง
- ใช้ปิเปตดูดเชื้อมาเทราดบนผิวหน้าอาหารทดสอบจนทั่ว (spread plate) ดูดเชื้อส่วนเกินทิ้ง วางไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง
- ใช้วิธีการ pour plate โดยผสมเชื้อในอาหารแข็งทดสอบที่หลอมเหลวนำมาเทลงในจานอาหาร หรืออาจใช้วิธี double layer คือเตรียมอาหารทดสอบ 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียว ส่วนชั้นบนเป็นอาหารแข็งที่หลอมเหลวผสมเชื้อทดสอบ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัวและผิวหน้าอาหารแห้งหลังจากนั้นนำแผ่นกระดาษกรองชุบหรือหยดสารละลายปฏิชีวนะมาวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อทดสอบตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

7.2.2 Agar well method

เป็นวิธีการทดสอบที่เตรียมอาหารวุ้นทดสอบเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างเป็น base layer ชั้นบนเป็น seed layer ซึ่งจะเพาะเชื้อทดสอบไว้ เจาะวุ้นชั้นบนให้เป็นหลุม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ใส่สารละลายปฏิชีวนะจนเต็มหลุม บ่มเพาะเชื้อ ตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

7.3 วิธีใช้แท่งวุ้น (agar plug method)

- วิธีการที่ใช้เชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะเป็น agar plug คือ เลี้ยงเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะและขับออกมาในอาหารวุ้น จากนั้นจึงเจาะวุ้นออกเป็นแท่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 – 1.0 เซนติเมตร นำมาวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

- วิธีการใช้เชื้อทดสอบเป็น agar plug ทำโดยเลี้ยงเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะโดยการ streak เชื้อบนอาหารแข็งเป็นบริเวณครึ่งหนึ่งของจานอาหาร บ่มเพาะให้เชื้อเจริญเต็มที่ นำแท่งวุ้นที่มีเชื้อทดสอบ (มักจะเป็นเชื้อทดสอบรา) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางลงบริเวณตรงกลางจานอาหาร บ่มเพาะเชื้อระยะหนึ่งสังเกตการเจริญของเชื้อทดสอบ (Anderson *et al.*, 2000)

7.4 Droplet method

เป็นวิธีการที่ใช้ peristatic pump หยดอาหารแข็งที่อยู่ในสภาพหลอมเหลวปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารโดยให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์ กลางประมาณ 15 มิลลิเมตร เมื่ออาหารแข็งตัว นำเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะมาเพาะลงบนผิวหน้าแผ่นอาหารดังกล่าว บ่มเพาะจนเชื้อเจริญเต็มที่ จึงเทอาหารแข็ง NA หลอมเหลวที่ผสมเชื้อทดสอบราดบนแผ่นวุ้นในจานอาหาร บ่มเพาะเชื้อระยะหนึ่ง จึงตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

7.5 Cross streak method

เพาะเลี้ยงเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะโดยการ streak เป็นแนวเส้นตรงบนผิวอาหารแข็ง บ่มเพาะเชื้อจนเจริญเต็มที่ จากนั้นนำเชื้อทดสอบมา streak เป็นแนวตั้งฉากกับเชื้อที่เลี้ยงไว้ บ่มเพาะเชื้อระยะหนึ่ง ตรวจ inhibition zone ที่เกิดขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการทดสอบโดยวิธี dilution broth assay และวิธีแพร่ (diffusion assay) พบว่าวิธีโดย dilution broth assay จะใช้ปริมาณสาร และอาหารที่จะทดสอบนั้นมีปริมาณที่ทดสอบนั้นน้อยกว่าการทดสอบโดยวิธีการแพร่ และระยะเวลาในการสังเกตผลจะใช้เวลาที่สั้นกว่า ส่วนวิธีทดสอบโดยการแพร่นั้นจะสามารถสังเกตผลโดยดูผลในรูปของการเจริญเป็นโคโลนี หรือการเกิดวงใส ทำให้ทราบถึงลักษณะของโคโลนีที่มีการผิดปกติไปจากเดิม

วัตถุประสงค์

1. จำแนกสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากทะเลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA
2. คัดกรองสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จากทะเล
3. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 โดยใช้เทคนิค TLC และ HPLC-DAD

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

จุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และวัสดุสารเคมี

1. เชื้อแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการทดสอบเป็นเชื้อที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลได้แยกจากตัวอย่าง ตะกอนดิน ซากพืช ซากสัตว์ ฟองน้ำ ปะการัง เป็นต้น จำนวน 49 สายพันธุ์ ตัวอย่างเชื้อจะถูกเก็บรักษา โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA เป็นเวลา 7 วันจนเชื้อสร้างสปอร์จึงตัดชิ้นวุ้นเก็บใน กลีเซอรอล 50 % ใน micro tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทีย์ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเภสัชเวท และเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

- *Bacillus subtilis*
- *Staphylococus aureus* ATCC25929
- *Enterococcus faecalis* TISTR459
- *Shigella sonnei*
- *Salmonella* Typhimurium
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853
- *Candida albicans* ATCC10231

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 อาหารสำหรับผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

- อาหารสูตร A (มีองค์ประกอบของ ตะกอนดิน, สาหร่าย และเปลือกกุ้งป่น)
- อาหารสูตร B (มีองค์ประกอบของ glycerol และ soytone)
- อาหารสูตร C (มีองค์ประกอบของ polypeptone, soluble starch และyeast extract)
- อาหารสูตร D (มีองค์ประกอบของ peptone และ yeast extract)

3.3 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

- Nutrient broth (Himedia, India)
- RPMI1640 (Invitrogent, Brazil)

4. สารเคมี

- Ethyl acetate (Lab-scan, Ireland)
- Methanol (Lab-scan, Ireland)
- Acetonitrile (Lab-scan, Ireland))
- Dichloromethane ((Lab-scan, Ireland)
- Isopropanol (Lab-scan, Ireland)
- Water (Lab-scan, Ireland)
- Amphotericin B (Fluka, Switzerland)
- Vancomycin (Fluka, Switzerland)
- Resazurin (Sigma, Germany)
- Vanillin (Fluka, Switzerland)
- Ninhydrin (Sigma, Germany)
- Potassium Iodide (Baker, USA)

เครื่องมือ และอุปกรณ์

- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubation) รุ่น VS-8480SRN (LMS, Japan)
- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) รุ่น R-200 (Buchi, Switzerland)
- เครื่อง Analytical High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100, ChemStation software (version A8.01), quaternary pump (Agilent G1313A) ตรวจวัดด้วย diode array detecter (Agilent G1315A) และมี auto sample (Agilent G1313A) เป็น injector port (Agilent, USA)
- เครื่อง PCR รุ่น GeneAmp PCR System 2400 (PerkinElmer, USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Atomic absorption spectrophotometer) รุ่น Analyst 100 Spectrometer (PerkinEmer, USA)
- คอลัมน์ชนิด reversed phase: Nucleosil 100-5 C18, 5µl, 4 × 250 mm (Agilent, USA)
- TLC Alumina Sheets silica gel 60 F_{254} (Fluka, Switzerland)

วิธีการทดลอง

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนมัยสีทโดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

การเทียบเคียงสายพันธุ์ของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลจะอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยนำเซลล์ของแอคติโนมัยสีทที่เจริญในอาหารเหลว NA นำมาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer เป็น universal primer จะวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยเครื่อง automated sequencer ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาเทียบเคียงกับฐานข้อมูลของ NCBI BLAST และสร้างแผนภูมิต้นไม้เพื่อเทียบเคียงแอคติโนมัยสีทที่ได้จากทะเล

ขั้นตอนการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

การเลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลว

↓

สกัดดีเอ็นเอ

↓

เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR

↓

ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

↓

วิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ automated sequencer

↓

วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ16S rDNA

↓

จัดจำแนกสายพันธ์แอคติโนมัยสีทโดยดู Phylogenetic tree

1.1 การเลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลว

1.1.1 แอคติโนมัยสีทที่จะนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์จะถูกเก็บในกลีเซอรอล 50 % ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างแอคติโนมัยสีทที่เก็บในหลอด micro tube นำมาวางที่อุณหภูมิห้องจนหายเย็น จากนั้นเขี่ยสปอร์ลงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

1.1.2 จากข้อ 1.1.1 นำเชื้อมาเลี้ยงลงในอาหารเหลว NA โดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญประมาณ 5 ชิ้น ถ่ายลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรีย

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียจะใช้ Wizard® genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) ตามวิธีการดังนี้

1.2.1 โดยนำแอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงในอาหารเหลวจากข้อ 1.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้

1.2.2 เติม 10 มิลลิกรัม ของ Lysozyme ที่ละลายใน 50 mM EDTA ปริมาตร 480 ไมโครลิตร ลงในตะกอนที่แยกได้ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตจากนั้นเติม lytic enzyme ปริมาตร 120 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต และนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที

1.2.3 นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติม nuclei lysis solution ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.2.4 ทิ้งให้ตัวอย่างเย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม RNase solution ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 - 60 นาที

1.2.5 ทิ้งให้ตัวอย่างเย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม protein precipitation solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน นำไป vortex เป็นเวลา 20 วินาที

1.2.6 บ่มตัวอย่างบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนที่ใสออกมาและนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง

1.2.7 ดีเอ็นเอจะอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลว จะถ่ายตัวอย่างลงใน micro centrifuge หลอดใหม่ จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งสังเกตเห็นสายดีเอ็นเอ

1.2.8 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวออกอย่างระมัดระวังและใช้กระดาษซับบริเวณปากหลอดที่มีของเหลวเหลืออยู่

1.2.9 ล้างดีอีนเอโดยการเติม ethanol 70% ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 - 15 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวออกอย่างระมัดระวังและทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง

1.2.10 เติม DNA rehydration solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

1.2.11 เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียส

1.3 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA โดยเทคนิค PCR

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ DNA replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ เพื่อไปจับกับสายดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีนตรงตำแหน่งที่ต้องการ ซึ่ง primer ที่ใช้ คือ 27F (5’AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3’) และ 1492R (5’GGTTACCTTGTTA CACTT 3’) (Magarvey *et al.*, 2004)

ในการเพิ่มปริมาณยีนใช้ GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) จะเติมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยากับตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดของแอคติโนมัยสีท โดยเติมดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร, *Ex*Taq PCR บัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, deoxynucleoside triphosphate mixture (dNTP mixture) ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อหนึ่งไพรเมอร์, Ex*Taq* polymerase ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และน้ำที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 31.75 ไมโครลิตร ปริมาตรร่วมทั้งหมด 50 ไมโครลิตรโดยเตรียมสารละลายในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตรผสมสารละลายให้เข้ากันจากนั้นใส่ตัวอย่างในเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที จากนั้นเริ่มเพิ่มปริมาณยีนโดยทำปฏิกิริยา 25 รอบ เริ่มในขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที เมื่อเสร็จจากการทำปฏิกิริยาทั้ง 25 รอบ อุณหภูมิจะคงที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะคงที่ที่ 4 องศาเซลเซียส (Magarvey *et al.*, 2004)

1.4 การทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

การทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นจะใช้ GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) ตามวิธีการดังนี้

1.4.1 นำ GFX column ใส่ลงใน collection tube เติม capture buffer ลงใน GFX column ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

1.4.2 เติมสารละลาย DNA (สูงสุด 100 ไมโครลิตร) ลงใน GFX column ถ้าเป็นการทำบริสุทธิ์ของตัวอย่าง PCR หลีกเลี่ยงการเติม mineral oil ลงไปใน column

1.4.3 ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง 4-6 ครั้ง

1.4.4 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดนาน 30 วินาที

1.4.5 ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube จากนั้นนำส่วน GFX column ใส่กลับคืน

1.4.6 เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดนาน 30 วินาที

1.4.7 ทิ้งส่วน collection tube แล้วนำส่วน GFX column ย้ายใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สะอาด

1.4.8 เติม elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, TE pH 8.0 หรือน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใน GFX column จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

1.4.9 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะอยู่ใน microcentrifuge tube

1.5 การแยกดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้น (Agarose gel electrophoresis)

ขั้นตอนในส่วนของการสกัดดีเอ็นเอ, เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR และทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่ได้เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานโดยแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยเทียบขนาดดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lamda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII Marker ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร และเติมสีย้อม ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แยกบนแผ่นวุ้น 1% agarose โดยใช้ TAE เป็นอิเล็กโทรไลท์ ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที (Sambrook and Russell, 2001)

1.6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่แยกได้กับฐานข้อมูล

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างจะทำโดยการส่งดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ที่ Macrogen Inc ที่ประเทศเกาหลีด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ automated sequencer ABI 3700 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์ 27F เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้กับฐานข้อมูลของ NCBI

BLAST ผล Blast ที่ได้จะแสดงลำดับความเหมือนของเชื้อที่ต้องการเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีในฐานข้อมูลโดยค่าที่เชื่อถือได้ต้องมากว่า 98% โดยในบรรทัดแรกจัดเป็นเชื้อที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันกับเชื้อที่ต้องการเปรียบเทียบมากที่สุด และมีส่วนที่แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของเชื้อ

1.7 การทำ Phylogenetic tree

การทำจะใช้โปรแกรม Clustal X เวอร์ชั่น 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) จะนำลำดับเบสที่ทำการตัดต่อด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) แล้วนำมาคัดลอกลงใน Notepad หาลำดับเบสของเชื้อที่ต้องการนำมาเปรียบเทียบจาก http://srs.ddbj.nig.ac.jp/indexe.html ซึ่งเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่ต้องการเปรียบเทียบ ได้มาจากผลของการ Blast ในเว็บไซต์ของ NCBI หลังจากได้ชื่อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อที่ต้องการเปรียบเทียบแล้วให้ นำมาค้นหาจากเว็บไซต์ดังกล่าว ควรเลือกเฉพาะเชื้อที่เป็น Type stain มาทำการเปรียบเทียบโดยแนะนำให้ค้นหาโดยใช้อินเตอร์เน็ต เช่น จากตัวอย่าง Type stain ของ *Flexithrix dorotheae* คือ Ifo 15987 คัดลอกลำดับเบสทั้งหมดลงใน Notepad ได้ลำดับเบสของเชื้อที่ต้องการทำการเปรียบเทียบ โดยชื่อลำดับเบสจะต้องอยู่ในรูปแบบ Fasta ทำซ้ำแต่เปลี่ยนเชื้อไปจนกว่าจะครบตามที่ต้องการจะเปรียบเทียบ เมื่อได้ชื่อครบตามที่ต้องการแล้ว จากนั้นทำการ load sequeunce แล้วเลือก File Note pad ที่มีข้อมูลลำดับเบสที่ต้องการเปรียบเทียบ เลือก ALIGN เพื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อไปที่ละคู่จนครบ จากนั้นเข้า Bioedit เพื่อทำการลบช่องว่างและ N ของลำดับเบสทั้งหมด จานั้นเข้าสู่โปรแกรม clustalX.exe เปิด file*.aln ใหม่ที่เราทำการลบช่องว่างและ N ของลำดับเบสแล้ว แล้วเลือก bootstrab N-J tree เลือก NJ plot เข้าไปที่ file *.phb แล้วเลือกรูปแบบของ Phylogenetic tree ที่ต้องการ

2. การคัดเลือกสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลและผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2.1 การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท

นำแอคติโนมัยสีทที่จะนำมาคัดเลือกหาสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์นำมาจาก stocks ที่เก็บในกลีเซอรอล 50 % ในหลอด micro tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำเชื้อวางที่อุณหภูมิห้องจนหายเย็น จากนั้นเขี่ยสปอร์ลงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาเลี้ยงในอาหารเหลว 4 ชนิด เพื่อผลิตสารสกัดหยาบ โดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญประมาณ 5 ชิ้น ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ 4 ชนิด คือ อาหารสูตร A (ตะกอนดิน 1 กรัม, ผงสาหร่าย 2 กรัม และเปลือกกุ้งป่น 1 กรัม) (ดัดแปลงจาก Mitchell *et al.*, 2004), B (glycerol 2 กรัม และ soytone 1 กรัม) (ดัดแปลงจาก Capon *et al.*, 2000), C (polypeptone 1 กรัม, soluble starch 1 กรัม และ yeast extracts 1 กรัม)

(ดัดแปลงจาก Moor *et al.*, 1999) และ D (peptone 0.5 กรัม และ yeast extract 0.5 กรัม) (ดัดแปลงจาก Imada and Okami, 1994) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรจะมีน้ำทะเลปริมาตร 100 มิลลิลิตรเป็นองค์ประกอบและบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกัน คือ A, B, C และ D ที่เตรียมในน้ำทะเลปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน (ดัดแปลงจาก Manam *et al.*, 2005) แล้วนำไปสกัดสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 2.2

2.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีท

นำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน จากข้อ 2.1 รวมทั้งเซลล์มาสกัดด้วยสารละลายเอทิลอะซีเตทปริมาตร 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1) ในกรวยแยก เก็บส่วนเอทิลอะซีเตทแล้วนำส่วนน้ำ 100 มิลลิลิตร มาสกัดซ้ำด้วยเอทิลอะซีเตทอีก 100 มิลลิลิตร นำส่วนเอทิลอะซีเตททั้งหมดที่ได้มารวมกัน แล้วระเหยเอาเอทิลอะซีเตทออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ชะสารที่ได้ด้วยเอทิลอะซีเตท และถ่ายลงใน vial ที่ทราบน้ำหนักแห้งจากนั้นทำการระเหยเอาตัวสารละลายออกไปอีกครั้ง จะได้สารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทที่ทราบน้ำหนักแห้ง (Peng *et al.*, 2006) ทำการเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 25.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวทำละลายเมทานอลเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 2.3

2.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี colorimetric microdilution assay

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี colorimetric microdilution assay โดยใช้ AlamarBlue เป็นอินดิเคเตอร์ทดสอบบนจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม (ดัดแปลงจาก Franzblau *et al.*, 1998) ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการทดสอบทั้งหมด 7 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococus aureus* ATCC25929, *Enterococcus faecalis* TISTR459, *Shigella sonnei*, *Salmonella* Typhimurium และ *Candida albicans* ATCC10231 ที่เก็บรักษาในกลีเซอรอล 50% ที่ -20 องศาเซลเซียส นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง NA ยกเว้นยีสต์เลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อที่บริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว RPMI 1640 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อเตียมเชื้อสำหรับใช้ในการทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

- การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงดังแสดงในตารางที่ 7 จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI1640 จนได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 CFU/ml ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่สำหรับใช้ทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

- การเตรียมเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมานับปริมาณเซลล์โดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ (direct microscopic count) โดยใช้ hemacytometer เตรียมปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 CFU/ml ของเชื้อยีสต์สำหรับทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากนั้นเติมสาร AlamarBlue ในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อ 1 มิลลิลิตรของสารแขวนลอยเชื้อแล้วผสมให้เข้ากันเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังนี้

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count)

Table 7. Absorbance at 600 nm of bacteria and bacteria were total viable count.

microorganism	OD_{600}	CFU/ml
Bacillus subtilis	0.58	3.0×10^7
Staphylococcus aureus	0.26	2.1×10^7
Enterococcus faecalis	0.27	2.0×10^7
Salmonella Typhimurium	0.28	2.1×10^7
Shigella sonnei	0.34	2.8×10^7
Psuedomnas aruginosa	0.23	2.2×10^7

2.3.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2.3.1.1 เตรียมสารสกัดหยาบให้มีความเข้มเข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นเติมสารสกัดหยาบลงในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม หลุมละ 0.6 ไมโครลิตร รอจนเมทาลนอลระเหยจนหมดให้เหลือแต่สารสกัดหยาบที่ก้นหลุม จากนั้นละลายสารสกัดหยาบที่แห้งด้วยการเติมสาร DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

2.3.1.2 ปิเปตสารแขวนลอยที่มีเชื้อผสมจากข้อ 2.3 ปริมาตรหลุมละ 90 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม ที่มีสารสกัดหยาบ โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยการ

ดูดสารละลายขึ้นลงซ้ำๆ อย่างน้อย 15 ครั้ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของ AlamarBlue

2.3.1.3 ทำชุดควบคุมซึ่งทำทุกอย่างเหมือนการทดสอบ ยกเว้นแต่ไม่เติมสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยสีท โดยมี negative control ที่ไม่เติมสารใดๆ ในหลุมที่มีจุลินทรีย์ทดสอบ สำหรับการทำ positive control จะทำโดยการเติมสารปฏิชีวนะมาตรฐาน Vancomycin สำหรับทดสอบกับแบคทีเรีย และ Amphotericin B สำหรับทดสอบกับยีสต์ ให้สารปฏิชีวนะมีความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของ AlamarBlue หากไม่มีการเปลี่ยนสีของ AlarmarBlue ที่ยังเป็นสีน้ำเงินอยู่ แสดงว่าจุลินทรีย์นั้นถูกยับยั้งด้วยสารที่ใช้ทดสอบ

2.3.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ได้

2.3.2.1 นำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากข้อ 2.3.1 มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเตรียมสารสกัดหยาบให้มีความเข้มเข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นใส่สารบนจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม โดยในจานเพาะเชื้อมีทั้งหมด 8 แถว แถวละ 12 หลุม เติมสารสกัดหยาบหลุมละ 1.2 ไมโครลิตร เฉพาะในแถวแรก จะทดสอบสารได้ 9 ตัวอย่าง ส่วนอีก 3 หลุมที่เหลือในแถวแรกจะเป็นชุด control จากนั้นรอจนเมทาลนอลระเหยจนหมดให้เหลือแต่สารสกัดหยาบที่ก้นหลุม แล้วจึงละลายสารสกัดหยาบที่แห้งด้วยการเติมสาร DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

2.3.2.2 ปิเปตสารแขวนลอยที่มีเชื้อผสมจากข้อ 2.3 ปริมาตรหลุมละ 190 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม เฉพาะในแถวแรกทำให้มีปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบในแถวแรกมีค่าเท่ากับ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนอีกเจ็ดแถวที่เหลือจะปิเปตสารแขวนลอยที่มีเชื้อผสมปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร

2.3.2.3 ผสมสารสกัดหยาบและสารแขวนลอยของเชื้อในแถวแรกให้เข้ากันโดยการปิเปตสารละลายขึ้นลง 10-15 ครั้ง จากนั้นเจือจางสารละลายทั้งหมดลงครึ่งหนึ่งโดยปิเปตสารละลายในแถวแรกปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแถวถัดไปผสมให้เข้ากันโดยการปิเปตสารละลายขึ้นลง 10-15 ครั้ง และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในแถวที่สองจะเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในแถวแรก ทำซ้ำในขั้นตอนดังกล่าวจนถึงแถวสุดท้าย จึงปิเปตสารละลายส่วนเกินทิ้งไป 100 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมของทุกหลุมบนจานเพาะเชื้อเป็น 100 ไมโครลิตร บ่มจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง

2.3.2.4 ทำชุดควบคุมซึ่งทำทุกอย่างเหมือนการทดสอบ ยกเว้นแต่ไม่เติมสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยสีท โดยมี negative control ที่ไม่เติมสารใดๆ ในหลุมที่มีจุลินทรีย์ทดสอบ สำหรับการทำ positive control จะทำโดยการเติมสารปฏิชีวนะมาตรฐาน Vancomycin สำหรับทดสอบกับแบคทีเรีย และ Amphotericin B สำหรับทดสอบกับยีสต์ ให้สารปฏิชีวนะมีความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15 ชั่วโมง

2.3.2.5 สังเกตการเปลี่ยนสีของ AlamarBlue หากไม่มีการเปลี่ยนสีของ AlamarBlue ที่ยังเป็นสีน้ำเงินอยู่ แสดงว่าจุลินทรีย์นั้นถูกยับยั้งด้วยสารที่ใช้ทดสอบ โดยหลุมสุดท้ายของแต่ละสารสกัดหยาบที่ไม่เปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นสีชมพูจะเป็นค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.3.2.6 หาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ทำลายจุลินทรีย์ได้ จะเป็นค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) และค่า Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ทำการทดสอบโดยใช้หวงถ่ายเชื้อเขี่ยเชื้อจากหลุมที่สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 2.3.2.5 เขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.2.7 อ่านผลโดยสังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อหากไม่พบการเจริญของแบคทีเรียหรือยีสต์ ถือว่าค่านั้นเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียหรือยีสต์ จะแสดงเป็นค่า MBC และ MFC ตามลำดับ และนำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ดังกล่าวมาหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นในข้อ 7

3. หาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

3.1 Thin layer chromatography (TLC)

การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer Chromatography) เป็นโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ Solid-liquid chromatography ที่ใช้แยกองค์ประกอบของสารสกัดหยาบ และจะหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลายที่จำเพาะ (Sherma and Fried, 1991) ตามวิธีการดังนี้

3.1.1 TLC ที่ใช้เป็นแผ่นอะลูมิเนียม ที่เคลือบด้วย Silica gel ชนิด GF_{254} แผ่น Silica gel จะดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ส่วนที่เป็นตำแหน่งของสารจะมีลักษณะทึบแสง เนื่องจากตำแหน่งของสารไปบัง phosphate (F) จะเตรียมแผ่น TLC ให้มีขนาด 6x5 เซนติเมตร

3.1.2 หยดสารสกัดหยาบที่ละลายในตัวทำละลาย methanol ลงบนแผ่น TLC ห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร หยดสารให้มีความกว้าง 0.5 เซนติเมตร รอจนตัวทำละลายระเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.1.3 เตรียมภาชนะปิดที่บรรจุด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย Dichloromethane : Methanol ในอัตราส่วน 9:1 เตรียมปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร ใส่กระดาษกรองลงไปในระบบเพื่อให้ในภาชนะอิ่มตัวไปด้วย mobile phase จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้ใส่ลงในระบบที่เตรียมไว้ รอจนกว่า mobile phase เคลื่อนที่ถึงตำแหน่งที่ต้องการห่างจากขอบบน 0.5 เซนติเมตรจึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะ

3.1.4 นำแผ่น TLC ที่ได้จากข้อ 3 มาทดสอบหากลุ่มสารทางเคมีเบื้องต้นโดยแช่แผ่น TLC ในสารที่ใช้สำหรับทดสอบ ได้แก่ Ninhydrin, Vanillin และ Wagner's reagent (วิธีการเตรียมสารละลายในภาคผนวก ข) เมื่อให้ความร้อนจะปรากฏแถบของกลุ่มสารที่เกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารละลายดังกล่าว (ตารางที่ 8)

3.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

การแยกสารด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นการแยกแบบ reversed phase chromatography (อุทัย ไทยเจริญ และคณะ, 2550) ตามวิธีการดังนี้

3.2.1 สารสกัดหยาบถูกเตรียมให้มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอล และกรองโดยใช้หัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน สารบรรจุใน vial ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.2.2 สารสกัดหยาบจะแยกโดย High performance liquid chromatography (HPLC) โดยระบบในการแยกสารใช้ stationary phase เป็น คอลัมน์ชนิด reversed phase (Nucleosil 100-5 C18 5μm, 4.5 × 250 nm) และ mobile phase เป็น 90% ของอะซีโตรไนไตรในน้ำจนไปถึง 100% ของอะซิโตรไนไตร แช่ระบบใน mobile phase เป็นเวลา 30 นาที ใช้ flow rate เป็น 3 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้ระบบอิ่มตัวด้วย mobile phase

3.2.3 ตั้งค่าเครื่อง detector ใช้ DAD เป็นตัวรับสัญญาณโดยตั้งค่า VWD signal แล้วตั้งค่า wavelength ที่ 210 นาโนเมตร เลือก store spectrum เป็น all in peak พร้อมตั้งค่าช่วงความยาวคลื่น 200–800 นาโนเมตร

3.2.4 ตั้งค่าปริมาตรตัวอย่างที่ต้องการฉีดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตัวอย่างถูกฉีดโดยใช้เครื่อง Auto sampler และเลือกการฉีดเป็นแบบ injection with needle wash ให้ล้างเข็มด้วยทุกครั้งที่ฉีดตัวอย่าง

3.2.5 ทดสอบด้วยสภาวะแบบ gradient โดยตั้งตาราง time table ใส่ค่าเวลา, เปอร์เซ็นต์ของmobile phase ที่ต้องการ, flow rate และ max press ให้ครบทุกช่อง ในส่วนของ solvent ให้ใส่เปอร์เซ็นต์เริ่มต้นที่เริ่มทำ gradient ด้วยดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8 สารเคมีที่ใช้สำหรับทดสอบหากลุ่มสารทางเคมีบนแผ่น TLC

Table 8. Indicates typical TLC stains and the corresponding functional groups.

TLC stains	Target compounds	Color spots
Ninhydrin	Amine and Amino acid	Purple or brown
Vanillin	Terpene and Terpenoid	Brown
Wagner	Alkaloids	Red brown

ตารางที่ 9 ระบบ mobile phase ของ HPLC ที่ใช้สำหรับแยกองค์ประกอบของสารสกัด

Table 9. Mobile phase of HPLC for separated crude extract.

Time (min)	% water	% Acetonitrile
0.0	10.0	90.0
30.0	0.0	100.0
40.0	0.0	100.0
45.0	10.0	90.0
50.0	10.0	90.0

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอคติโนมัยสีทโดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

แอคติโนมัยสีทที่นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์จำนวน 49 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่แยกได้จากทะเล เช่น ตะกอนดิน ซากพืช ซากสัตว์ เปลือกหอย ฟองน้ำ ปะการัง เป็นต้น ผลจากการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ได้จากแอคติโนมัยสีทในฐานข้อมูลของ Genbank (NCBI) แสดงในตารางที่ 10 เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์เทียบกับฐานข้อมูลมีความคล้ายคลึงกัน 99% ในสกุล *Streptomyces* จำนวน 15 สายพันธุ์ และมีความคล้ายคลึงกัน 99% ในสกุล *Prauseria* จำนวน 1 สายพันธุ์ และมีเชื้อที่เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ (unidentified) จำนวน 33 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อที่เมื่อนำมาเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Genbank (NCBI) มีความคล้ายคลึงกัน 77-100% แต่เมื่อนำมาพิจารณาข้อมูลพบว่ามีลำดับนิคลีโอไทด์ที่เหมือนกันน้อย จึงไม่สามารถเทียบเคียงสายพันธุ์ได้ จำนวน 19 สายพันธุ์ และรวมทั้งเชื้อที่ไม่ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ จำนวน 14 สายพันธุ์ (ตารางที่ 11)

จากแผนภูมิต้นไม้ของแอคติโนมัยสีทที่พิสูจน์เอกลักษณ์จำนวน 16 สายพันธุ์ ที่มีความคล้ายคลึงกัน 99% ในสกุล *Streptomyces* และ *Prauseria* สามารถแบ่งได้ 8 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 (CNA099, CNA088, CNA091, CNA083, CNA100 และ CNA098 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces cacaoi*), กลุ่ม 2 (CNA099 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces champavatii*), กลุ่ม 3 (CNA071 และ CNA060 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces flavofungini*), กลุ่ม 4 (CNA104 และ CNA102 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces* sp.), กลุ่ม 5 (CNA063 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces parvulus*), กลุ่ม 6 (CNA076 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces* sp.), กลุ่ม 7 (CNA112 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces fradiae*) และกลุ่ม 8 (CNA035 มีความคล้ายคลึงกับ *Prauseria* sp.) (ภาพที่ 27)

แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลพบมากในสกุล *Streptomyces* มากกว่าเชื้อในสกุลอื่น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jensen และคณะ (1991) ที่ได้แยกแอคติโนมัยสีทจากตะกอนดินที่บาฮาม่าที่สามารถแยกแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* จากตะกอนดินที่ระดับความลึก 0-1 เมตร คิดเป็นร้อยละ 86% และที่ความลึก 1-3 เมตร จะพบเชื้อในกลุ่มนี้ได้คิดเป็นร้อยละ 12% แต่ที่ระดับความลึกเพิ่มมากขึ้นจะพบเชื้อในกลุ่มนี้น้อยลง แต่กลับสามารถแยกเชื้อสกุล *Actinoplanetes* ได้เพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 41% ที่ระดับความลึก 15-30 เมตร

ตารางที่ 10 จำนวนเชื้อแบคทีเรียจากทะเลที่พิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

Table 10. Numbers of marine bacteria identified based on their 16S rDNA nucleotides sequences.

Identification results	Number
Streptomyces sp.	15
Prauseria sp.	1
Unidentified	33

ตารางที่ 11 แอคติโนมัยสีทที่แยกจากตะกอนดินและสิ่งมีชีวิตจากทะเลในประเทศไทยที่เทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA กับฐานข้อมูลธนาคารยีน

Table 11. Actinomycetes isolated from sediment and organism from sea of Thailand and identity compared percentage of 16S rDNA sequences available in GenBank database.

No.	Strain code	Location	Source	Colony	Closest relative	Identity	Accession no.
1	CNA035	Losin	Sponge	White	*Prauseria* sp. TUT1202	816/821 (99%)	AB188209.1
2	CNA060	Sattaheep	Brown algae	White	*Streptomyces flavofungini*	832/838 (99%)	EU273540.1
3	CNA063	Sattaheep	Sand sediment	White	*Streptomyces parvulus*	828/829 (99%)	AB184326.1
4	CNA065	Sattaheep	-	White	*Streptomyces champavatii* isolate XSD-106	843/845 (99%)	EU273542.1
5	CNA071	Sattaheep	Sea grape	White	*Streptomyces flavofungini*	833/840 (99%)	EU273550.1
6	CNA076	Toa Island	Shell	Yellow	*Streptomyces* sp. 6G49	834/838 (99%)	EF198902.1
7	CNA083	Lower gulf	Sediment	White	*Streptomyces cacaoi* subsp.	836/838 (99%)	AB184183.1
8	CNA086	Lower gulf	Sediment	White	*Streptomyces* sp. HBUM79010	845/852 (99%)	EU119189.1
9	CNA088	Lower gulf	Sediment	White	*Streptomyces cacaoi* subsp.	840/844 (99%)	AB184183.1
10	CNA091	Lower gulf	Sediment	White	*Streptomyces* sp. HBUM79010	840/844 (99%)	EU119189.1
11	CNA098	Lower gulf	Sediment	White	*Streptomyces* sp. HBUM79010	844/849 (99%)	EU119189.1
12	CNA099	Lower gulf	Sediment	White	*Streptomyces* sp. HBUM79010	831/835 (99%)	EU119189.1
13	CNA100	Lower gulf	Sediment	White	*Streptomyces* sp. HBUM79010	839/846 (99%)	EU119189.1
14	CNA102	Lower gulf	Sediment	Brown	*Streptomyces* sp. A00108	835/837 (99%)	EF690256.1
15	CNA104	Lower gulf	Sediment	Brown	*Streptomyces* sp. A00108	833/838 (99%)	EF690256.1

ตารางที่ 11 (ต่อ)

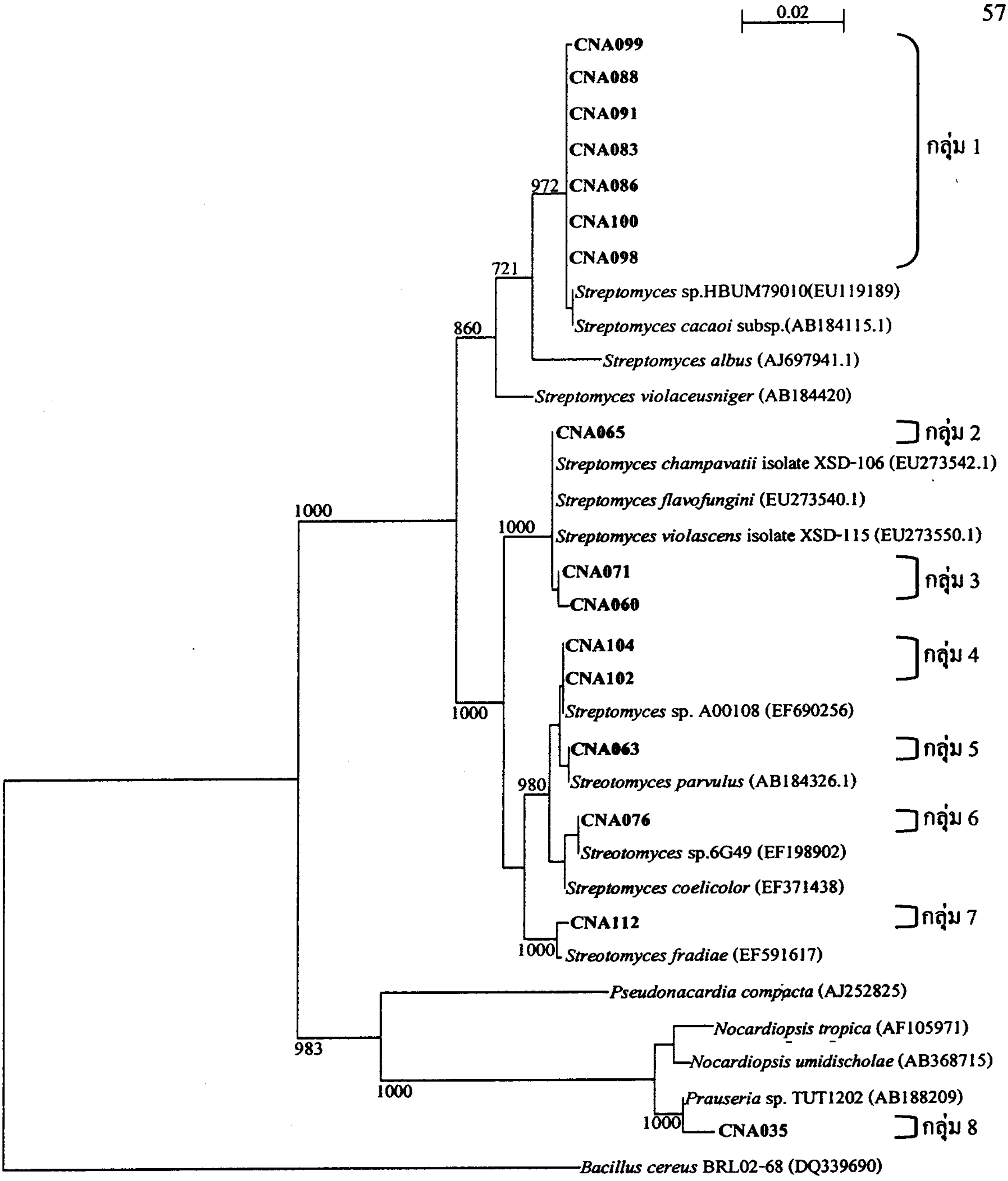
Table 11. (Continue)

No.	Strain code	Location	Source	Colony	Closest relative	Identity	Accession no.
16	CNA112	Songkla l	Sediment	Brown	*Streptomyces fradiae* strain A160	829/821 (99%)	EF591617.1
17	CNA053	Phuket	Sediment	White	unidentify	804/825 (97%)	EF371438.1
18	CNA055	Toa Island	Sediment	White	unidentify	742/821 (90%)	EU368817.1
19	CNA061	Sattaheep	Decaying wood	Gray	unidentify	24/24 (100%)	AY850394.1
20	CNA064	Sattaheep	Sediment	White	unidentify	755/804 (93%)	EU368816.1
21	CNA067	Sattaheep	-	White	unidentify	388/405 (83%)	Y17515.1
22	CNA069	Sattaheep	Shell	Whit	unidentify	752/797 (94%)	EU273540.1
23	CNA074	Toa Island	Dead shrimp	Brown	unidentify	332/378 (87%)	EF591617.1
24	CNA080	Toa Island	Mollusk	White	unidentify	324/406 (79%)	AY500143.1
25	CNA090	Lower gulf	Sediment	White	unidentify	26/28 (92%)	AM445559.1
26	CNA092	Lower gulf	Sediment	White	unidentify	44/57 (77%)	AM434283.2
27	CNA093	Lower gulf	Sediment	White	unidentify	750/811 (92%)	EU184115.1
28	CNA097	Lower gulf	Sediment	White	unidentify	289/337 (85%)	EU119189.1
29	CNA095	Lower gulf	Sediment	White	unidentify	668/844 (79%)	EU661810.1
30	CNA103	Lower gulf	Sediment	White	unidentify	587/692 (84%)	EU914138.1
31	CNA113	Songkla lake	Sediment	Brown	unidentify	467/838 (91%)	DQ994702.1
32	CNA145	Upper gulf	Sediment	Brown	unidentify	783/840 (93%)	AY114179.1
33	CNA146	Upper gulf	Sediment	Brown	unidentify	778/840 (92%)	AY114179.1

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Table 11. (Continue)

No.	Strain code	Location	Source	Colony	Closest relative	Identity	Accession no.
34	CNA062	Sattaheep	Sediment	White	unidentify	691/766 (90%)	EU841629.1
35	CNA058	Phuket	Sediment	White	unidentify	319/351 (90%)	FJ006872.1
36	CNA056	Toa Island	Biofilm	White	unidentify	-	-
37	CNA057	Phuket	Sediment	Whit	unidentify	-	-
38	CNA059	Sattaheep	Sediment	White	unidentify	-	-
39	CNA066	Sattaheep	Shell	White	unidentify	-	-
40	CNA068	Sattaheep	Shell	White	unidentify	-	-
41	CNA070	Sattaheep	Brittle star	Gray	unidentify	-	-
42	CNA072	Toa Island	Soft coral	White	unidentify	-	-
43	CNA073	Toa Island	Sell	White	unidentify	-	-
44	CNA075	Toa Island	Sell	Brown	unidentify	-	-
45	CNA077	Toa Island	Soft coral	Gray	unidentify	-	-
46	CNA078	Toa Island	Coral	White	unidentify	-	-
47	CNA079	Toa Island	Coral	Gray	unidentify	-	-
48	CNA089	Lower gulf	Sediment	White	unidentify	-	-
49	CNA101	Lower gulf	Sediment	White	unidentify	-	-



ภาพที่ 27 แผนภูมิต้นไม้แบบ Neighbor-joining ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลโดยใช้โปรแกรม CLASTAL X 1.83 ค่าสนับสนุนทางสถิติใช้ bootstrap มีค่าเท่ากับ 1000 ของจำนวนในการทำซ้ำและมีค่า Bar=0.02 K_{nuc}

Figure 27. Neighbor-joining phylogenetic tree of marine derived actinomycetes based on nucleotides sequences of 16S rDNA gene using CLASTAL X version 1.83. Numbers within the phylogenetic tree indicate the percentages of occurrence of the branching order in 1000 bootstrapped trees. Bar=0.02 K_{nuc}

2. การคัดเลือกสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลและผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี colorimetric microdilution assay

สารสกัดหยาบจำนวน 196 ตัวอย่างจากการทดสอบของฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเชื้อ 7 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *E. faecalis* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium, *Shigella sonnei* และ *P. aruginosa* และยีสต์ *C. albicans* โดยวิธี colorimetric microdilution broth ที่มี AlamarBlue เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของ AlamarBlue ที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันที่มีความสัมพันธ์กับกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ พบว่าสารสกัดหยาบจำนวน 112 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้จากเชื้อสกุล *Streptomyces* จำนวน 15 สายพันธุ์ และจากกลุ่มเชื้อที่ไม่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ จำนวน 28 สายพันธุ์ สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* sp. ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 61 (ตารางที่ 12) และพบจำนวนสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้สูงที่สุดจำนวน 71 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *B. subtili, E. faecalis* และ *S. aureus* จำนวน 57, 29 และ 15 ตัวอย่าง ตามลำดับ และผลของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละสูตรพบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แตกต่างกัน (ภาพที่ 28)

ตารางที่ 12 จำนวนสารสกัดหยาบที่ทดสอบเทียบกับจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล

Table 12. Numbers of crude extracts from marine derived actinomycetes tested compared with numbers of active crude extracts exhibited antimicrobial activity.

	Numbers of crude extracts tested	Numbers of active crude extracts
Streptomyces	60	37 (61%)
Unidentified	136	75 (55%)
Total	196	112 (57%)

2. การคัดเลือกสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลและผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี colorimetric microdilution assay

สารสกัดหยาบจำนวน 196 ตัวอย่างจากการทดสอบของฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเชื้อ 7 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *E. faecalis* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium, *Shigella sonnei* และ *P. aruginosa* และยีสต์ *C. albicans* โดยวิธี colorimetric microdilution broth ที่มี AlamarBlue เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีของ AlamarBlue ที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันที่มีความสัมพันธ์กับกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ พบว่าสารสกัดหยาบจำนวน 112 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้จากเชื้อสกุล *Streptomyces* จำนวน 15 สายพันธุ์ และจากกลุ่มเชื้อที่ไม่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ จำนวน 28 สายพันธุ์ สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* sp. ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 61 (ตารางที่ 12) และพบจำนวนสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้สูงที่สุดจำนวน 71 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *B. subtili, E. faecalis* และ *S. aureus* จำนวน 57, 29 และ 15 ตัวอย่าง ตามลำดับ และผลของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละสูตรพบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แตกต่างกัน (ภาพที่ 28)

ตารางที่ 12 จำนวนสารสกัดหยาบที่ทดสอบเทียบกับจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล

Table 12. Numbers of crude extracts from marine derived actinomycetes tested compared with numbers of active crude extracts exhibited antimicrobial activity.

	Numbers of crude extracts tested	Numbers of active crude extracts
Streptomyces	60	37 (61%)
Unidentified	136	75 (55%)
Total	196	112 (57%)

จากรายงานพบว่าสารทุติยภูมิเมตาโบไลท์มากกว่า 1,000 ชนิด ที่ได้จากแอคติโนมัยสีท ในระหว่างปี ค.ศ. 1988-1992 ประมาณ 75% ของสารทุติยภูมิเมตาโบไลท์มาจากการผลิตของเชื้อในสกุล *Streptomyces* (Sanglier *et al.*, 1993) และมีรายงานการค้นพบสารชนิดใหม่จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล แอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* ที่แยกได้จากทะเลในระหว่างปี ค.ศ. 2003-2005 ค้นพบสารทุติยภูมิเมตาโบไลท์ชนิดใหม่ ได้แก่ สารที่ยับยั้งการเจริญของมะเร็ง เช่น aureoverticillatam, caprolactones, chinikomycins, 3,6-disubstituted indoles และ trioxacarcins สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น bonactin, frigocyclinone, glaciapyrroles, gutingimycin, himalomycins และ trioxacarcins (Lam, 2006) สารทุติยภูมิเมตาโบไลท์ของเชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* จึงมีความสำคัญในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคชนิดต่างๆ

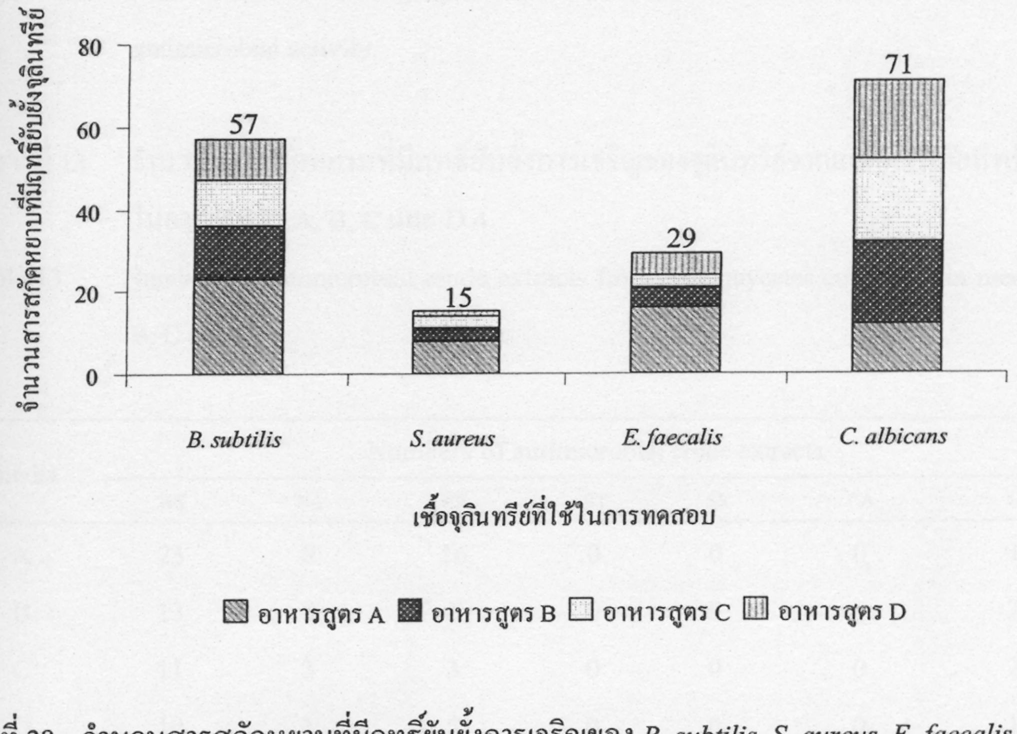
จากการศึกษาสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์พบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ที่นำมาทดสอบ แต่ไม่พบสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ สอดคล้องรายงานของ Kokare และคณะ (2004) ได้รายงานการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทบริเวณชายฝั่งตะวันตกของประเทศอินเดีย โดยนำสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้นำมาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยหา inhibition zone พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ แต่ไม่พบสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* และ *E. aerogenes* จากผลการทดลองสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA053 (unidentified) เลี้ยงในอาหารสูตร A มีค่า MIC เท่ากับ 4.69 μg/ml ส่วนสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC25929 ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA076 (มีค่า homology 99% ของ *Streptomyces* sp.) เลี้ยงในอาหารสูตร C มีค่า MIC เท่ากับ 75 μg/ml และสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Enterococcus faecalis* TISTR459 ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA146 (unidentified) และ สายพันธุ์ CNA100 (มีค่า homology 99% ของ *Streptomyces* sp.) เลี้ยงในอาหารสูตร A มีค่า MIC เท่ากับ 37.5 μg/ml ส่วนสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC10231 ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA093 (unidentified) เลี้ยงในอาหารสูตร C และ D และสายพันธุ์ CNA097 (unidentified) เลี้ยงในอาหารสูตร D มีค่า MIC เท่ากับ 9.38 μg/ml

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามมีสารสกัดหยาบจำนวน 22 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ใน

การทำลายจุลินทรีย์ได้ โดยมีค่า MBC ต่ำที่สุดต่อแบคทีเรียแกรมบวกที่นำมาทดสอบ เท่ากับ 150 µg/ml และมีค่า MFC ต่ำที่สุดต่อ *Candida albicans* ATCC10231 เท่ากับ 75 µg/ml (ภาคผนวก ค)

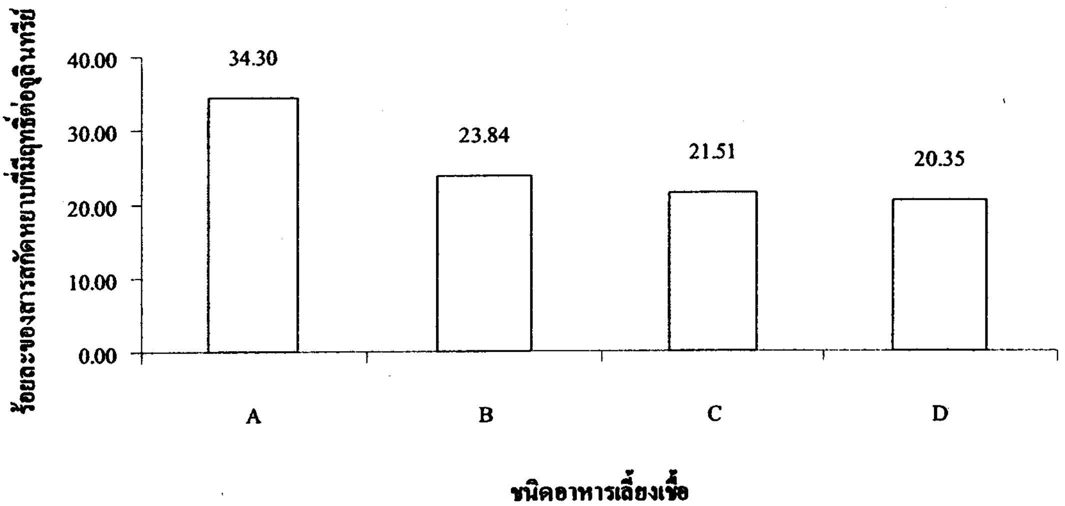
2.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากการศึกษาพบว่าอาหารสูตร A จะให้จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูงกว่าอาหารสูตรอื่น คิดเป็นร้อยละ 34.30 โดยที่อาหารสูตร B และ C นั้นจะมีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์รองลงมา และอาหารสูตร D จะมีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ได้จำนวนน้อยที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 29 อาหารสูตร A จะมีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 47 ตัวอย่างใน 59 ตัวอย่าง สูงกว่าอาหารสูตรอื่นโดยมีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้มากที่สุดถึง 23 ตัวอย่าง ในขณะที่ อาหารสูตร B, C และ D มีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ATCC10231 ได้มากที่สุดจำนวน 20, 20 และ19 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 13)



ภาพที่ 28 จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis, S. aureus, E. faecalis* และ *C. albicans* ที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหารสูตร A, B, C และD

Figure 28. Numbers of Crude extracts from actinomycetes cultivated in media A, B, C and D exhibited antimicrobial activities against *B. subtilis, S. aureus, E. faecalis* and *C. albicans*.



ภาพที่ 29 ความสัมพันธ์ของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

Figure 29. Relationship between growth media and numbers of crude extracts exhibited antimicrobial activity.

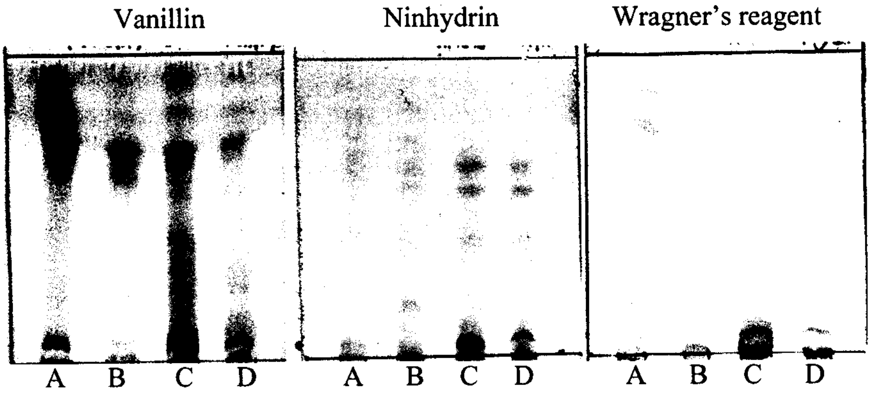
ตารางที่ 13 จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงในอาหารสูตร A, B, C และ D 4

Table 13. Numbers of antimicrobial crude extracts from actinomycetes cultivated in media A, B, C and D.

media	Numbers of antimicrobial crude extracts						
	BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
A	23	8	16	0	0	0	12
B	13	3	5	0	0	0	20
C	11	3	3	0	0	0	20
D	10	1	5	0	0	0	19

BS; *Bacillus subtilis*, SA; *Staphylococus aureus*, EF; *Enterococcus faecalis*, SS; *Shigella sonnei*, ST;*Salmonella* Typhimurium , PA; *Pseudomonas aeruginosa*, CA; *Candida albicans*

แอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของทั้ง 4 สูตร จะให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างกัน ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยสีท สายพันธุ์ CNA093 (unidentified) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร C และ D สารสกัดหยาบที่ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* มีค่า MIC เท่ากับ 9.38 μg/ml แต่สารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร A และ B จะไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ และผลจาก TLC เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีท สายพันธุ์ CNA093 (unidentified) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร A, B, C และ D ปรากฏกลุ่มสารที่แตกต่างกัน ในอาหารสูตร A, B, C และ D ปรากฏกลุ่มสาร terpenoid ที่คล้ายกันจากการทดสอบด้วยสาร Vanillin และอาหารสูตร A ปรากฏกลุ่มสาร alkaloid ที่แตกต่างจากอาหารสูตรอื่นจากการทดสอบด้วยสาร Wagner's reagent ส่วนอาหารสูตร C และ D พบว่ามีกลุ่มสาร amino acid ที่ปรากฏตรงตำแหน่งเดียวกันจากการทดสอบด้วยสาร Ninhydrin (ภาพที่ 30) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bode และคณะ (2002) ที่ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิเมตาโบไลท์โดยแบคทีเรียและราหนึ่งสายพันธุ์สามารถสร้างสารทุติยภูมิเมตาโบไลท์ได้หลายชนิด เรียกว่า OSMAC (one strain, many compounds) และการเปลี่ยนแปลงในสิ่งแวดล้อมหรือสารอาหารจะมีผลต่อคุณภาพและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเชื้อในการหมักในอาหารเหลว



ภาพที่ 30 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบ CNA093 เลี้ยงในสูตรอาหาร A, B, C และ D เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Vanillin, Ninhydrin และ Wragner's reagent

Figure 30. Normal phase TLC chromatogram of crude extract obtained from actinomycetes strain CNA093 cultivated in media including A, B, C and D, after visualization using Vanillin, Ninhydrin and Wragner's reagent.

ปัจจัยขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงสำคัญเนื่องจากเชื้อจะใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตรวมถึงส่งผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิเมตาโบไลท์ของแอคติโนมัยสีท โดยอาหารสูตร A (มีตะกอนดิน, เปลือกกุ้งป่น และ ผงสาหร่าย เป็นองค์ประกอบ) เป็นสูตรอาหารที่เลียนแบบธรรมชาติเป็นการจำกัดสารอาหารที่เชื้อไม่สามารถใช้ได้ทันทีทำให้เชื้อต้องสร้างสารมาย่อยสลายสารอาหารให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลงเพื่อเปลี่ยนไปพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ต่างจากอาหารสูตร B (มี glycerol และ soytone เป็นองค์ประกอบ), C (มี polypeptone, soluble starch และ yeast extracts เป็นองค์ประกอบ) และอาหารสูตร D (มี peptone และ yeast extract เป็นองค์ประกอบ) ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เชื้อสามารถนำมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างสารทุติยภูมิเมตาโบไลท์ได้โดยง่าย แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการสร้างพลังงานและเซลล์ ผลของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตัวอย่างเช่น actinomycin และ cephalosporins ต้องการน้ำตาลกลูโคสและ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน สารทุติยภูมิเมตาโบไลท์บางชนิดต้องการแหล่งคาร์บอนชนิดน้ำตาลกลูโคส เช่น kanamycin, streptomycin และ tetracyclin (Sanchez and Demain, 2002)

3. องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

3.1 หาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นโดยเทคนิค TLC

ผลการศึกษาได้คัดเลือกสารสกัดหยาบจำนวน 23 ตัวอย่าง โดยดูจากค่า MIC และ MBC/MFC จากผลการทดลองที่ 2 นำมาหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นโดยทดสอบกับสารละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Ninhydrin, Vanillin และ Wagner's reagent เมื่อให้ความร้อนบนแผ่น TLC สารเคมีจะทำปฏิกิริยาและปรากฏแถบของกลุ่มสาร โดย Ninhydrin จะทดสอบกับกลุ่มสารเอมีน และกรดอะมิโน จะเกิดสีม่วง หรือสีน้ำตาล สำหรับ Vanillin จะทดสอบกับกลุ่มสารเทอร์พีน และเทอร์พีนอยด์ จะเกิดสีน้ำตาล และ Wagner's reagent จะทดสอบกับกลุ่มสารแอลคาลอยด์ จะให้สีน้ำตาลแดง จากการทดลองพบสารสกัดหยาบที่มีกลุ่มสารเอมีน และกรดอะมิโน จำนวน 19 ตัวอย่าง, สารสกัดหยาบที่มีกลุ่มสารเทอร์พีน และเทอร์พีนอยด์ จำนวน 19 ตัวอย่าง และสารสกัดหยาบที่มีกลุ่มสารแอลคาลอยด์ จำนวน 8 ตัวอย่าง (ตารางที่ 14) จากสารสกัดหยาบที่คัดเลือกมาทั้งหมดพบสารสกัดหยาบที่มีกลุ่มสารทั้ง 3 กลุ่ม จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ CNA069B, CNA075B, CNA097D, CNA100A, CNA103D และ CAN146A มีสารสกัดหยาบที่ไม่พบกลุ่มสารทั้ง 3 กลุ่ม จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ CNA053B และ CNA099D

จุลินทรีย์ที่พบในทะเลมีกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ คือ nitrogenated และอนุพันธ์ของ acetate โดยพบสารในกลุ่ม nitrogenated compounds คิดเป็น 56% รองลงมาเป็น

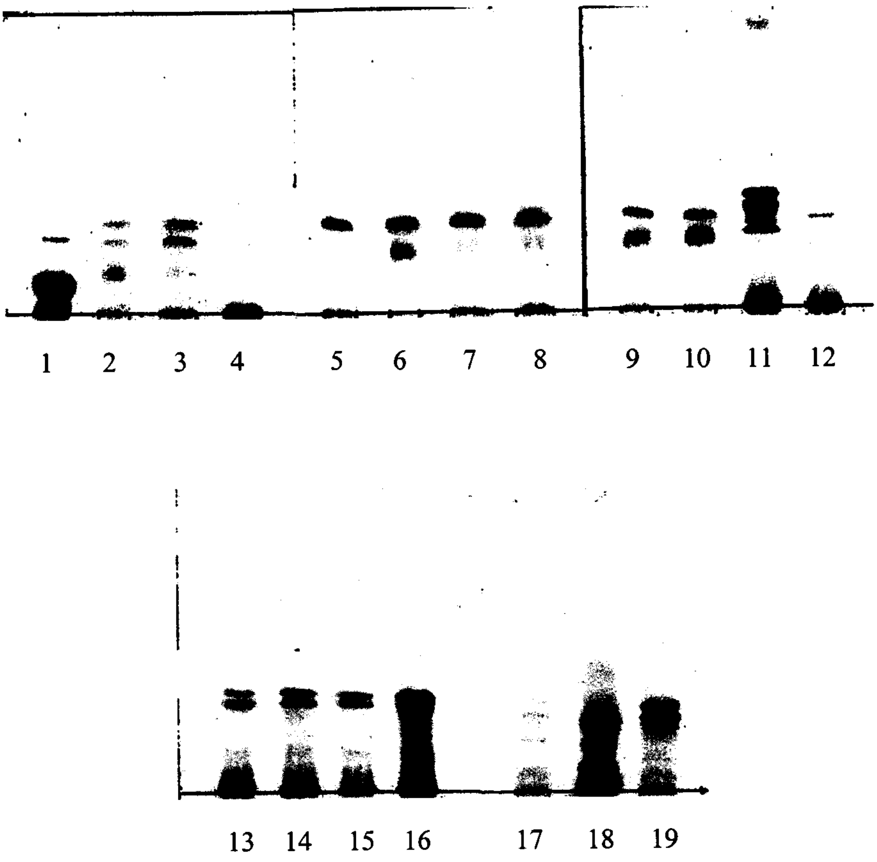
อนุพันธ์ของ acetate คิดเป็น 30% และ terpenoids คิดเป็น 13% (Kelecom, 2002) สารทุติยภูมิเมตาโบไลท์ที่สร้างจากแอคติโนมัยสีทมีกลุ่มสารที่มีความหลากหลาย โดยสารในกลุ่มเปปไทด์ที่ใช้เป็นสารปฏิชีวนะจะพบทั่วไปในเชื้อสกุล *Streptomyces* เป็นกลุ่มสารที่สำคัญประกอบด้วยกรดอะมิโนมาเชื่อมต่อกัน ยังพบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในกลุ่มเปปไทด์ เช่น actinomycin ที่สร้างจาก *S. antibioticus*, actinomycin D และ bleomycin A ที่พบในเชื้อสกุล *Strptomyces* (Lancini and Lorenzetti, 1993) thiocoraline เป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่ม depsipeptide ได้จากเชื้อสกุล *Micromonospora* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก (Romero *et al.*, 1997) salinamides A และ B เป็นสารในกลุ่ม depsipeptide แยกได้จาก *Streptomyces* sp. สารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus pneumoniae* และ *Staphylococcus pyrogenes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 4.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Moore *et al.*, 1999) สารทุติยภูมิเมตาโบไลท์ที่เป็นสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์จะสร้างโดยผ่านวิถีสังเคราะห์ mevalonate (MEP) ตัวอย่างสารเคมีในกลุ่มนี้ เช่น naphterpin, terpentecin, napyradiomycin, BE-40644 และ furaquinocin เป็นต้น โดยเชื้อ *Streptomyces* CL-190 สร้างสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ คือ naphterpin B และ naphterpin C (Takagi *et al.*,2005) สารทุติยภูมิเมตาโบไลท์ที่เป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ได้แก่ altemicidin เป็นสารชนิดใหม่ที่แยกได้จาก *Streptomyces sioyaensis* สายพันธุ์ SA-1758 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. (Takahashi *et al.*, 1989) marinone และ debromomarinone มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดย marinone มีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis* (MIC เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ debromomarinone มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *S. pneumoniae* และ *S. pyogenes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.0-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Pathirana *et al.*, 1992) chandrananimycins A , B และ C เป็นสารชนิดใหม่ ที่แยกได้จาก *Actinomadura* sp. สายพันธุ์ M048 (Maskey *et al.*, 2003) diazepinomicin เป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่มของ dibenzodiazepine alkaloid ที่แยกสารได้จาก *Micromonospora* สายพันธุ์ DPJ12 พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Charan *et al.*, 2004) helquinoline มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis, Streptomyces viridochromogenase* TÜ 57, *Staphylococcus aureus* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli, Candida albicans* และ *Mucor miehei* รวมทั้งไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง จุลสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorella vulgaris, Chlorella sorokiniana* และ *Scenedesmus subspicatus* อีกด้วย (Ratnakar *et al.*, 2004) frigocyclinone ที่แยกได้จาก *Streptomyces griseus* สายพันธุ์ NTK 97 จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดังกล่าวพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก (Bruntner *et al.*, 2005)

ตารางที่ 14 สารสกัดหยาบที่คัดเลือกจำนวน 23 ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น

Table 14. Antimicrobial activities of the 23 crude extracts and primary chemical composition of the active crude extracts.

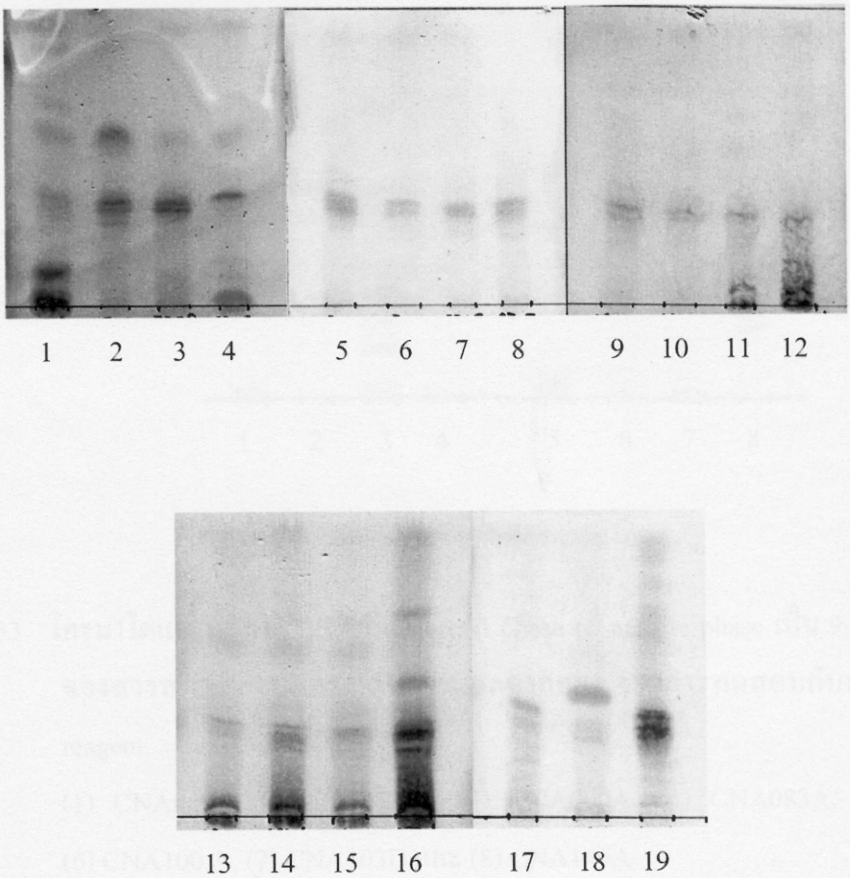
No.	Crude extracts	MIC (μg/ml)				MBC (μg/ml)				Chemical compositions		
		BS	SA	EF	CA	BS	SA	EF	CA	Alkaloid	Amine and amino acid	Terpene and terpenoid
1	CNA053 B	4.69	-	-	150	-	-	-	-	-	-	-
2	CNA069 B	-	-	-	150	-	-	-	150	+	+	+
3	CNA074 D	-	-	-	150	-	-	-	150	-	+	+
4	CNA075 B	150	-	-	150	150	-	-	-	+	+	+
5	CNA076 B	-	150	150	150	-	-	-	150	-	+	+
6	CNA077 A	150	150	-	150	-	-	-	150	-	+	+
7	CNA078 A	150	150	150	150	-	-	-	150	-	+	+
8	CNA078 B	75	-	150	75	-	-	-	75	-	+	+
9	CNA079 B	150	-	-	-	150	-	-	-	-	+	+
10	CNA079 C	150	150	75	150	150	-	-	150	-	+	+
11	CNA079 D	150	-	75	75	150	-	-	150	-	+	+
12	CNA080 A	150	150	75	150	-	-	-	150	+	+	-
13	CNA083 A	37.5	150	75	-	-	150	150	-	+	-	-
14	CNA086 D	150	-	75	37.5	-	-	150	150	-	-	+
15	CNA093 C	-	-	-	9.38	-	-	-	75	-	+	+
16	CNA093 D	-	-	-	9.38	-	-	-	75	-	+	+
17	CNA097 C	-	-	-	9.38	-	-	-	150	-	+	+
18	CNA097 D	-	-	-	18.75	-	-	-	150	-	+	+
19	CNA099 C	-	-	-	18.75	-	-	-	150	+	+	+
20	CNA099 D	-	-	-	37.5	-	-	-	150	-	-	-
21	CNA100 A	75	-	37.5	-	-	-	150	-	+	+	+
22	CNA103 D	-	150	-	-	-	150	-	-	+	+	+
23	CNA146 A	75	150	37.5	-	-	150	-	-	+	+	+

- No activities, BS; *Bacillus subtilis*, SA; *Staphylococcus aureus*, EF; *Eenterococcus faecalis* and CA; *Candida albicans*



ภาพที่ 31 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบที่พบกลุ่มสารเอมีน และกรดอะมิโน จากการทดสอบกับ Ninhydrin (1) CNA069B, (2) CNA074D, (3) CNA075B, (4) CNA076B, (5) CNA077A, (6) CNA078A, (7) CNA078B, (8) CNA079B, (9) CNA079C, (10) CNA079D, (11) CNA080A, (12) CNA093C, (13) CNA093D, (14) CNA097C, (15) CNA097D, (16) CNA099C, (17) CNA100A, (18) CNA103D และ (19) CNA146 A

Figure 31. Normal phase TLC chromatogram of crude extract presented amine and amino acid after visualization using Ninhydin reagent. (1) CNA069B, (2) CNA074D, (3) CNA075B, (4) CNA076B, (5) CNA077A, (6) CNA078A, (7) CNA078B, (8) CNA079B, (9) CNA079C, (10) CNA079D, (11) CNA086D, (12) CNA093C, (13) CNA093D, (14) CNA097C, (15) CNA097D, (16) CNA099C, (17) CNA100A, (18) CNA103D and (19) CNA146 A

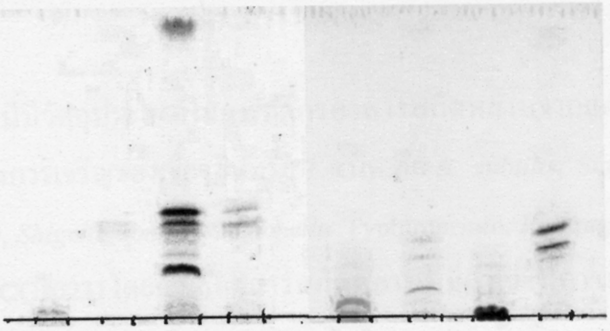


ภาพที่ 32 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบที่พบกลุ่มสารเทอร์พีน และเทอร์พีนอยด์ จากการทดสอบกับสาร Vanillin

(1) CNA069B, (2) CNA074D, (3) CNA075B, (4) CNA076B, (5) CNA077A, (6) CNA078A, (7) CNA078B, (8) CNA079B, (9) CNA079C, (10) CNA079D, (11) CNA080A, (12) CNA093C, (13) CNA093D, (14) CNA097C, (15) CNA097D, (16) CNA099C, (17) CNA100A, (18) CNA103D และ (19) CNA146 A

Figure 32. Normal phase TLC chromatogram of crude extract presented terpene and terpenoid after visualization using Vanillin reagent.

(1) CNA069B, (2) CNA074D, (3) CNA075B, (4) CNA076B, (5) CNA077A, (6) CNA078A, (7) CNA078B, (8) CNA079B, (9) CNA079C, (10) CNA079D, (11) CNA086D, (12) CNA093C, (13) CNA093D, (14) CNA097C, (15) CNA097D, (16) CNA099C, (17) CNA100A, (18) CNA103D and (19) CNA146 A



ภาพที่ 33 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบที่พบกลุ่มสารแอลคาลอยด์ จากการทดสอบกับสาร Wagner's reagent

(1) CNA069B, (2) CNA075B, (3) CNA080A, (4) CNA083A, (5) CNA099C, (6) CNA100 A, (7) CNA103D และ (8) CNA146A

Figure 33. Normal phase TLC chromatogram of crude extract presented alkaloid after visualization using Wagner's reagent.

(1) CNA069B, (2) CNA075B, (3) CNA080A, (4) CNA083A, (5) CNA099C, (6) CNA100 A, (7) CNA103D and (8) CNA146A

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดกรองสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัย ได้จากทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 7 ชนิด คือ *B. subtilis*, *Staphylococc* ATCC25929, *E. faecalis*, *Shigella sonnei*, *Salmonella* Typhimurium, *P. aruginosa* AT และ *C. albicans* ATCC10231 โดยคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเ จุลินทรีย์มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาร และจัดจำแนกสายพันธุ์ของแอคติโนมัย ได้จากทะเล จากการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยสีท จากทะเลจำนวน 49 สายพันธุ์ สามารถเทียบเคียงสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทในเชื้อสกุล *Stre* และ *Prauseria* โดยมีความคล้ายคลึง 99% ของแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* จ สายพันธุ์ และสกุล *Prauseria* จำนวน 1 สายพันธุ์ ส่วนอีก 33 สายพันธุ์ไม่สามารถจัดจำ พันธุ์ได้ (unidentified)

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 4 สูตร พบ หยาบทั้งหมด 112 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเป็นสารสกั ได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. จำนวน 15 สายพันธุ์ และจากเชื้อกลุ่มที่ไม่สามารถจำแนก จำนวน 28 สายพันธุ์ เชื้อที่เลี้ยงในอาหารต่างกันจะให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แต ด้วย ซึ่งอาหารสูตร A มีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูงกว่าอา อื่นคิดเป็นร้อยละ 34.30 และยังพบว่ามีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเ แบคทีเรียแกรมบวกสูงกว่าอาหารสูตรอื่นอีกด้วย ส่วนอาหารสูตร B, C และ D พบว่ามีจำ สกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ATCC10231 จำนวน 20, 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสารสกัดหยาบจากอาหารสูตร A ที่มีจำนวน 12 ตัวอย่าง และ สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ATCC10231 ได้สูงที่สุดจำนวน 71 รองลงมาคือ *B. subtili*, *E. faecalis* และ *Staphylococcu aureus* ATCC25929

สารสกัดหยาบที่ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ที่นำมาทดสอบแต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบ คือ *Shigell* *Salmonella* Typhimurium และ *P. aeruginosa* ATCC27853 โดยสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยั เจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA053 (unidentified) อาหารสูตร A มีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 4.69 μg/ml ส่วนสาย

3.2 จัดกลุ่มสารสกัดหยาบเบื้องต้นโดยเทคนิค HPLC

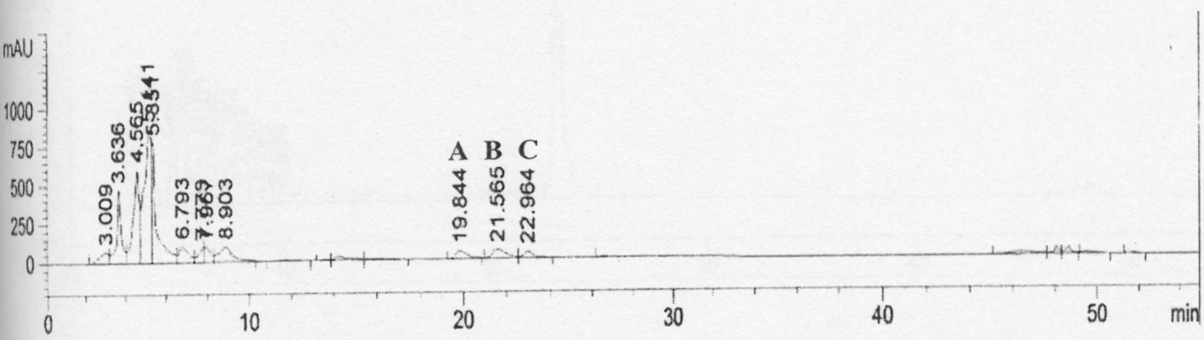
สารสกัดหยาบ 23 ตัวอย่าง ที่คัดเลือกจากการทดลองข้างต้น นำมาจัดกลุ่มสารสกัดหยาบเบื้องต้นโดยอาศัยข้อมูลทางโครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร จัดกลุ่มสารสกัดหยาบที่มีส่วนประกอบทางเคมีที่คล้ายกัน พบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 23 ชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 9 กลุ่ม (ตารางที่ 15) พบสารในกลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ตัวอย่าง สารในกลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ตัวอย่าง สารในกลุ่มที่ 3 จำนวน 4 ตัวอย่าง สารในกลุ่มที่ 4 จำนวน 3 ตัวอย่าง สารในกลุ่มที่ 5 จำนวน 2 ตัวอย่าง และสารในกลุ่มที่ 6, 7, 8 และ 9 จำนวนกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง (ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 15 การจัดกลุ่มของสารสกัดหยาบที่แยกจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลอาศัยข้อมูลตามไดโอดอาเรย์สเปกตรัม

Table 15. Classification of crude extracts from marine derived actinomycetes based on diode array spectrum.

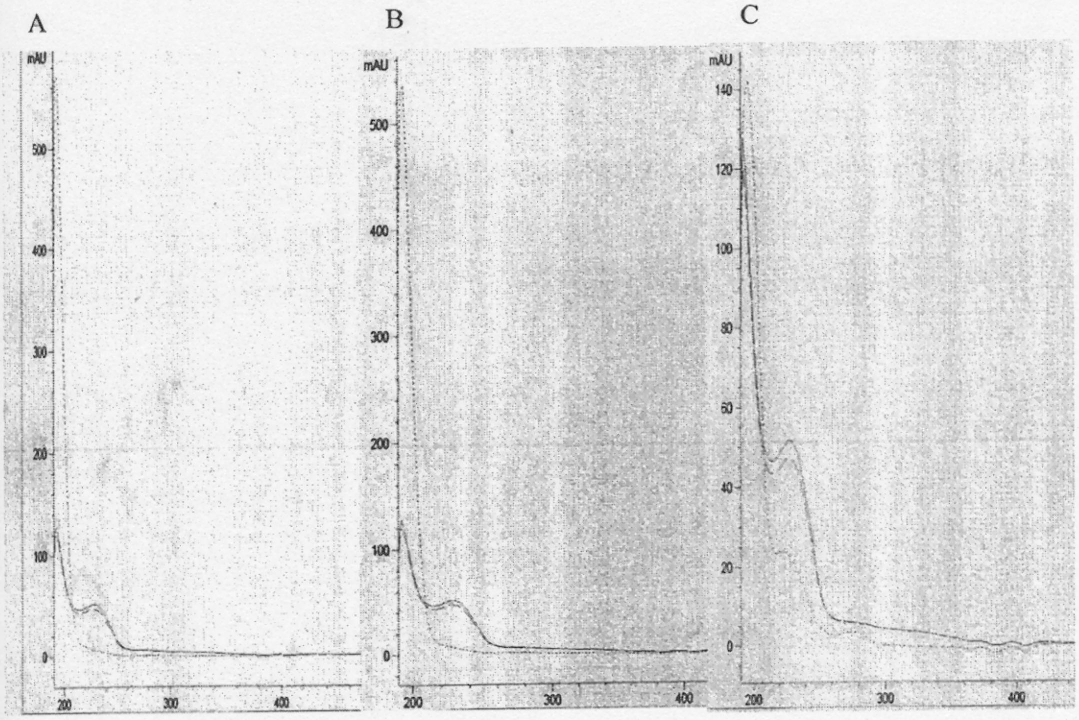
Group	1	2	3	4	5
Samples	CNA053B	CNA077A	CNA076B	CNA099C	CNA093C
	CNA074D	CNA079D	CNA086D	CNA103D	CNA093D
	CNA079B	CNA078B	CNA097C	CNA146A	
	CNA083A	CNA078A	CNA097D		
		CNA079C			
		CNA075B			

Group	6	7	8	9
Samples	CNA080A	CNA069B	CNA099D	CNA100A



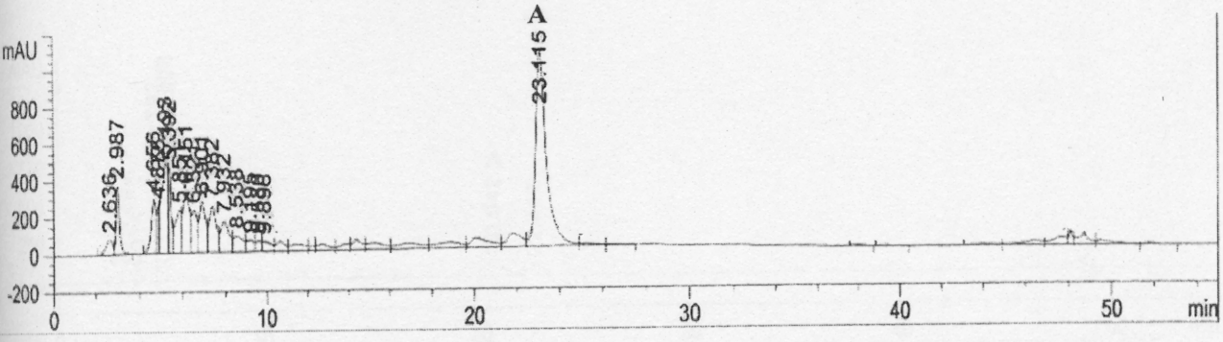
ภาพที่ 34 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA083A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1

Figure 34. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA083A, chromatograms of group 1.



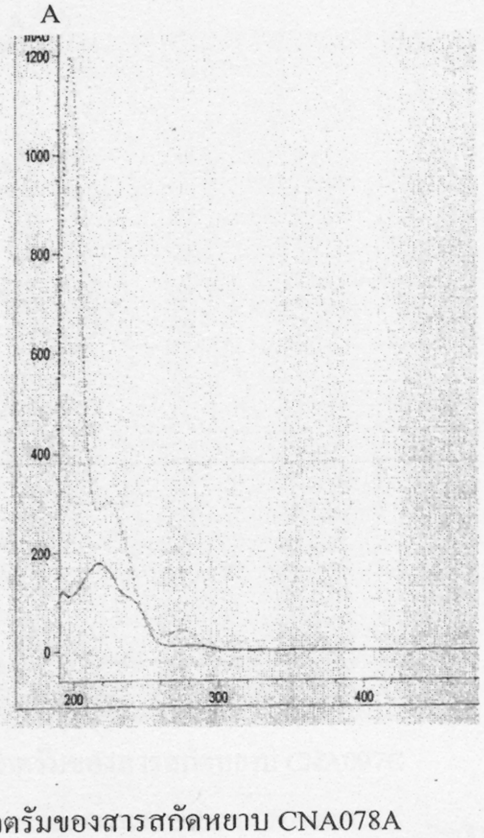
ภาพที่ 35 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA083A

Figure 35. Diode array spectrum of crude extract CNA083A.



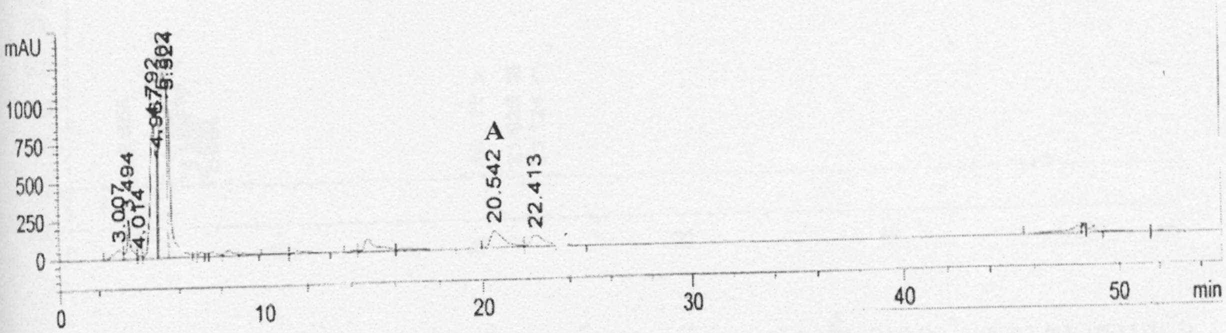
ภาพที่ 36 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA078A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2

Figure 36. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA078A, chromatograms of group 2.



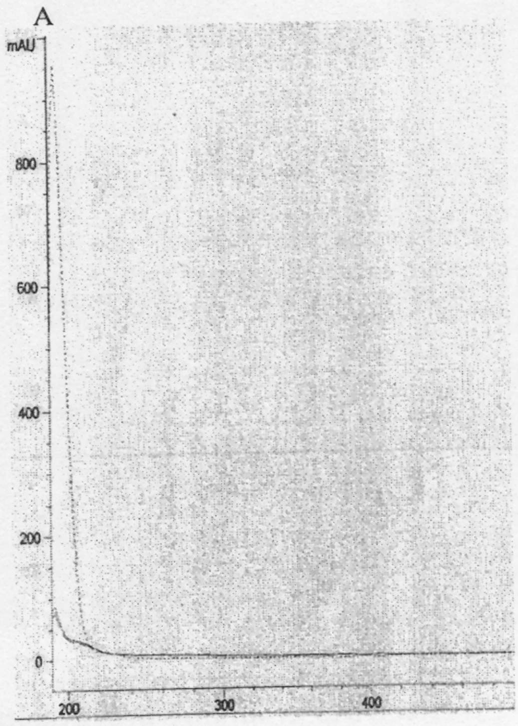
ภาพที่ 37 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA078A

Figure 37. Diode array spectrum of crude extract CNA078A.



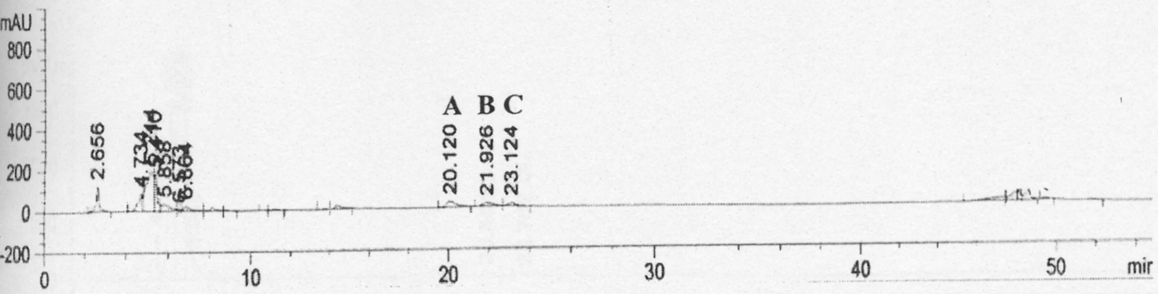
ภาพที่ 38 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA097C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3

Figure 38. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA097C, chromatograms of group 3.



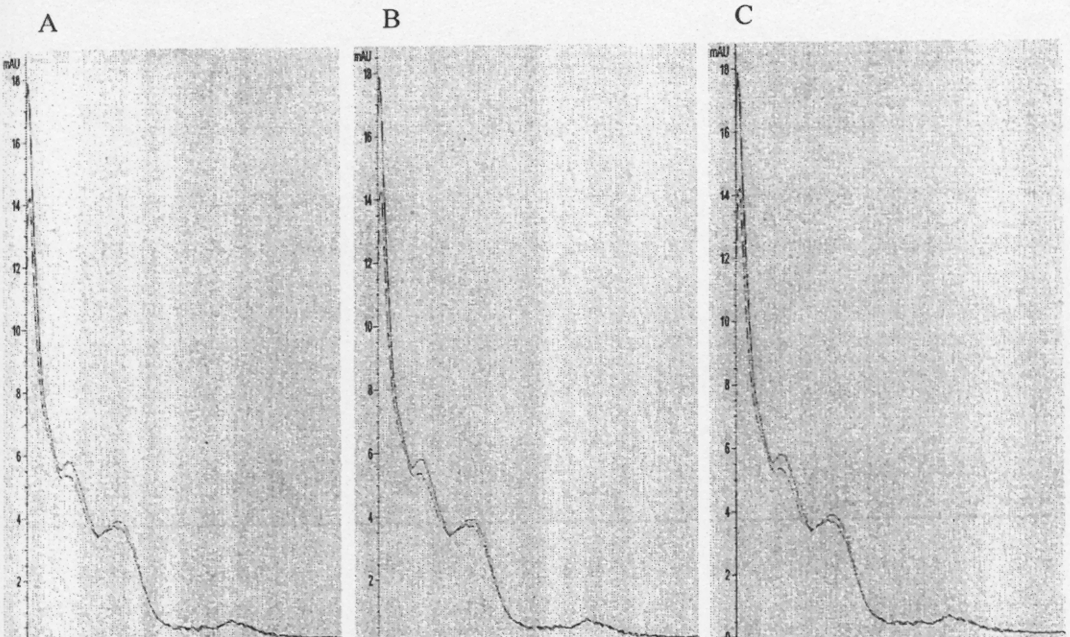
ภาพที่ 39 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA097C

Figure 39. Diode array spectrum of crude extract CNA097C.



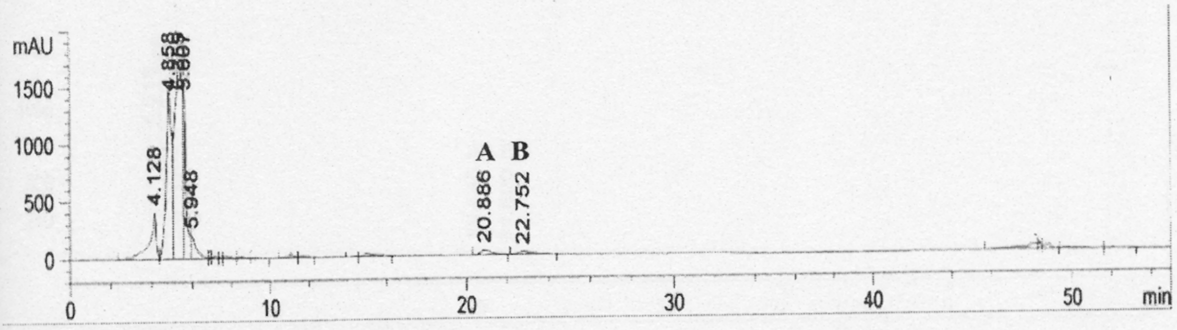
ภาพที่ 40 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA146A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 4

Figure 40. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA146A, chromatograms of group 4.



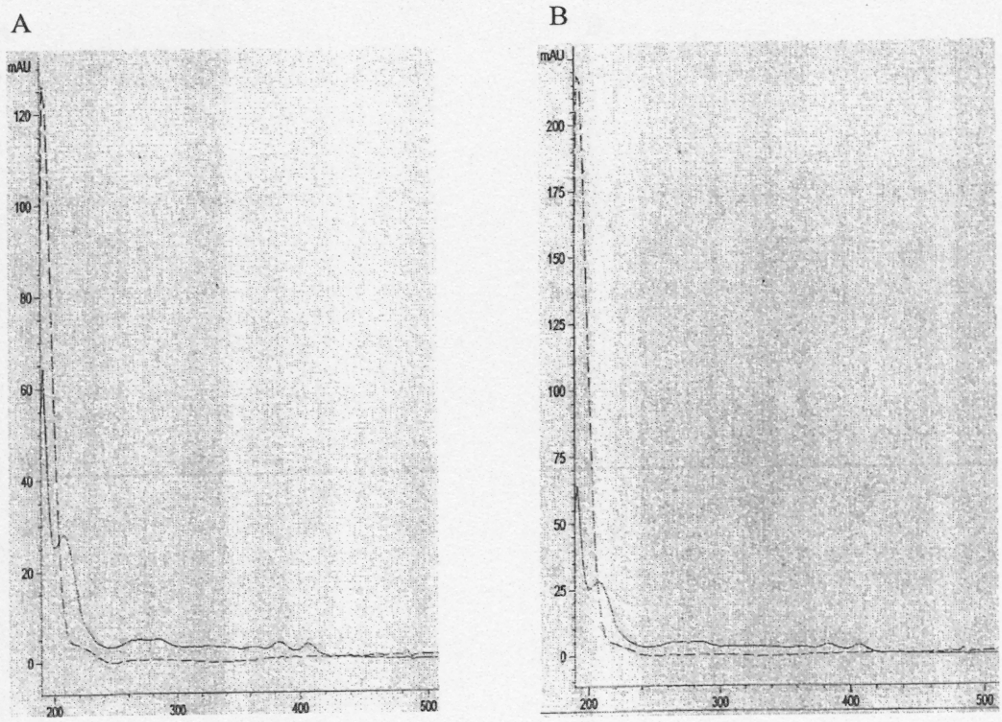
ภาพที่ 41 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA146A

Figure 41. Diode array spectrum of crude extract CNA146A.



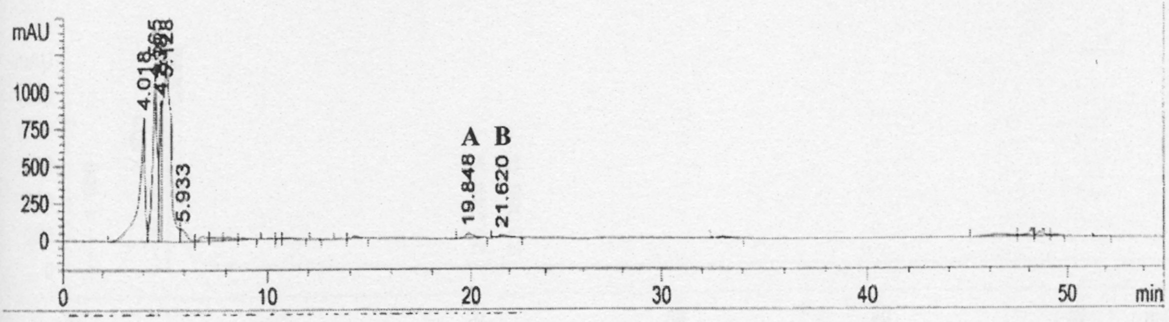
ภาพที่ 42 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA093DB ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 5

Figure 42. HPLC chromatogram analyses at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA093D, chromatograms of group 5.



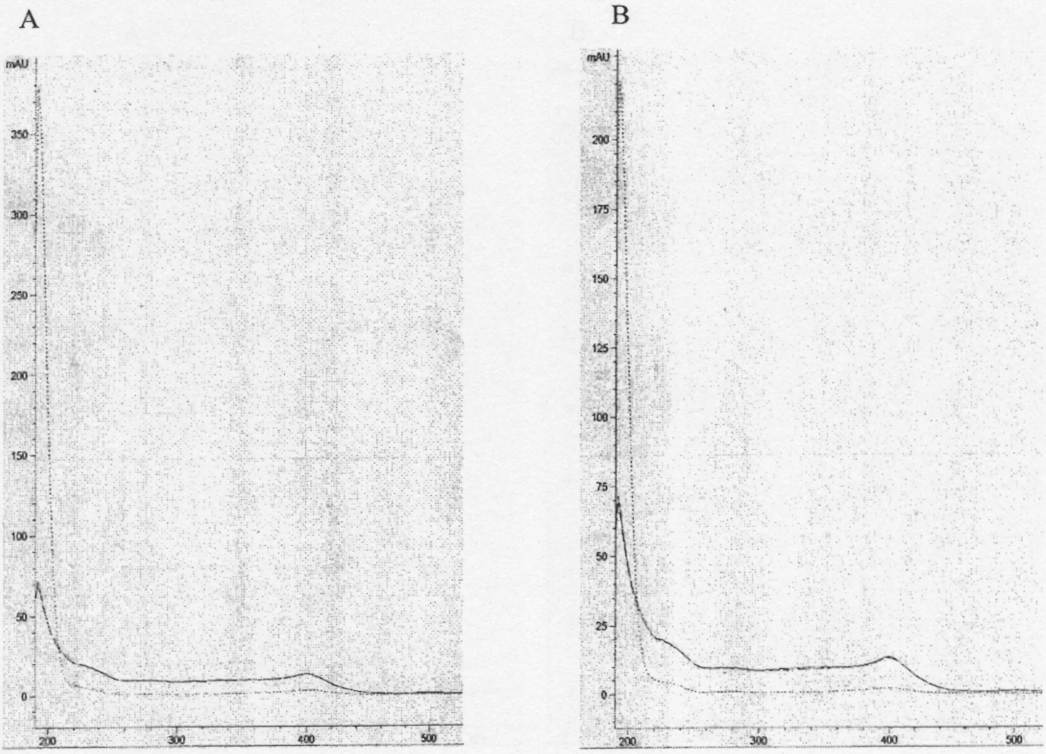
ภาพที่ 43 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA093D

Figure 43. Diode array spectrum of crude extract CNA093D.



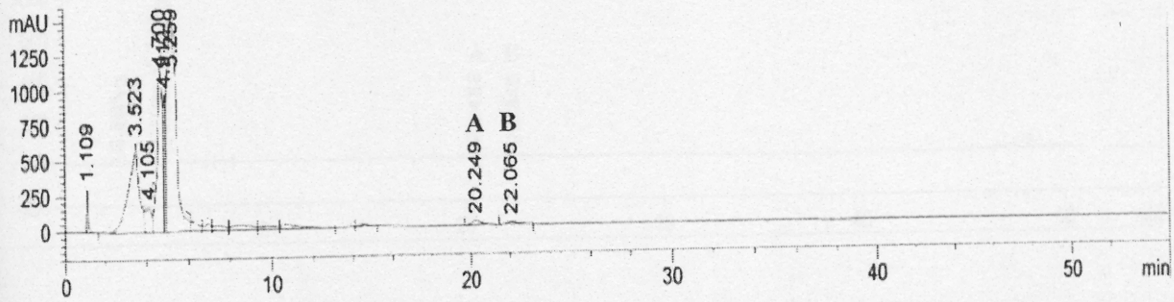
ภาพที่ 44 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA080A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 6

Figure 44. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA080A, chromatograms of group 6.



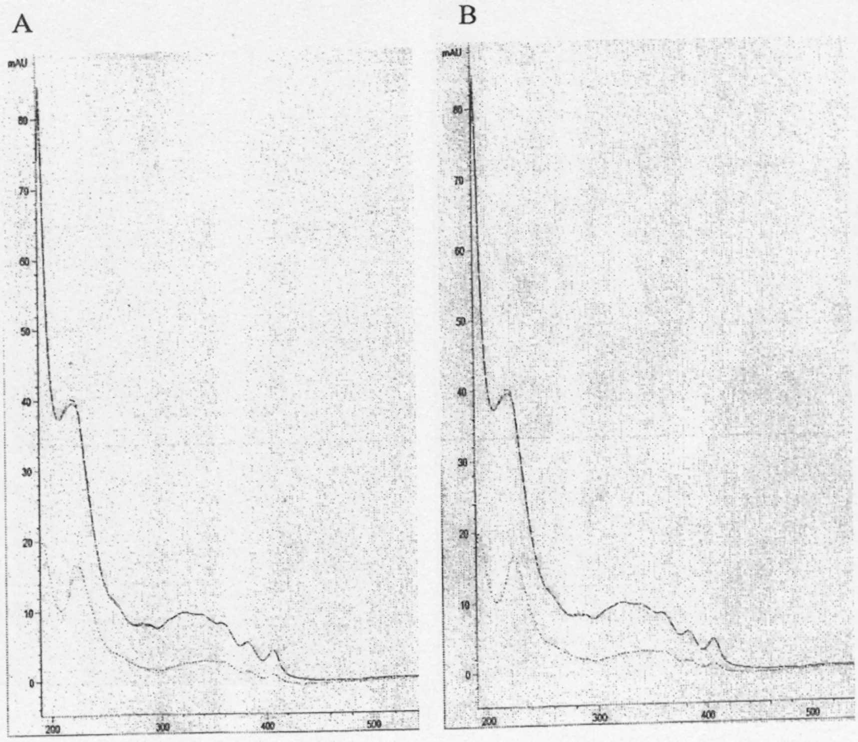
ภาพที่ 45 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA080A

Figure 45. Diode array spectrum of crude extract CNA080A.



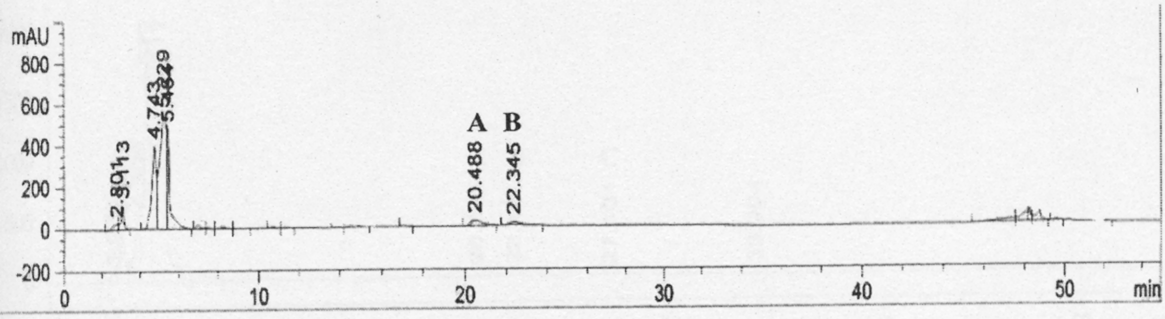
ภาพที่ 46 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA069Bความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 7

Figure 46. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA096B, chromatograms of group 7.



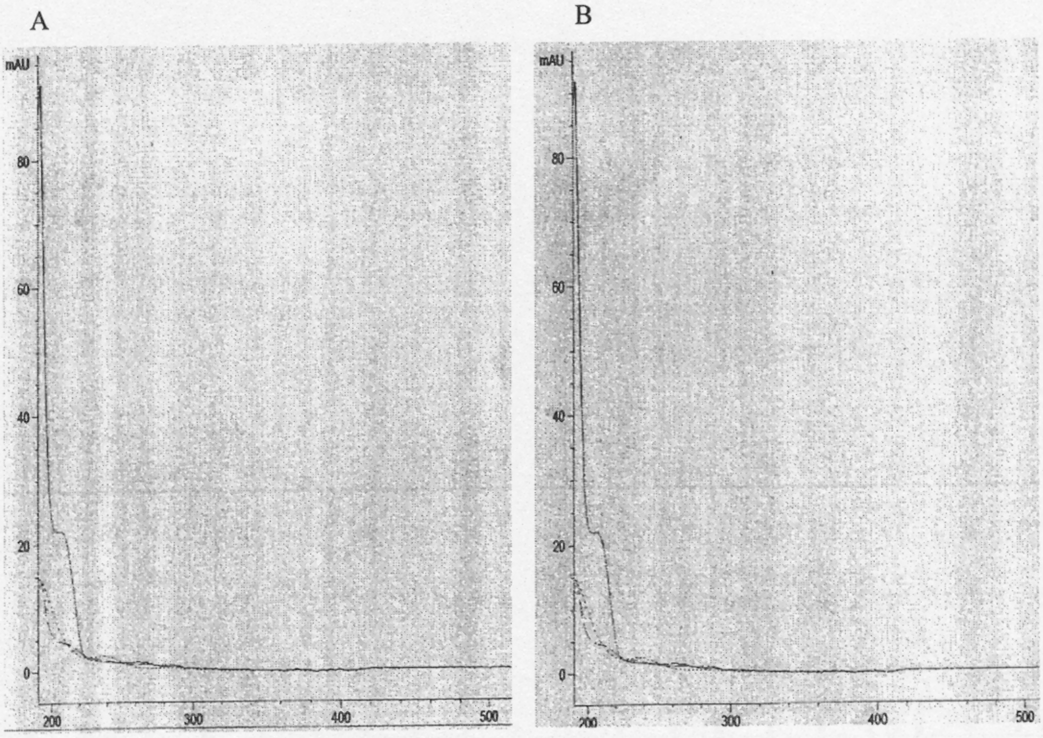
ภาพที่ 47 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA069B

Figure 47. Diode array spectrum of crude extract CNA069B.



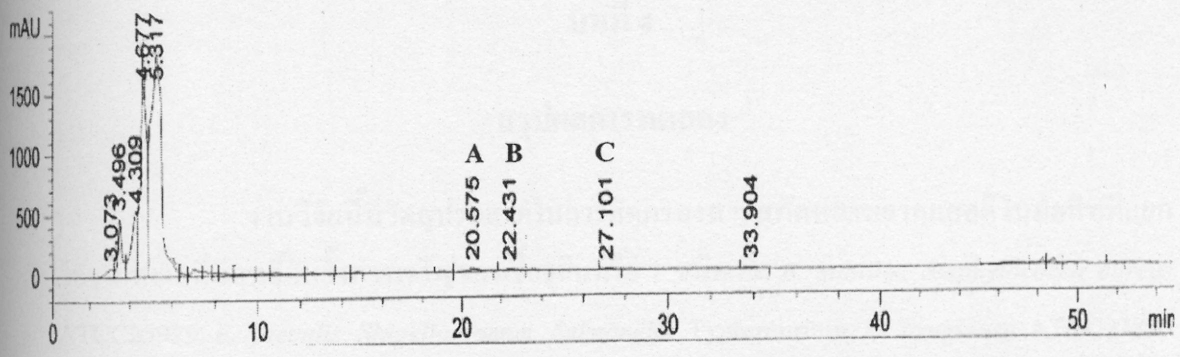
ภาพที่ 48 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA099D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 8

Figure 48. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA099D, chromatograms of group 8.



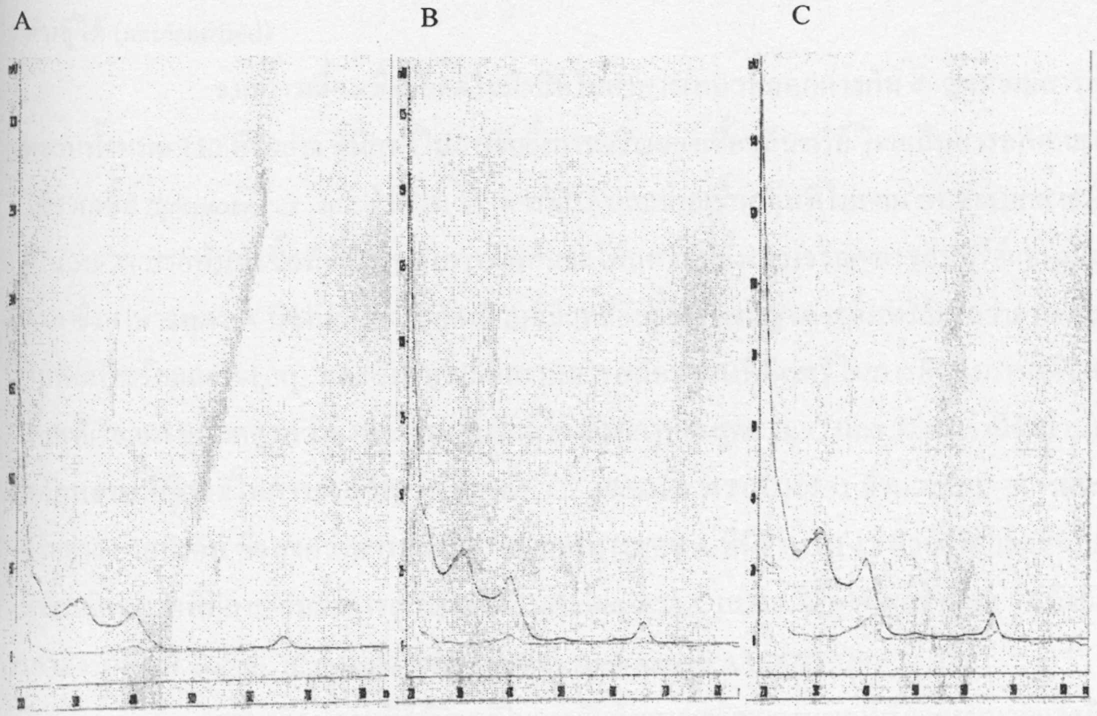
ภาพที่ 49 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA099D

Figure 49. Diode array spectrum of crude extract CNA099D.



ภาพที่ 50 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA0100A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 9

Figure 50. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA100A, chromatograms of group 9.



ภาพที่ 51 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA101A

Figure 51. Diode array spectrum of crude extract CNA101A.

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดกรองสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 7 ชนิด คือ *B. subtilis*, *Staphylococcu aureus* ATCC25929, *E. faecalis*, *Shigella sonnei*, *Salmonella* Typhimurium, *P. aruginosa* ATCC27853 และ *C. albicans* ATCC10231 โดยคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาร และจัดจำแนกสายพันธุ์ของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล จากการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลจำนวน 49 สายพันธุ์ สามารถเทียบเคียงสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทในเชื้อสกุล *Streptomyces* และ *Prauseria* โดยมีความคล้ายคลึง 99% ของแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* จำนวน 15 สายพันธุ์ และสกุล *Prauseria* จำนวน 1 สายพันธุ์ ส่วนอีก 33 สายพันธุ์ไม่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ได้ (unidentified)

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 4 สูตร พบสารสกัดหยาบทั้งหมด 112 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเป็นสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. จำนวน 15 สายพันธุ์ และจากเชื้อกลุ่มที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์จำนวน 28 สายพันธุ์ เชื้อที่เลี้ยงในอาหารต่างกันจะให้ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แตกต่างกันด้วย ซึ่งอาหารสูตร A มีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูงกว่าอาหารสูตรอื่นคิดเป็นร้อยละ 34.30 และยังพบว่ามีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกสูงกว่าอาหารสูตรอื่นอีกด้วย ส่วนอาหารสูตร B, C และ D พบว่ามีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ATCC10231 จำนวน 20, 20 และ 19 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสารสกัดหยาบจากอาหารสูตร A ที่มีจำนวน 12 ตัวอย่าง และมีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ATCC10231 ได้สูงที่สุดจำนวน 71 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *B. subtili*, *E. faecalis* และ *Staphylococcu aureus* ATCC25929

สารสกัดหยาบที่ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ที่นำมาทดสอบแต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบ คือ *Shigella sonnei*, *Salmonella* Typhimurium และ *P. aeruginosa* ATCC27853 โดยสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA053 (unidentified) เลี้ยงในอาหารสูตร A มีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 4.69 μg/ml ส่วนสายพันธุ์ที่มี

ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcu aureus* ATCC25929 ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA076 (มีค่า homology 99% ของ *Streptomyces* sp.) เลี้ยงในอาหารสูตร C มีค่า MIC เท่ากับ 75 µg/ml และสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *E. faecalis* TISTR459 ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA146 (unidentified) และ สายพันธุ์ CNA100 (มีค่า homology 99% ของ *Streptomyces* sp.) เลี้ยงในอาหารสูตร A มีค่า MIC เท่ากับ 37.5 µg/ml ส่วนสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC10231 ได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์ CNA093 (unidentified) เลี้ยงในอาหารสูตร C และ D และสายพันธุ์ CNA097 (unidentified) เลี้ยงในอาหารสูตร D มีค่า MIC เท่ากับ 9.38 µg/ml

คัดเลือกสารสกัดหยาบได้ 23 ตัวอย่าง ที่ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สูงที่สุด หรือมีฤทธิ์ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ นำมาทดสอบหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น พบสารสกัดหยาบที่มีกลุ่มสารเอมีนและกรดอะมิโน จำนวน 19 ตัวอย่าง พบกลุ่มสารเทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์ จำนวน 19 ตัวอย่าง และสารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบของแอลคาลอยด์ จำนวน 8 ตัวอย่าง และจากการจัดกลุ่มสารสกัดหยาบโดยอาศัยข้อมูลทางโครมาโตแกรมจากการทำ HPLC-DAD ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร สามารถแบ่งกลุ่มสารออกได้ 9 กลุ่ม โดยแบ่งจากการดูดกลืนแสงของสารที่ต่างกันของไดโอดอาเรย์สเปกตรัม

เอกสารอ้างอิง

สุภานันท์ แซ่ลิ้ม. 2548. สารต้านแบคทีเรียจากแอคติโนมัยสีทในทะเลของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุทัย ไทยเจริญ, พิมพ์พิมล เพ็ญจำรัส และ ทรงสุดา พรหมทอง. 2550. เอกสารการอบรมหลักสูตรการใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography รุ่น Agilent 1100. ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 21-22 มิถุนายน 2550. หน้า 31-47.

Anderson, A. N., Crawford, J. W. and McBratney, A. B. 2000. On diffusion in fractal soil structures. Soil Sci. Soc. Am. J. 64: 19-24.

Asolkar, R. N., Schroder, D., Heckmann, R., Lang, S., Wagner-Dobler, I. and Laatsch, H. 2004. Helquinoline, a new tetrahydroquinoline antibiotic from *Janibacter limosus* Hel 1. J. Antibiot. 57: 17–23.

Bernan, V. S., Montenegro, D. A., Korshalla, J. D., Maiese, W. M., Steinberq, D. A. and Greenstein, M. 1994. Bioxalomycins, new antibiotics produced by marine *Streptomyces* sp. LL-31F508: taxonomy and fermentation. J. Antibiot. 47: 1417-1424.

Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Oulmi, L., Reghioua, S., Zerizer, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A. and Boiron, A. 2005. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. J. de. Mycol. Med. 15: 39-44.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T. and Prinsep, M. R. 2005. Marine natural products. Nat. Pro. Rep. 22: 15-61.

Bruntner, C., Binder, T., Pathom-aree, W., Goodfellow, M., Bull, A. T., Potterat, O., Puder, C. H., Schmid, A., Bolek, W., Wagner, K., Mihm, G. and Fiedler, H. P. 2005. Frigocyclinone, a novel angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. J. Antibiot. 58: 346-349.

Capon, R. J., Skene, C., Lacey, E., Gill, J. H., Wicker, J., Heiland, K. and Friedel, T. 2000. Lorneamides A and B: two new aromatic amide from a southern Australian marine actinomycetes. J. Nat. Prod. 63: 1682-1683.

Charan, R. D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X. and Carter, G. T. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. J. Nat. Prod. 67: 1431-1433.

Cho, K. W., Lee, H. S., Rho, J. R., Kim, T. S. and Shin, J. 2001. New lactone-containg metabolites from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. J. Nat. Prod. 64: 664-667.

Cross, T. and Goodfellow, M. 1973. Texonomy and classification of the actinomycetes. *In* Actinomycetes characteristic and Practical Importance. (Sykes, G. and Skiner, F. A., eds.). Academic press. London.

Crueger, W. and Crueger, A. 1990. Biotechnology: a textboox of industrial microbiology. 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland.

Franzblau, S. G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M. T., Cook, M. B., Quenzer, V. K., Ferguson, R. M. and Gilman, R. H. 1998. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamarblue assay. J. Clin. Microbiol. 36: 362-366.

Goodfellow, M. and Brad, R. G. 1980. Microbiological classification and identification. 1st ed. p. 138-165. Academic Press. London.

Hall, T., A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 765-768.

Hanson, C. W. and Martin, W. J.1978. Modified agar dilution method for rapid antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. Antimicrob. Agents Chemother.13: 383–388.

He, H., Ding, W. D., Bernan, V. S., Richardson, A. D., Ireland, C. M., Greenstein, M., Ellestad, G. A. and Carter, G. T. 2001. Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomaiwittensis*. J. Am. Chem. Soc. 123: 5362-5363.

Hentschel, U., Usher, K. M., Taylor, M. W. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. FEMS Microbiol. Ecol. 55: 167-177.

Imada, C. and Okami, Y. 1994. Characteristics of marine actinomycetes isolated from deep-sea sediment and production of ß-glucosidase inhibitor. J. Mar. Biotechnol. 2: 109-113.

Jiang, Z. D., Jensen, P. R. and Fenical, W. 1997. Actinoflavoside, a novel flavoniod-like glycoside produced by a marine bacterium of the genus *Streptomyces*. Tetrahedron Lett. 38: 5065-5068.

Jensen, P. R., Dwight, R. and Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. App. Environ. Microbiol. 57: 1102-1108.

Jorgensen, J. H., Turnidge, J. D. and Washington, J. A. 1999. Antibacteria susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. *In* Manual of clinical microbiology. 7th ed. (Wood, G. L. and Washington, J. A., eds.). p. 1526-1543. American society for microbiology press.

Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. J. An. Acad. Bras. Cienc. 74: 151-170.

Kokare, R. C., Mahadik, R. K., Kadam, S. S. and Chopade, B. A. 2004. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* sp. AH1 from the west coast of India. Curr. Sci. 86: 593-597.

Kwon, H. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. and 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.

Lam, K. S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Curr. Opin. Microbiol. 9: 245-251.

Lancini, G. and Lorenzetti, R. 1993. Biology of Antibiotic-Producing Microorganisms. *In*. Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites. p. 29-60. Plemum Press. New York.

Macherla, V. R., Liu, J., Bellows, C., Teisan, S., Nicholson, B., Lam, K. S., and Potts, B. C. 2005 Glaciapyrroles A, B, and C, pyrrolosesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. J. Nat. Prod. 68: 780-783.

Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M., and Sherman, D. H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7520-7529.

Manam, R. R., Teisan, S., White, D. J., Nicholson, B., Grodberg, J., Neuteboom, S. T. C., Lam, K. S., Mosca, D. A., Lloyd, G. K. and Potts, B. C. M. 2005. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro-ß-lactone-ß-lactam antibiotic from the marine actinomycete *Streptomyces nodosus*. J. Nat. Prod. 68: 240–243.

Maskey, R. P., Li, F., Qin, S., Fiebig, H. H. and Laatsch, H. 2003. Chandrananimycins A approximately C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. J. Antibiot. 56: 622-629.

Maskey, R. P., Helmke, E., Kayser, O., Fiebig, H. H., Maier, A., Busche, A. and Laatsch, H. 2004. Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. J. Antibiot. 57: 771–779.

Maskey, R. P., Helmke, E. and Laatsch, H. 2003. Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. J. Antibiot. 56: 942–949.

Maskey, R. P., Sevvana, M., Uson, I., Helmke, E. and Laatsch, H. 2004. Gutingimycin: a highly complex metabolite from a marine Streptomycete. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 43: 1281–1283.

Mitchell, S. S., Nicholson, B., Tisan, S., Lam, K. S. and Potts, B. C. M. 2004. Aureoverticillactam a novel 22-atom macrocyclic lactam from the marine actinomycetes *Streptomyces aureoverticllatus*. J. Nat. Prod. 67: 1400-1402.

Miyadoh, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganisms approach. Actinomycetological. 9: 100-106.

Moore, B. S., Trischman, J. A., Seng, D., Kho, D., Jensen, P. R and Fenical, W. 1999. Salinamides, anti-inflammatory depsipeptides from a marine *Streptomyces*. J. Org. Chem. 64:1145-1150.

Mukku, V. J. R. V., Speitling, M., Laatsch, H. and Helmke, E. 2000. New butenolides from two marine strptomycetes. J. Nat. Prod. 66: 1570-1572.

Pathiranan, C., Dwihht, R., Jensen, P. R., Fenical, W., Delgado, A., Brinen, L. S. and Clardy, J. 1991. Structure and synthesis of a new butanolide from marine actinomycetes. Tetrahedron Lett. 32: 7001-7004.

Peng, J., Kasanah, N., Stanley, C. E., Chadwick, J., Fronczek, F. R. and Hamann, M. T. 2006. Microbial metabolism studies of cyanthiwigin B and synergetic antibiotic effects. J. Nat. Prod. 69: 727-730.

Riedlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A. T., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., Bister, B., Bischoff, D., Sussmuth, R. D and Fiedler, H. P. 2004. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosispora* strain AB-18-032. J. Antibiot. 57: 271-279.

Romeo, F., Espliego, F., Baz, J. P., Quesada, T. G., Gravalos, D., Calle, F. D. L. and Fernandez-Puentes, J. L. 1997. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. J. Antibiot. 50: 734-737.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning :a laboratory manual. 3^nd^ ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Sanchez, S. and Demain, A. L. 2002. Metabolic regulation processes. J. Enz. Microb. Tech. 31: 895-906.

Sanglier, J. J., Haag, H., Huck, T. A. and Fehr, T. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes. A short review (1988-1992). Ress. Microbiol. 144: 633-642.

Schumacher, R. W., Harrigan, B. L. and Davidson, B. S. 2001. Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete. Tetrahedron. Lett. 42: 5133-5135.

Schumacher, R. W., Talmage, S. C., Miller, S. A., Sarris, K. E., Davidson, B. S. and Goldberg, A. 2003. Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment-derived bacterium. J. Nat. Prod. 66: 1291-1293.

Sherma, J. and Fried, B. 1991. Handbook of thin-layer chromatography. Marcel dekker press. New York.

Singh, S. B. and Barrett, J.F. 2006. Empirical antibacterial drug discovery – foundation in natural products. Biochem. Pharmacol. 71: 1006-1015.

Sitachitta, N., Gadepalli, M., and Davidson, B.S. 1996. New α-pyrone-contaning metabolites from a marine-derived actinomycete. Tetrahedron. Lett. 96: 8073-8080.

Soria-Mercado, I. E., Prieto-Davo, A., Jensen, P. R. and Fenical, W. 2005. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. J. Nat. Prod. 68: 904-910.

Stach, E. M., Maldonado, L. A., Masson, D. G., Ward, A. C., Goodfellow, M. and Bull, A. T. (2003). Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6189–6200.

Stritzke, K., Schulz, S., Laatsch, H., Helmke, E. and Beil, W. 2004. Novel caprolactones from a marine Streptomycete. J. Nat. Prod. 67: 395-401.

Takahashi, A., Kurasawa, S., Ikeda, D., Okami, Y. and Takeuchi, T. 1989. Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological properties. J. Antibiot. 42: 556-561.

Tomson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic acids Res. 25: 4876-4882.

Vobis, G. 1997. Morphology of actinomycetes. *In* Atlas of Actinomycetes. (Miyadoh, S., ed.).p. 180-191. Asakura press.

Ward, A. C. and Bora, N. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. Curr. Opin. Microbiol. 9: 279-286.

William, R. H. 1989. Bergey' Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. Wiiiiam & Wilkins. Baltimore.

Woo, J. H., Kitamura, E., Myouga, H. and Kamei, Y. 2002. An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain AP77 is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp. App. Environ. Microbiol. 68: 2666-2675.

Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H. and Su, W. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. FEMS Microbiol. Lett. 188: 87-91.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร	องค์ประกอบ		
อาหารสูตร A	Sediment	1.0	g
ดัดแปลงจาก Mitchell *et al.*, 2004	Algae	2.0	g
	Shrimp shell powder	1.0	g
	Sea water	100	ml
อาหารสูตร B	Glycerol	2.0	g
ดัดแปลงจาก Capon *et al.*, 2000	Soytone	1.0	g
	Sea water	100.0	ml
อาหารสูตร C	Polypeptone	1.0	g
ดัดแปลงจาก Moor *et al.*, 1999	Soluble starch	1.0	g
	Yeast extracts	1.0	g
	Sea water	100.0	ml
อาหารสูตร D	Peptone	0.5	g
ดัดแปลงจาก Imada and Okami, 1994	Yeast extract	0.5	g
	Sea water	100.0	ml

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำทะเล 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบ Thin layer chromatography

องค์ประกอบของสาร

สารละลาย	องค์ประกอบ		
Wagner	Iodine	2.0	g
	KI	6.0	g
	Water	100	ml
Ninhydrin	Ninhydrin	200.0	mg
	Acetic acid	5.0	ml
	Butanol	95.0	ml
Vanillin	Vanillin	15.0	g
	Conc. Sulfuric acid	2.5	ml
	Ethanol	250.0	ml

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในตัวทำละลาย คนให้เข้ากันแล้วเก็บในภาชนะทึบแสง

ภาคผนวก ค

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีท

ตาราง 16 สารสกัดที่หาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *B. subtilis, Staphylococcus aureus, E. faecalis, Shigella sonnei, Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 150 µg/ml

Table 16. Crude extracts inhibition against *B. subtilis, Staphylococcus aureus, E. faecalis, Shigella sonnei, Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginos* and *C. albicans* at crude extract concentration 150 µg/ml.

No.	Crude extracts	Antibacterial Activities						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
1	CNA035 A	-	-	-	-	-	-	-
2	CNA035 B	-	-	-	-	-	-	-
3	CNA035 C	-	-	-	-	-	-	-
4	CNA035 D	-	-	-	-	-	-	-
5	CNA053A	-	-	-	-	-	-	-
6	CNA053 B	+	-	-	-	-	-	+
7	CNA053 C	-	-	-	-	-	-	-
8	CNA053 D	-	-	-	-	-	-	+
9	CNA055 A	-	-	-	-	-	-	-
10	CNA055 B	+	-	-	-	-	-	+
11	CNA055 C	-	-	-	-	-	-	-
12	CNA055 D	-	-	-	-	-	-	-
13	CNA056 A	-	-	-	-	-	-	-
14	CNA056 B	-	-	-	-	-	-	-
15	CNA056 C	-	-	-	-	-	-	-
16	CNA056 D	-	-	-	-	-	-	-
17	CNA057 A	-	-	-	-	-	-	-
18	CNA057 B	-	-	-	-	-	-	-
19	CNA057 C	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

Table 16. (Continue)

No.	Crude extracts	Antibacterial Activities						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
20	CNA057 D	-	-	-	-	-	-	-
21	CNA058 A	-	-	-	-	-	-	-
22	CNA058 B	-	-	-	-	-	-	+
23	CNA058 C	-	-	-	-	-	-	+
24	CNA058 D	-	-	-	-	-	-	-
25	CNA059 A	-	-	-	-	-	-	-
26	CNA059 B	+	-	-	-	-	-	+
27	CNA059 C	-	-	-	-	-	-	+
28	CNA059 D	-	-	-	-	-	-	-
29	CNA060 A	-	-	-	-	-	-	-
30	CNA060 B	-	-	-	-	-	-	+
31	CNA060 C	-	-	-	-	-	-	+
32	CNA060 D	-	-	-	-	-	-	+
33	CNA061 A	-	-	-	-	-	-	-
34	CNA061 B	-	-	-	-	-	-	+
35	CNA061 C	-	-	-	-	-	-	+
36	CNA061 D	-	-	-	-	-	-	+
37	CNA062 A	-	-	-	-	-	-	-
38	CNA062 B	-	-	-	-	-	-	+
39	CNA062 C	-	-	-	-	-	-	-
40	CNA062 D	-	-	-	-	-	-	-
41	CNA063 A	+	-	+	-	-	-	-
42	CNA063 B	+	+	+	-	-	-	-
43	CNA063 C	-	-	-	-	-	-	-
44	CNA063 D	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

Table 16. (Continue)

No.	Crude extracts	Antibacterial Activities						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
45	CNA064 A	-	-	-	-	-	-	+
46	CNA064 B	-	-	-	-	-	-	+
47	CNA064 C	-	-	-	-	-	-	+
48	CNA064 D	-	-	-	-	-	-	-
49	CNA065 A	-	-	-	-	-	-	-
50	CNA065 B	-	-	-	-	-	-	+
51	CNA065 C	-	-	-	-	-	-	+
52	CNA065 D	-	-	-	-	-	-	+
53	CNA066 A	-	-	-	-	-	-	+
54	CNA066 B	-	-	-	-	-	-	+
55	CNA066 C	-	-	-	-	-	-	+
56	CNA066 D	-	-	-	-	-	-	-
57	CNA067 A	-	-	-	-	-	-	-
58	CNA067 B	-	-	-	-	-	-	-
59	CNA067 C	-	-	-	-	-	-	-
60	CNA067 D	-	-	-	-	-	-	-
61	CNA068 A	-	-	-	-	-	-	-
62	CNA068 B	-	-	-	-	-	-	+
63	CNA068 C	-	-	-	-	-	-	+
64	CNA068 D	-	-	-	-	-	-	-
65	CNA069 A	-	-	+	-	-	-	-
66	CNA069 B	-	-	-	-	-	-	+
67	CNA069 C	-	-	-	-	-	-	-
68	CNA069 D	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

Table 16. (Continue)

No.	Crude extracts	Antibacterial Activities						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
69	CNA070 A	+	+	+	-	-	-	+
70	CNA070 B	-	-	-	-	-	-	+
71	CNA070 C	-	-	-	-	-	-	-
72	CNA070 D	-	-	-	-	-	-	+
73	CNA071 A	-	-	+	-	-	-	+
74	CNA071 B	-	-	-	-	-	-	-
75	CNA071 C	+	-	-	-	-	-	-
76	CNA071 D	-	-	-	-	-	-	+
77	CNA072 A	-	-	-	-	-	-	+
78	CNA072 B	+	+	+	-	-	-	+
79	CNA072 C	-	-	-	-	-	-	+
80	CNA072 D	-	-	+	-	-	-	-
81	CNA073 A	-	-	+	-	-	-	+
82	CNA073 B	-	-	-	-	-	-	-
83	CNA073 C	+	-	-	-	-	-	+
84	CNA073 D	-	-	-	-	-	-	-
85	CNA074 A	-	-	+	-	-	-	+
86	CNA074 B	+	-	-	-	-	-	-
87	CNA074 C	+	-	-	-	-	-	-
88	CNA074 D	-	-	+	-	-	-	+
89	CNA075 A	-	-	-	-	-	-	+
90	CNA075 B	+	-	-	-	-	-	-
91	CNA075 C	+	-	-	-	-	-	-
92	CNA075 D	+	-	-	-	-	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

Table 16. (Continue)

No.	Crude extracts	Antibacterial Activities						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
93	CNA076 A	+	+	+	-	-	-	+
94	CNA076 B	-	+	+	-	-	-	+
95	CNA076 C	+	+	+	-	-	-	+
96	CNA076 D	-	-	+	-	-	-	+
97	CNA077 A	+	+	-	-	-	-	+
98	CNA077 B	+	-	-	-	-	-	-
99	CNA077 C	+	+	-	-	-	-	-
100	CNA077 D	+	-	-	-	-	-	+
101	CNA078 A	+	+	+	-	-	-	+
102	CNA078 B	+	-	+	-	-	-	+
103	CNA078 C	-	-	+	-	-	-	+
104	CNA078 D	-	-	-	-	-	-	+
105	CNA079 A	+	+	+	-	-	-	-
106	CNA079 B	+	-	-	-	-	-	-
107	CNA079 C	+	+	+	-	-	-	+
108	CNA079 D	+	-	+	-	-	-	+
109	CNA080 A	+	+	+	-	-	-	+
110	CNA080 B	+	-	+	-	-	-	-
111	CNA080 C	+	-	-	-	-	-	+
112	CNA080 D	-	-	+	-	-	-	+
113	CNA083 A	+	+	+	-	-	-	-
114	CNA083 B	-	-	-	-	-	-	+
115	CNA083 C	-	-	-	-	-	-	+
116	CNA083 D	+	-	-	-	-	-	+

ตาราง 16 (ต่อ)

Table 16. (Continue)

No.	Crude extracts	Antibacterial Activities						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
117	CNA086 A	+	-	+	-	-	-	-
118	CNA086 B	-	-	-	-	-	-	-
119	CNA086 C	-	-	-	-	-	-	+
120	CNA086 D	+	-	-	-	-	-	+
121	CNA088 A	+	-	-	-	-	-	-
122	CNA088 B	-	-	-	-	-	-	+
123	CNA088 C	-	-	-	-	-	-	+
124	CNA088 D	-	-	-	-	-	-	+
125	CNA089 A	-	-	-	-	-	-	-
126	CNA089 B	-	-	-	-	-	-	+
127	CNA089 C	-	-	-	-	-	-	+
128	CNA089 D	-	-	-	-	-	-	+
129	CNA090 A	-	-	-	-	-	-	-
130	CNA090 B	-	-	-	-	-	-	-
131	CNA090 C	-	-	-	-	-	-	+
132	CNA090 D	-	-	-	-	-	-	-
133	CNA091 A	-	-	-	-	-	-	-
134	CNA091 B	-	-	-	-	-	-	+
135	CNA091 C	-	-	-	-	-	-	+
136	CNA091 D	-	-	-	-	-	-	+
137	CNA092 A	+	-	-	-	-	-	-
138	CNA092 B	-	-	-	-	-	-	+
139	CNA092 C	-	-	-	-	-	-	+
140	CNA092 D	-	-	-	-	-	-	+

ตาราง 16 (ต่อ)

Table 16. (Continue)

No.	Crude extracts	Antibacterial Activities						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
141	CNA093 A	+	-	-	-	-	-	-
142	CNA093 B	-	-	-	-	-	-	-
143	CNA093 C	-	-	-	-	-	-	+
144	CNA093 D	-	-	-	-	-	-	+
145	CNA095 A	+	-	+	-	-	-	-
146	CNA095 B	-	-	-	-	-	-	-
147	CNA095 C	-	-	-	-	-	-	-
148	CNA095 D	+	-	-	-	-	-	-
149	CNA097 A	+	-	+	-	-	-	-
150	CNA097 B	-	-	-	-	-	-	-
151	CNA097 C	-	-	-	-	-	-	+
152	CNA097 D	+	-	-	-	-	-	+
153	CNA098 A	+	-	-	-	-	-	-
154	CNA098 B	-	-	-	-	-	-	-
155	CNA098 C	-	-	-	-	-	-	+
156	CNA098 D	+	-	-	-	-	-	+
157	CNA099 A	+	-	-	-	-	-	-
158	CNA099 B	-	-	-	-	-	-	-
159	CNA099 C	-	-	-	-	-	-	+
160	CNA099 D	-	-	-	-	-	-	+
161	CNA100 A	+	-	+	-	-	-	+
162	CNA100 B	-	-	-	-	-	-	-
163	CNA100 C	-	-	-	-	-	-	+
164	CNA100 D	+	-	-	-	-	-	+

ตาราง 16 (ต่อ)

Table 16. (Continue)

No.	Crude extracts	Antibacterial Activities						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
165	CNA101 A	+	-	+	-	-	-	-
166	CNA101 B	-	-	-	-	-	-	-
167	CNA101 C	-	-	-	-	-	-	-
168	CNA101 D	+	-	-	-	-	-	-
169	CNA102 A	+	-	+	-	-	-	-
170	CNA102 B	+	-	-	-	-	-	-
171	CNA102 C	-	-	-	-	-	-	-
172	CNA102 D	+	-	-	-	-	-	-
173	CNA103 A	+	-	+	-	-	-	-
174	CNA103 B	-	-	-	-	-	-	-
175	CNA103 C	+	-	-	-	-	-	-
176	CNA103 D	-	+	-	-	-	-	-
177	CNA104 A	+	-	+	-	-	-	-
178	CNA104 B	+	-	-	-	-	-	-
179	CNA104 C	+	-	-	-	-	-	-
180	CNA104 D	-	-	-	-	-	-	-
181	CNA112 A	+	-	+	-	-	-	-
182	CNA112 B	-	-	-	-	-	-	-
183	CNA112 C	-	-	-	-	-	-	-
184	CNA112 D	-	-	-	-	-	-	-
185	CNA113 A	-	-	-	-	-	-	-
186	CNA113 B	-	-	-	-	-	-	-
187	CNA113 C	-	-	-	-	-	-	-
188	CNA113 D	+	-	-	-	-	-	-

ตาราง 16 (ต่อ)

Table 16. (Continue)

No.	Crude extracts	Antibacterial Activities						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
189	CNA145 A	-	-	-	-	-	-	-
190	CNA145 B	-	-	-	-	-	-	-
191	CNA145 C	-	-	-	-	-	-	-
192	CNA145 D	-	-	-	-	-	-	-
193	CNA146 A	+	+	+	-	-	-	-
194	CNA146 B	-	-	-	-	-	-	-
195	CNA146 C	-	-	-	-	-	-	-
196	CNA146 D	-	-	-	-	-	-	-

BS; ***Bacillus subtilis***, SA; ***Staphylococus aureus***, EF; ***Enterococcus faecalis***, SS; ***Shigella sonnei***, ST; ***Salmonella*** Typhimurium , PA; ***Pseudomonas aeruginosa***, CA; ***Candida albicans***

ตาราง 17 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *B. subtilis, Staphylococcus aureus, E. faecalis, Shigella sonnei, Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginosa* และ *C albicans* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัด 150 µg/ml

Table 17. Minimum inhibitory concentration of crude extract against *B. subtilis, Staphylococcus aureus, E. faecalis, Shigella sonnei, Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginosa* and *C. albicans* at crude extract concentration 150 µg/ml.

No.	Crude extracts	Microorganism						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
1	CNA053 B	4.69	-	-	-	-	-	150
2	CNA053 D	-	-	-	-	-	-	150
3	CNA055 B	18.75	-	-	-	-	-	150
4	CNA058 B	-	-	-	-	-	-	150
5	CNA058 C	-	-	-	-	-	-	150
6	CNA059 B	150	-	-	-	-	-	150
7	CNA059 C	-	-	-	-	-	-	150
8	CNA060 B	-	-	-	-	-	-	150
9	CNA060 C	-	-	-	-	-	-	150
10	CNA060 D	-	-	-	-	-	-	150
11	CNA061 B	-	-	-	-	-	-	150
12	CNA061 C	-	-	-	-	-	-	150
13	CNA061 D	-	-	-	-	-	-	150
14	CNA062 B	-	150	-	-	-	-	75
15	CNA063 A	75	-	150	-	-	-	-
16	CNA063 B	18.75	-	150	-	-	-	-
17	CNA064 A	-	-	-	-	-	-	75
18	CNA064 B	-	-	-	-	-	-	75
19	CNA064 C	-	-	-	-	-	-	75
20	CNA065 B	-	-	-	-	-	-	150
21	CNA065 C	-	-	-	-	-	-	150

ตาราง 17 (ต่อ)

Table 17. (Continue)

No.	Crude extracts	Microorganism						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
22	CNA065 D	-	-	-	-	-	-	150
23	CNA066 A	-	-	-	-	-	-	150
24	CAN066 B	-	-	-	-	-	-	150
25	CNA066 C	-	-	-	-	-	-	150
26	CNA068 B	-	-	-	-	-	-	75
27	CNA068 C	-	-	-	-	-	-	75
28	CNA069 B	-	-	-	-	-	-	150
29	CNA070 A	150	150	150	-	-	-	150
30	CNA070 B	-	-	-	-	-	-	150
31	CNA070 D	-	-	-	-	-	-	150
32	CNA071 A	-	-	150	-	-	-	150
33	CNA071 C	150	-	-	-	-	-	-
34	CNA071 D	-	-	-	-	-	-	150
35	CNA072 A	-	-	-	-	-	-	150
36	CNA072 B	150	150	150	-	-	-	150
37	CNA072 C	-	-	-	-	-	-	150
38	CNA072 D	-	-	150	-	-	-	-
39	CNA073 A	-	-	150	-	-	-	150
40	CNA073 C	150	-	-	-	-	-	150
41	CNA074 A	-	-	150	-	-	-	150
42	CNA074 B	150	-	-	-	-	-	-
43	CNA074 C	150	-	-	-	-	-	-
44	CNA074 D	-	-	-	-	-	-	150
45	CNA075 A	-	-	-	-	-	-	150
46	CNA075 B	150	-	-	-	-	-	-

ตาราง 17 (ต่อ)

Table 17. (Continue)

No.	Crude extracts	Microorganism						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
47	CAN075 C	75	-	-	-	-	-	-
48	CNA075 D	150	-	-	-	-	-	-
49	CNA076 A	150	150	150	-	-	-	150
50	CNA076 B	-	150	150	-	-	-	150
51	CNA076 C	150	75	150	-	-	-	150
52	CNA076 D	-	-	150	-	-	-	150
53	CNA077 A	150	150	-	-	-	-	150
54	CNA077 B	150	-	-	-	-	-	-
55	CNA077 C	150	150	-	-	-	-	-
56	CNA077 D	150	-	-	-	-	-	150
57	CNA078 A	150	150	150	-	-	-	150
58	CNA078 B	75	-	150	-	-	-	75
59	CNA078 C	150	-	150	-	-	-	150
60	CNA078 D	-	-	-	-	-	-	150
61	CNA079 A	150	150	150	-	-	-	-
62	CNA079 B	150	-	-	-	-	-	-
63	CNA079 C	150	150	75	-	-	-	150
64	CNA079 D	150	-	75	-	-	-	75
65	CNA080 A	150	150	75	-	-	-	150
66	CNA080 B	150	-	150	-	-	-	-
67	CNA080 C	150	-	-	-	-	-	150
68	CNA080 D	-	-	150	-	-	-	150
69	CNA083 A	37.5	150	75	-	-	-	-
70	CNA083 D	150	-	-	-	-	-	-
71	CNA086 A	37.5	-	-	-	-	-	-

ตาราง 17 (ต่อ)

Table 17. (Continue)

No.	Crude extracts	Microorganism						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
72	CNA086 C	-	-	-	-	-	-	18.75
73	CNA086 D	150	-	75	-	-	-	37.5
74	CNA088 A	75	-	-	-	-	-	-
75	CNA088 B	-	-	-	-	-	-	150
76	CNA089 B	-	-	-	-	-	-	150
77	CNA089 C	-	-	-	-	-	-	75
78	CNA089 D	-	-	-	-	-	-	150
79	CNA091 B	-	-	-	-	-	-	150
80	CNA091 C	-	-	-	-	-	-	18.75
81	CNA091 D	-	-	-	-	-	-	75
82	CNA092 A	150	-	-	-	-	-	-
83	CNA092 B	-	-	-	-	-	-	150
84	CNA093 A	37.5	-	-	-	-	-	-
85	CNA093 C	-	-	-	-	-	-	9.38
86	CNA093 D	-	-	-	-	-	-	9.38
87	CNA095 A	75	-	150	-	-	-	-
88	CNA095 D	37.5	-	-	-	-	-	-
89	CNA097 A	75	-	75	-	-	-	-
90	CNA097 C	-	-	-	-	-	-	9.38
91	CNA097 D	-	-	-	-	-	-	18.75
92	CNA098 A	75	-	-	-	-	-	-
93	CNA098 D	150	-	-	-	-	-	-
94	CNA099 A	150	-	-	-	-	-	-
95	CNA099 C	-	-	-	-	-	-	18.75

ตาราง 17 (ต่อ)

Table 17. (Continue)

No.	Crude extracts	Microorganism						
		BS	SA	EF	ST	SS	PA	CA
96	CNA099 D	-	-	-	-	-	-	-
97	CNA100 A	37.5	-	37.5	-	-	-	-
98	CNA101 A	75	-	150	-	-	-	-
99	CNA101 D	150	-	-	-	-	-	18.75
100	CNA102 A	37.5	-	150	-	-	-	37.5
101	CNA102 B	150	-	-	-	-	-	-
102	CNA102 D	37.5	-	-	-	-	-	-
103	CNA103 A	75	-	-	-	-	-	-
104	CNA103 C	-	150	-	-	-	-	-
105	CNA103 D	150	-	150	-	-	-	-
106	CNA104 A	150	-	-	-	-	-	-
107	CNA104 B	150	-	-	-	-	-	-
108	CNA104 C	150	-	-	-	-	-	-
109	CNA104 D	150	-	-	-	-	-	-
110	CNA112 A	75	-	-	-	-	-	-
111	CNA145 A	150	150	-	-	-	-	-
112	CNA146 A	75	150	37.5	-	-	-	-

BS; *Bacillus subtilis*, SA; *Staphylococus aureus*, EF; *Enterococcus faecalis*, SS; *Shigella sonnei*, ST; *Salmonella* Typhimurium , PA; *Pseudomonas aeruginosa*, CA; *Candida albicans*

ตาราง 18 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *B. subtilis, Staphylococcus aureus, E. faecalis, Shigella sonnei, Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสาร 150 µg/ml

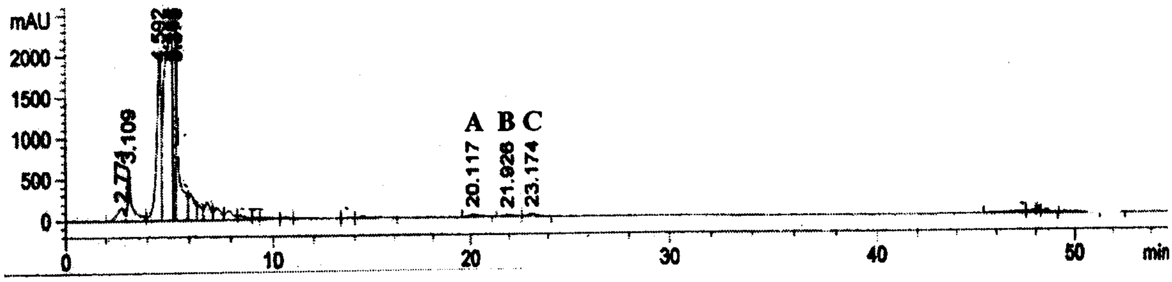
Table 18. The MBC and MFC of crude extract against *B. subtilis, Staphylococcus aureus, E. faecalis, Shigella sonnei, Salmonella* Typhimurium, *P. aeruginosa* and *C. albicans* at crude extract concentration 150 µg/ml.

No.	Crude extracts	Microorganism						
		B. subtilis	*S. aureus*	*E. faecalis*	*S. thypi*	*S. sonnei*	*P. aeruginosa*	*C. albicans*
1	CNA069 B	-	-	-	-	-	-	150
2	CNA074 D	-	-	-	-	-	-	150
3	CNA075 B	150	-	-	-	-	-	-
4	CNA076 B	-	-	-	-	-	-	150
5	CNA077 A	-	-	-	-	-	-	150
6	CNA078 A	-	-	-	-	-	-	150
7	CNA078 B	-	-	-	-	-	-	75
8	CNA079 B	150	-	-	-	-	-	-
9	CNA079 C	150	-	-	-	-	-	150
10	CNA079 D	150	-	-	-	-	-	150
11	CNA080 A	-	-	-	-	-	-	150
12	CNA083 A	-	150	150	-	-	-	-
13	CNA086 D	-	-	150	-	-	-	150
14	CNA093 C	-	-	-	-	-	-	75
15	CNA093 D	-	-	-	-	-	-	75
16	CNA097 C	-	-	-	-	-	-	150
17	CNA097 D	-	-	-	-	-	-	150
18	CNA099 C	-	-	-	-	-	-	150
19	CNA099 D	-	-	-	-	-	-	150
20	CNA100 A	-	-	150	-	-	-	-
21	CNA103 D	-	150	-	-	-	-	-
22	CNA146 A	-	150	-	-	-	-	-

BS; *Bacillus subtilis*, SA; *Staphylococus aureus*, EF; *Enterococcus faecalis*, SS; *Shigella sonnei*, ST; *Salmonella* Typhimurium , PA; *Pseudomonas aeruginosa*, CA; *Candida albicans*

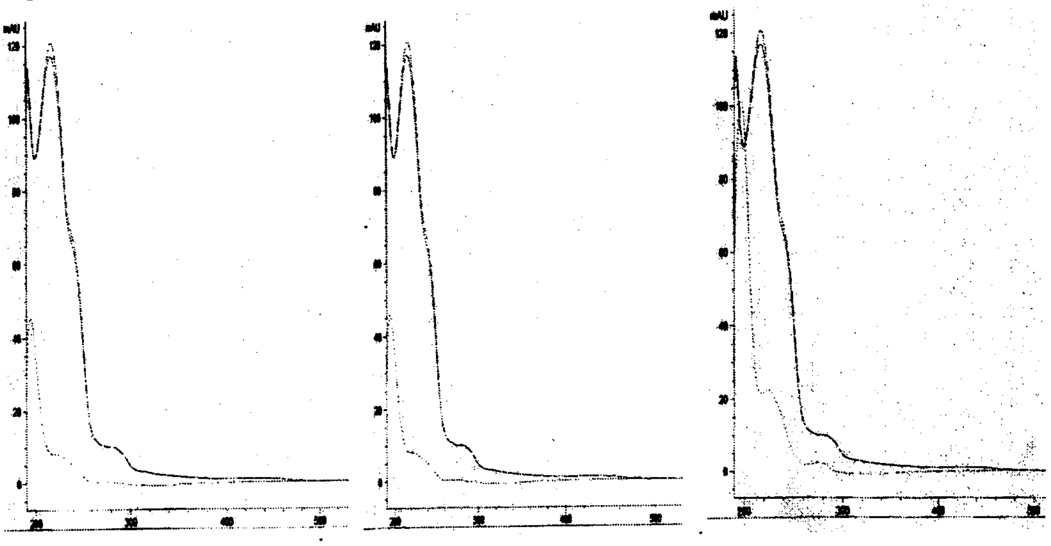
ภาคผนวก ง

โครมาโตแกรมและไดโอดอาเรย์สเปกตรัมสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีท



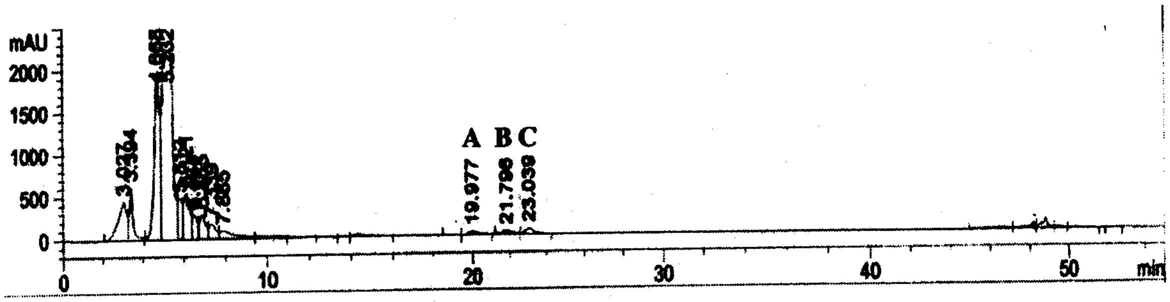
ภาพที่ 52 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA053B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1

Figure 52. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA053B, chromatograms of group 1.



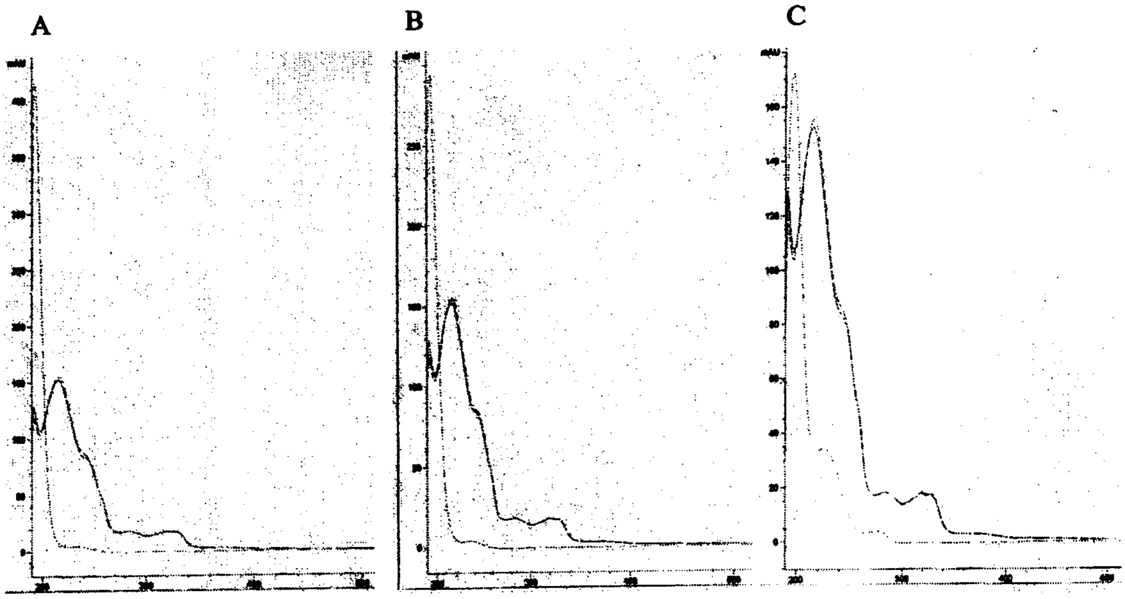
ภาพที่ 53 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA053B

Figure 53. Diode array spectrum of crude extract CNA053B.



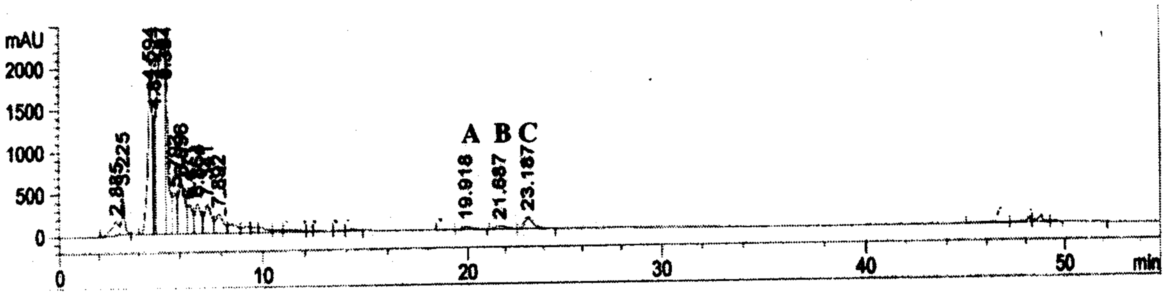
ภาพที่ 54 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA074Dความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1

Figure 54. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA074D, chromatograms of group 1.



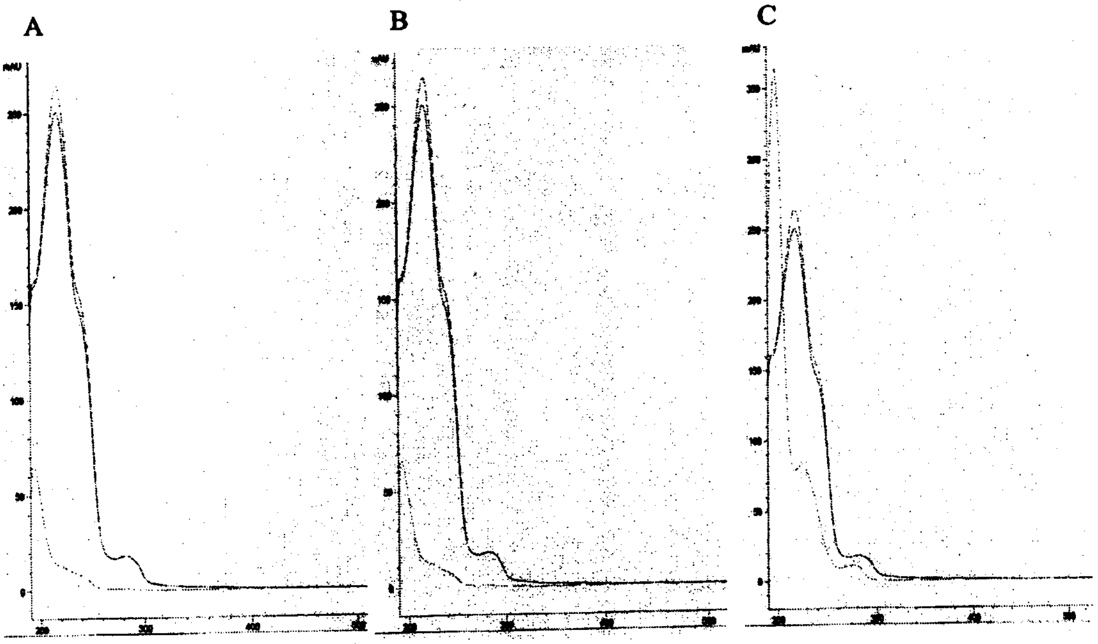
ภาพที่ 55 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA074D

Figure 55. Diode array spectrum of crude extract CNA074D.



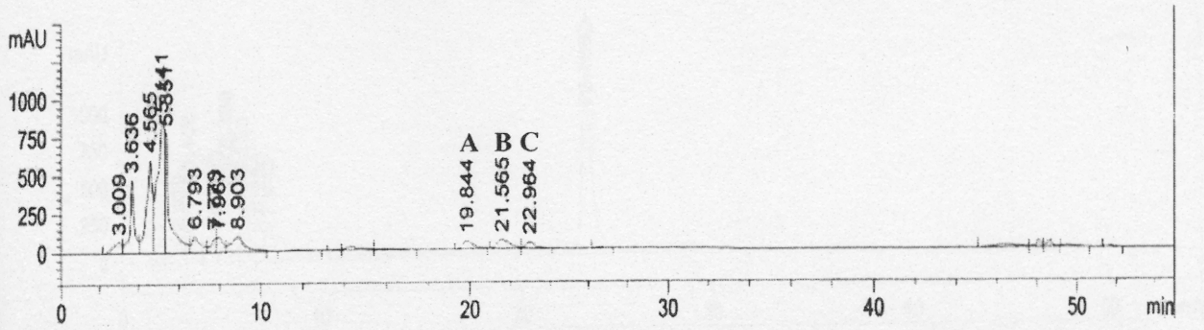
ภาพที่ 56 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA079B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1.

Figure 56. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA079B, chromatograms of group 1.



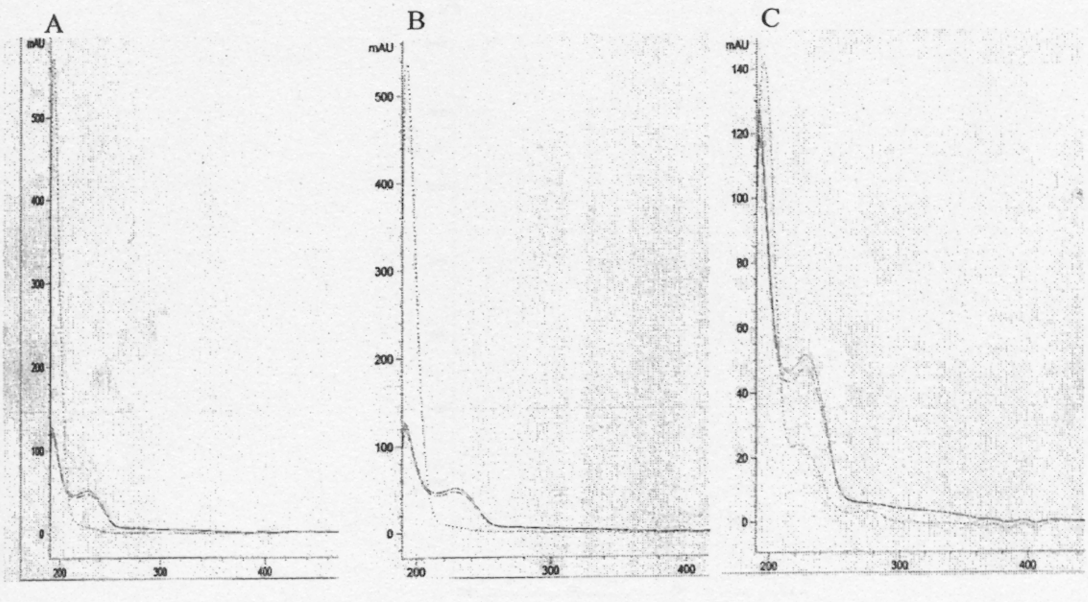
ภาพที่ 57 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA079B

Figure 57. Diode array spectrum of crude extract CNA079B.



ภาพที่ 58 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA083A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 1

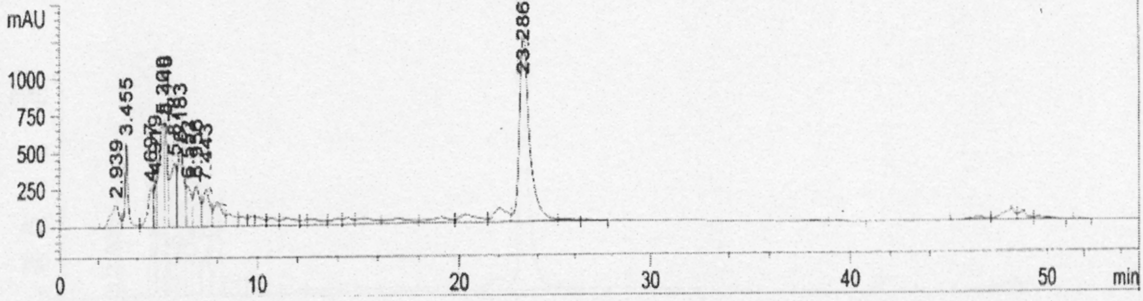
Figure 58. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA083A, chromatograms of group 1.



ภาพที่ 59 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA083A

Figure 59. Diode array spectrum of crude extract CNA083A.

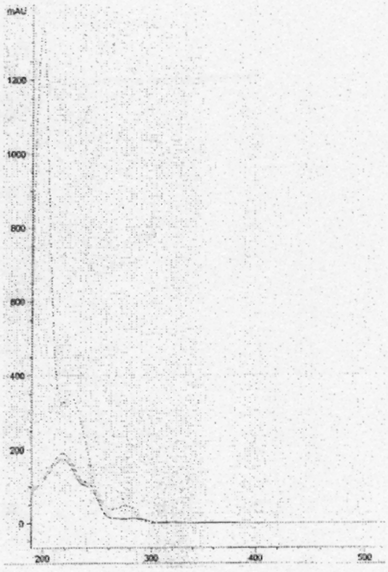
A



ภาพที่ 60 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA077A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2

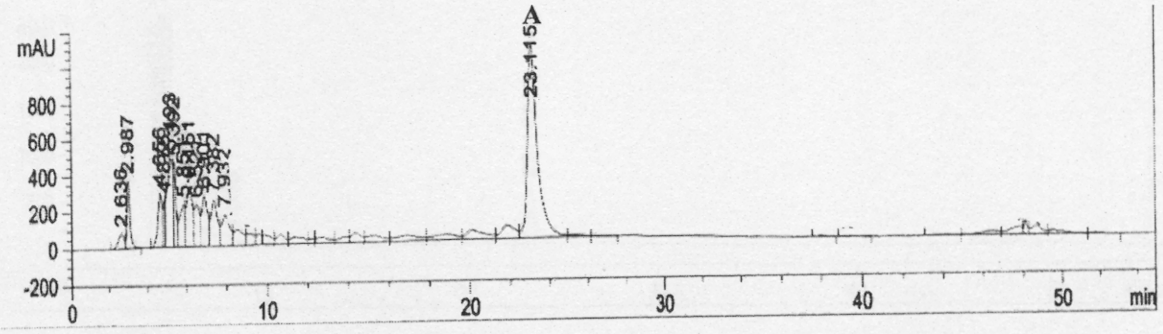
Figure 60. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA077A, chromatograms of group 2.

A



ภาพที่ 61 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA077A

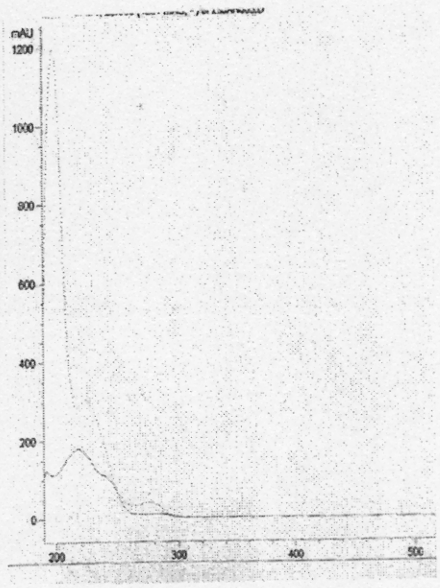
Figure 61. Diode array spectrum of crude extract CNA077A.



ภาพที่ 62 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA078A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2

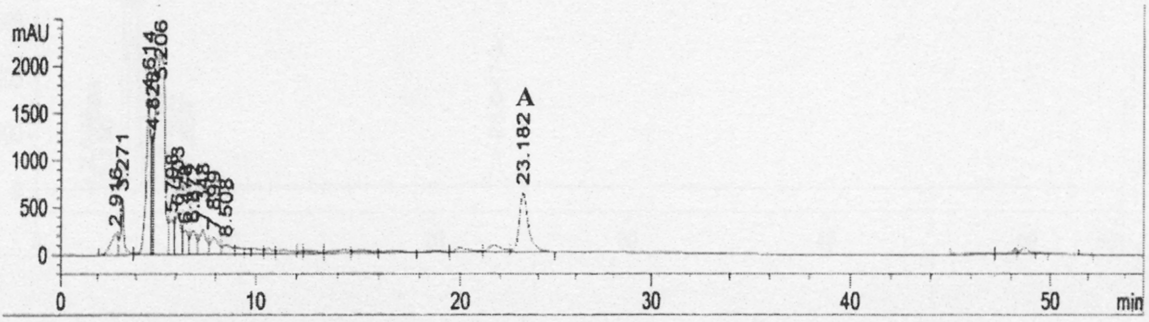
Figure 62. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA078A, chromatograms of group 2.

A



ภาพที่ 63 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA078A

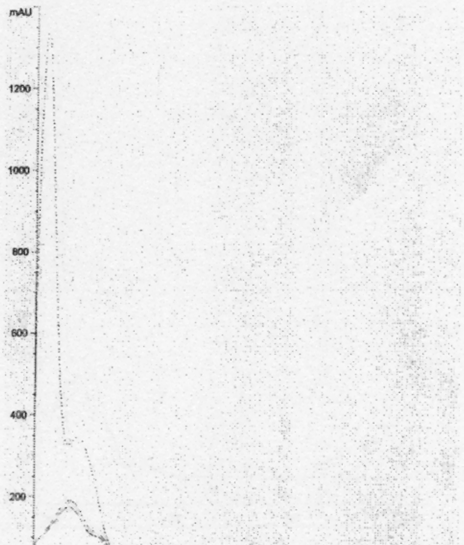
Figure 63. Diode array spectrum of crude extract CNA078A.



ภาพที่ 64 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA078B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2

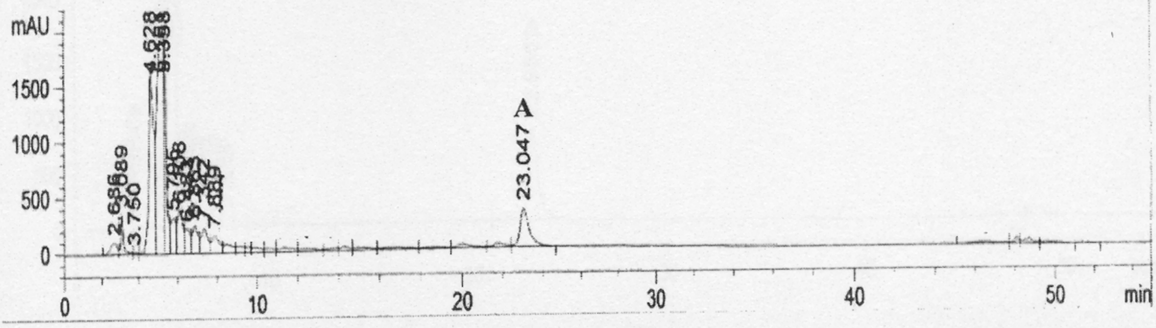
Figure 64. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA078B, chromatograms of group 2.

A



ภาพที่ 65 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA078B

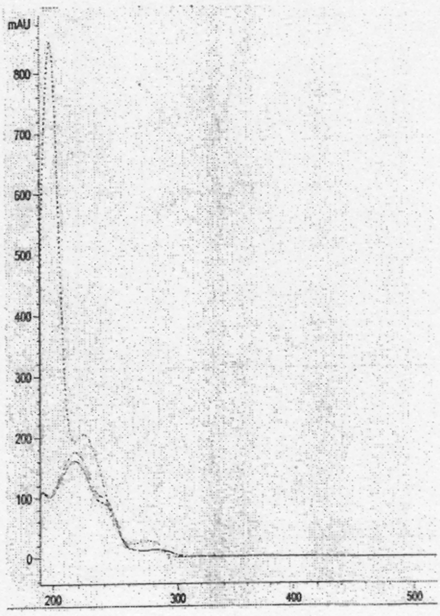
Figure 65. Diode array spectrum of crude extract CNA078B.



ภาพที่ 66 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA079C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2

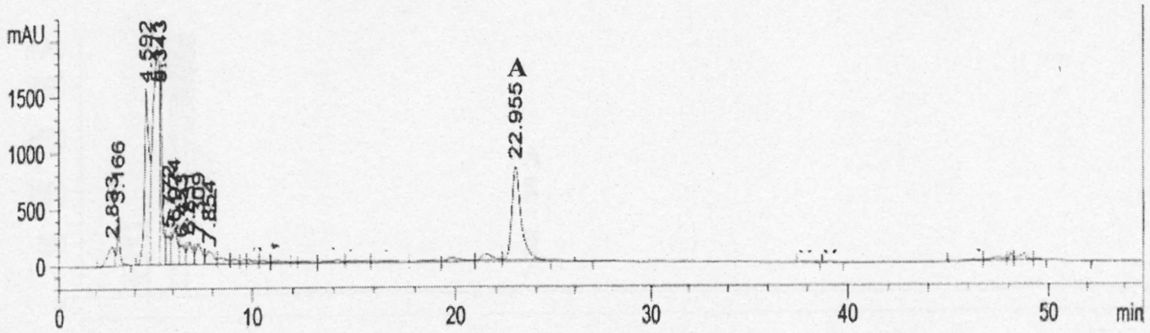
Figure 66. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA079C, chromatograms of group 2.

A



ภาพที่ 67 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA079C

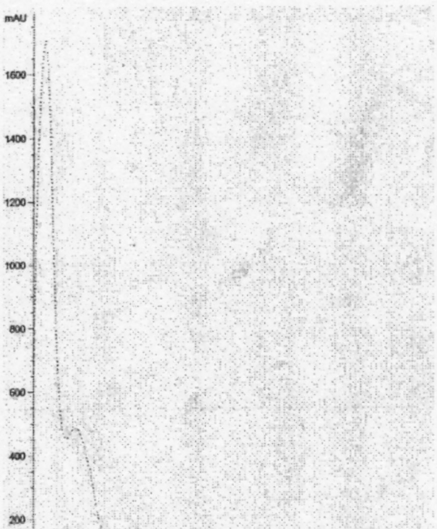
Figure 67. Diode array spectrum of crude extract CNA079C.



ภาพที่ 68 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA079D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2

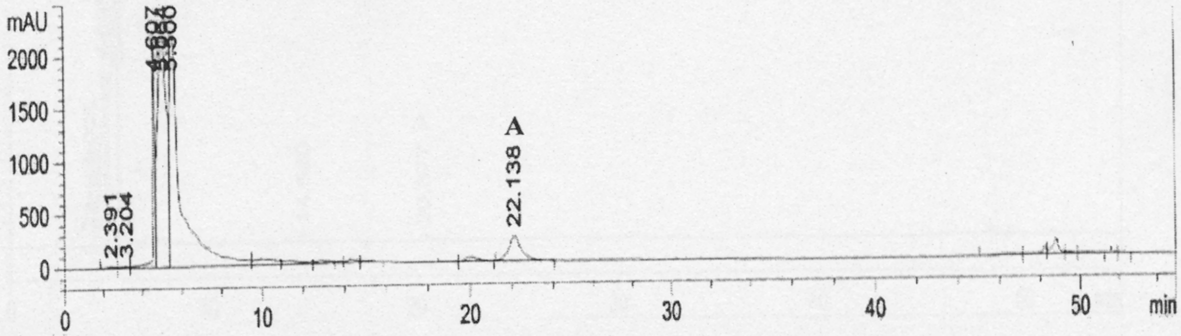
Figure 68. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA079D, chromatograms of group 2.

A



ภาพที่ 69 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA079D

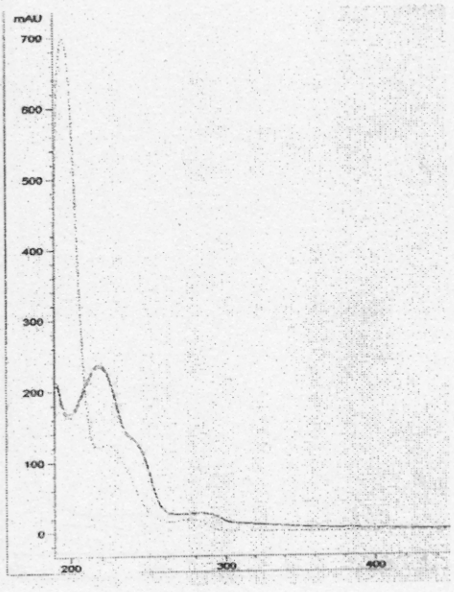
Figure 69. Diode array spectrum of crude extract CNA079D.



ภาพที่ 70 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA075B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 2

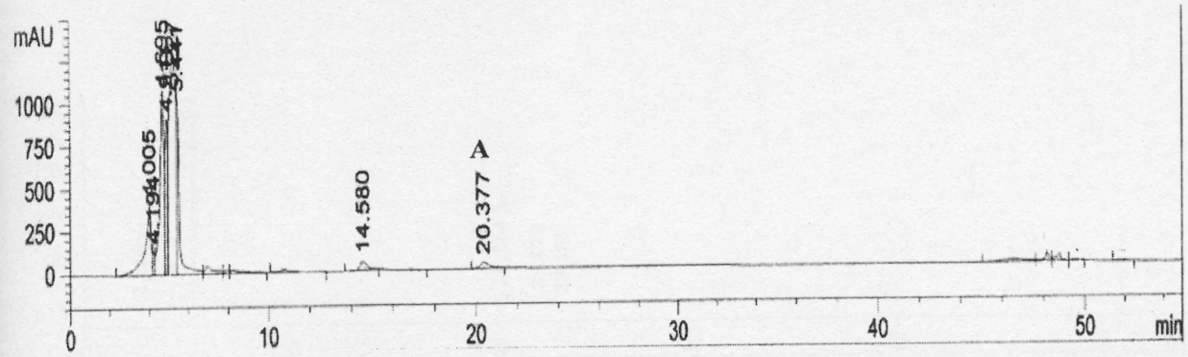
Figure 70. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA075B, chromatograms of group 2.

A



ภาพที่ 71 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA075B

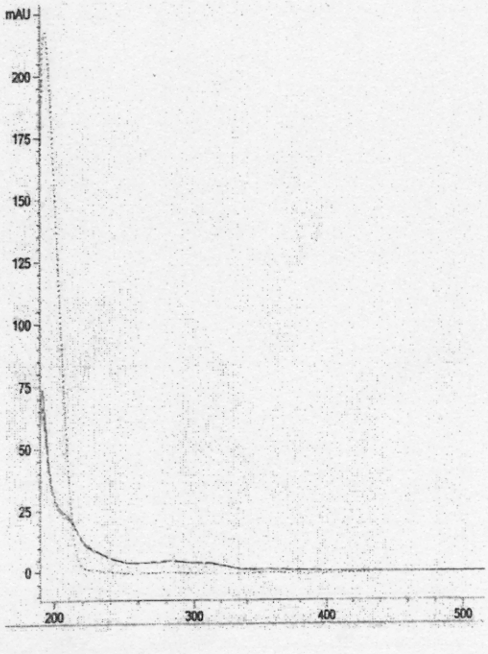
Figure 71. Diode array spectrum of crude extract CNA075B.



ภาพที่ 72 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA076B ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3

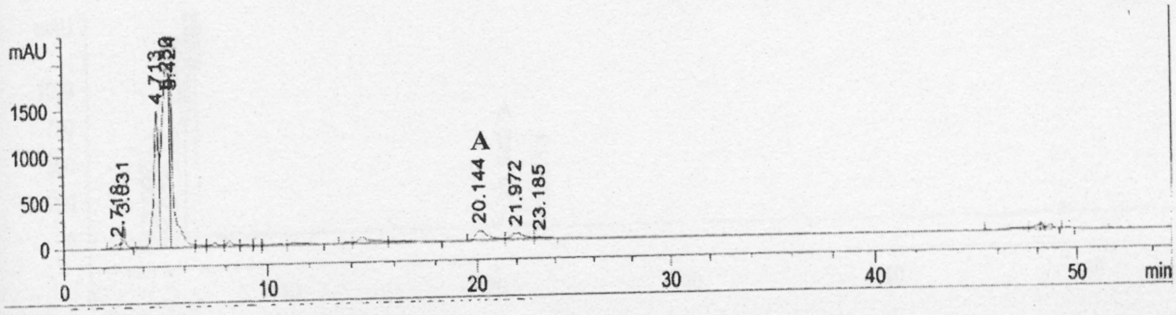
Figure 72. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA076B, chromatograms of group 3.

A



ภาพที่ 73 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA076B

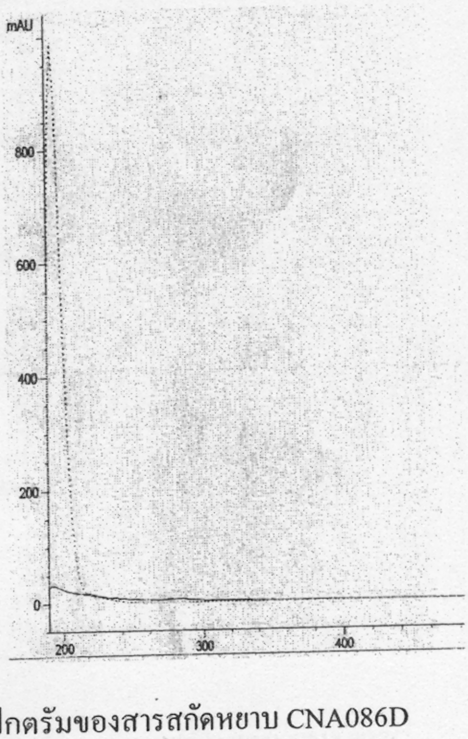
Figure 73. Diode array spectrum of crude extract CNA076B.



ภาพที่ 74 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA086D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3

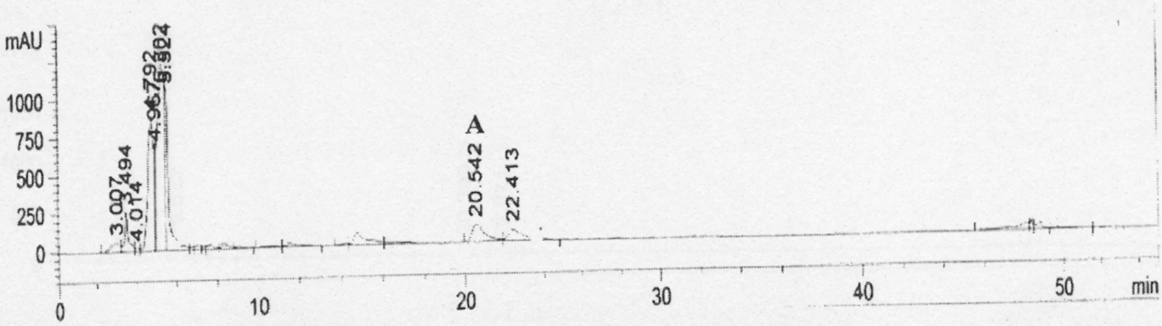
Figure 74. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA086D, chromatograms of group 3.

A



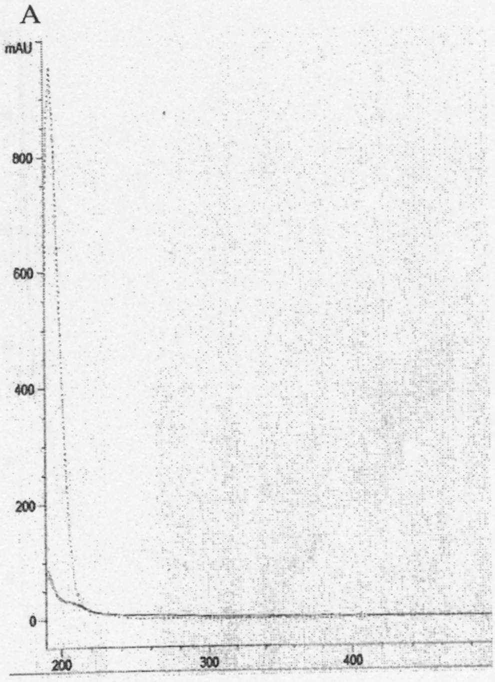
ภาพที่ 75 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA086D

Figure 75. Diode array spectrum of crude extract CNA086D.



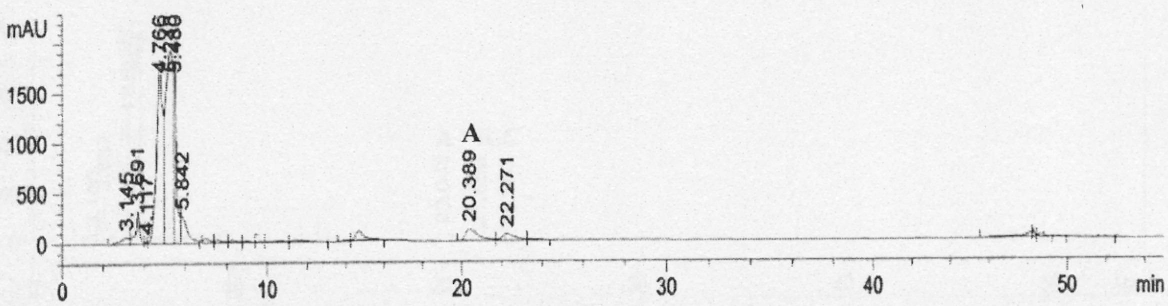
ภาพที่ 76 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA097C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3

Figure 76. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA097C, chromatograms of group 3.



ภาพที่ 77 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA097C

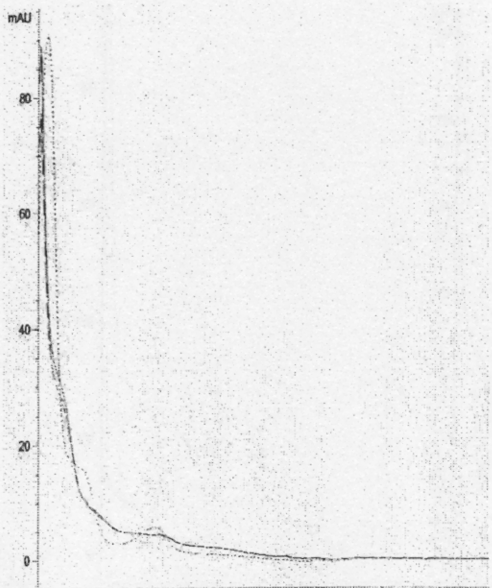
Figure 77. Diode array spectrum of crude extract CNA097C.



ภาพที่ 78 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA097D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 3

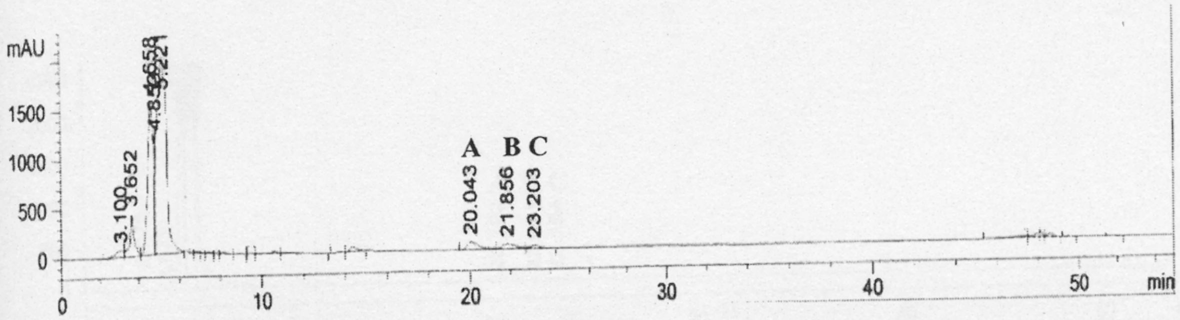
Figure 78. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA097D, chromatograms of group 3.

A



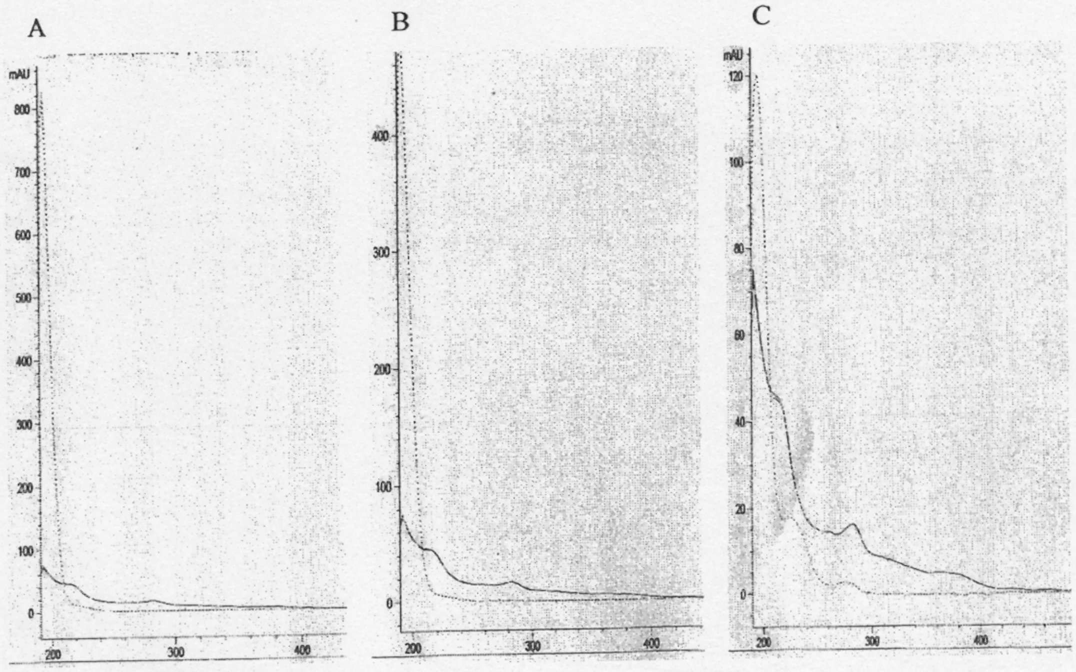
ภาพที่ 79 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA097D

Figure 79. Diode array spectrum of crude extract CNA097D.



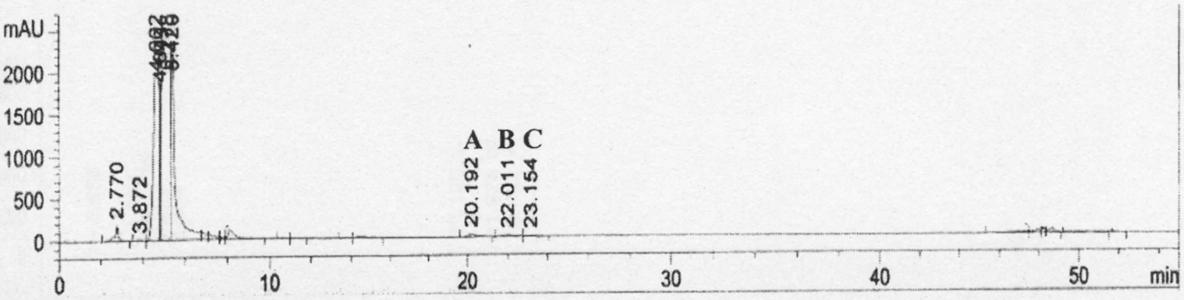
ภาพที่ 80 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA099C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 4

Figure 80. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA099C, chromatograms of group 4.



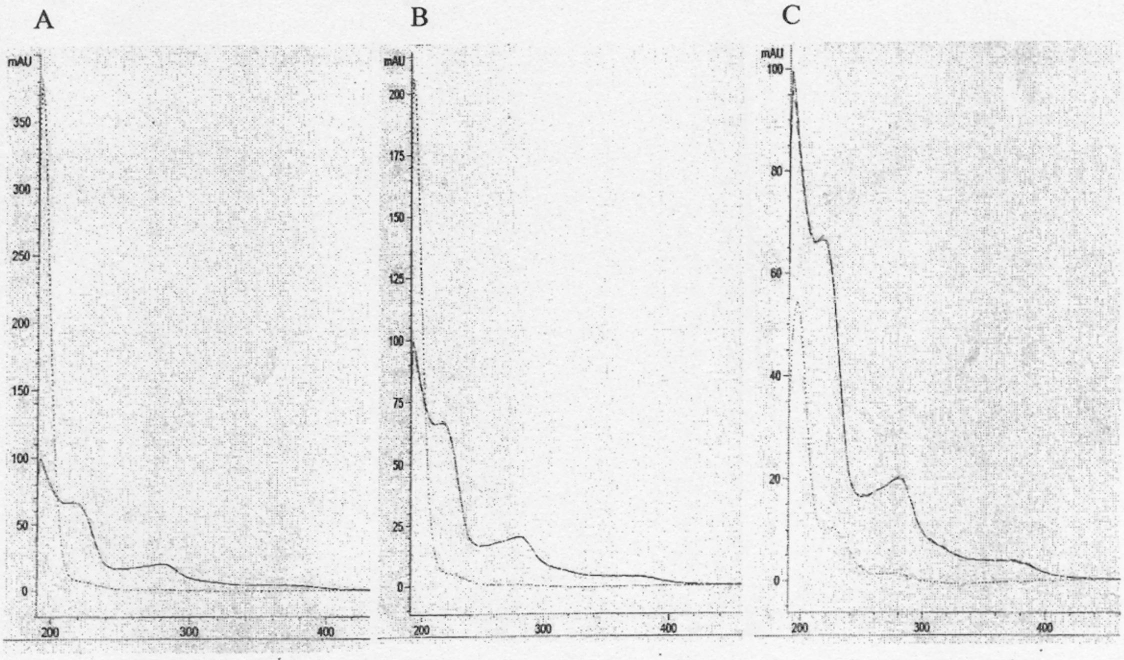
ภาพที่ 81 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA099C

Figure 81. Diode array spectrum of crude extract CNA099C.



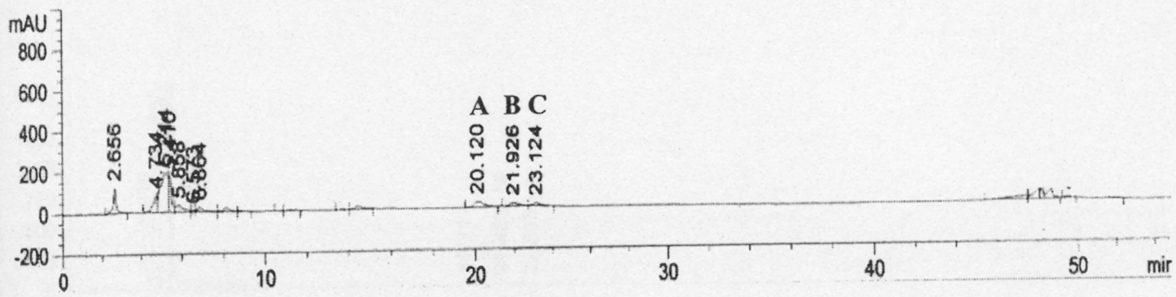
ภาพที่ 82 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA103D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 4

Figure 82. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA103D, chromatograms of group 4.



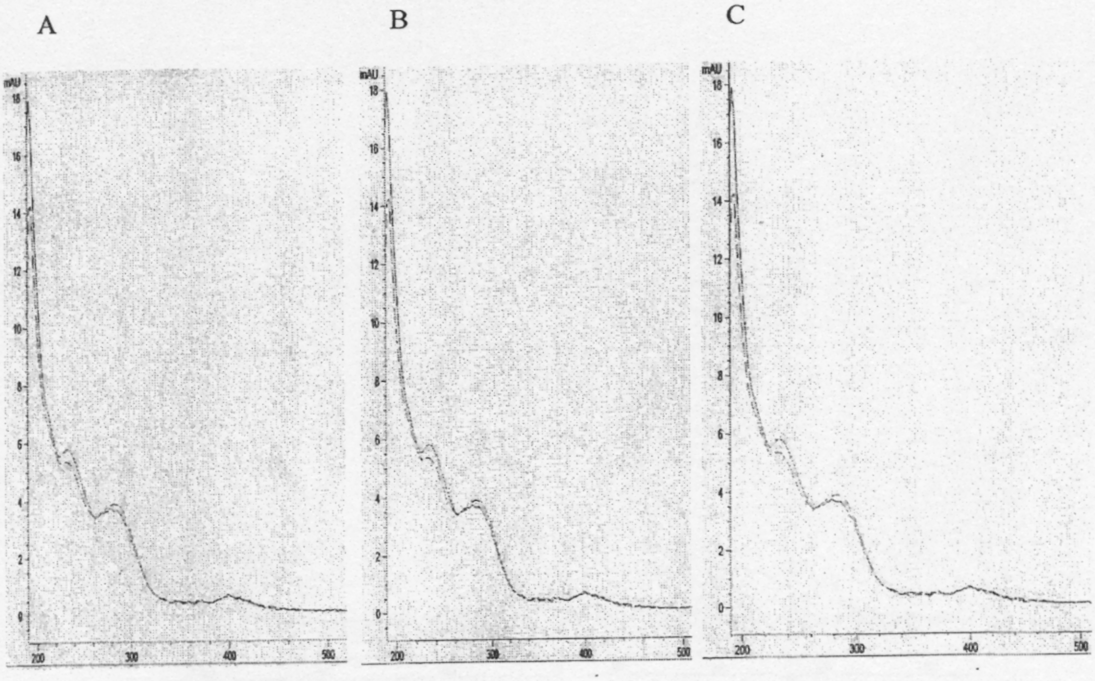
ภาพที่ 83 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA103D

Figure 83. Diode array spectrum of crude extract CNA103D.



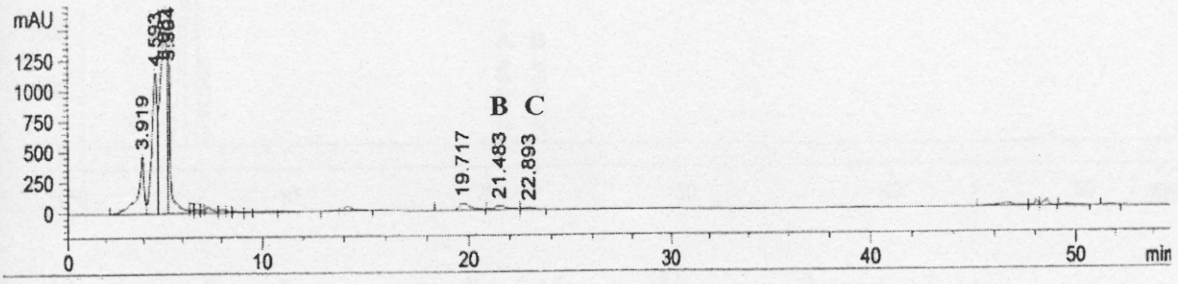
ภาพที่ 84 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA146A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 4

Figure 84. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA146A, chromatograms of group 4.



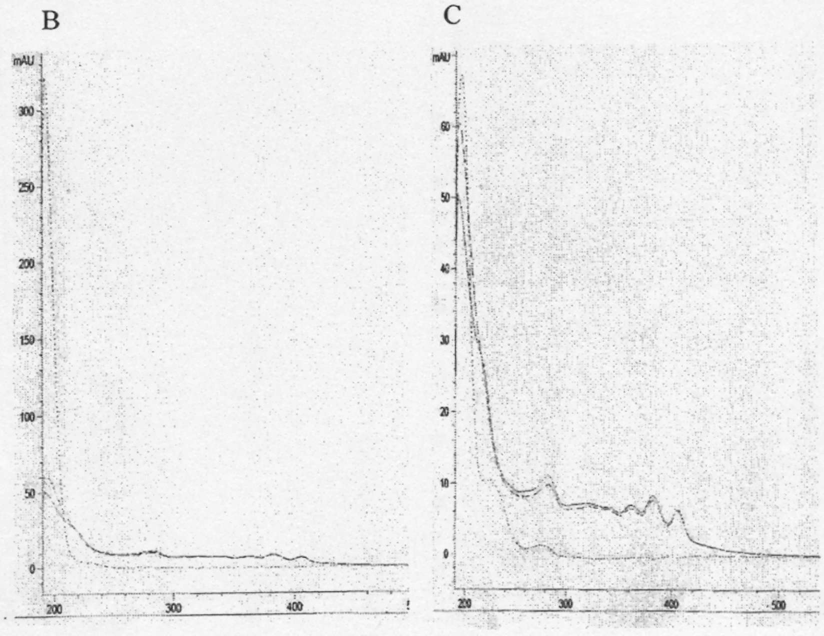
ภาพที่ 85 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA146A

Figure 85. Diode array spectrum of crude extract CNA146A.



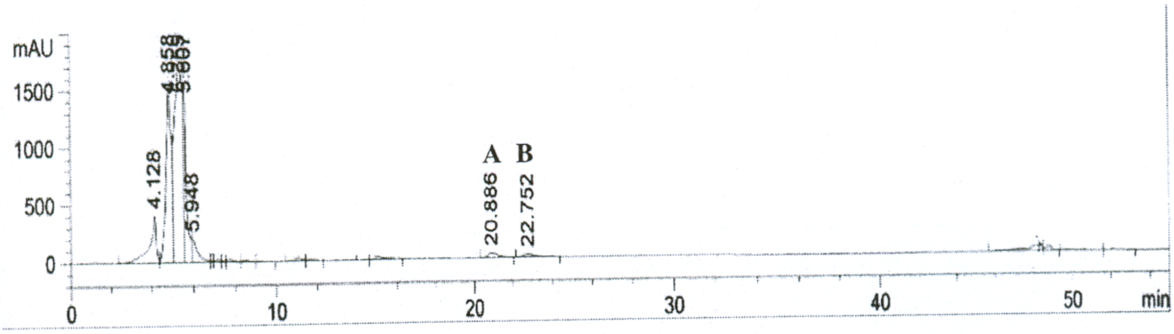
ภาพที่ 86 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA093C ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 5

Figure 86. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA093C, chromatograms of group 5.



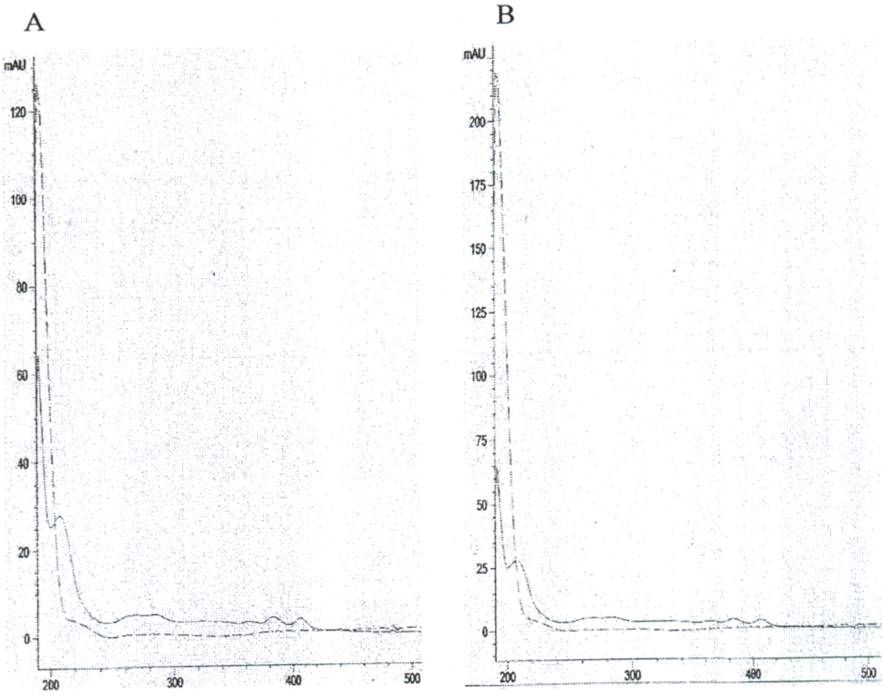
ภาพที่ 87 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA093C

Figure 87. Diode array spectrum of crude extract CNA093C.



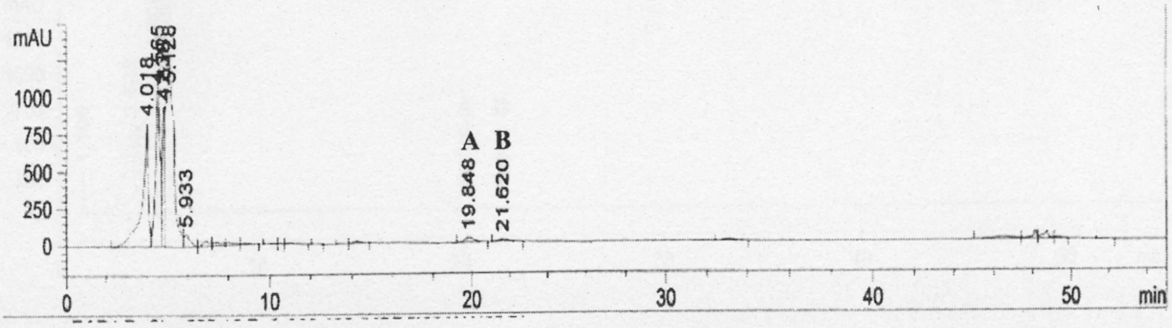
ภาพที่ 88 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA093D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 5

Figure 88. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA093D, chromatograms of group 5.



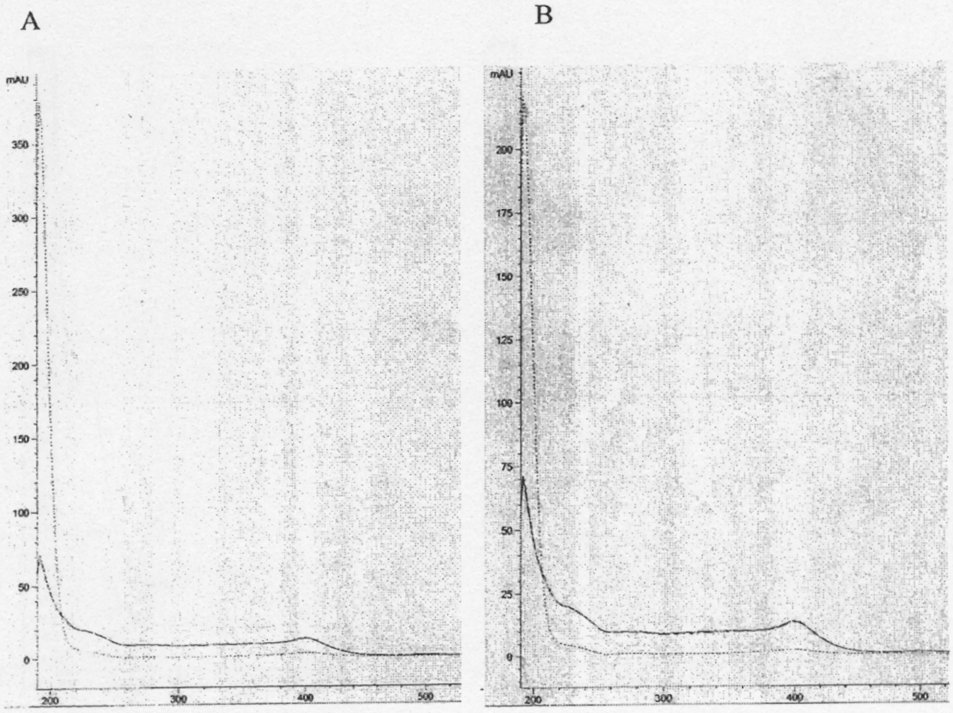
ภาพที่ 89 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA093D

Figure 89. Diode array spectrum of crude extract CNA093D.



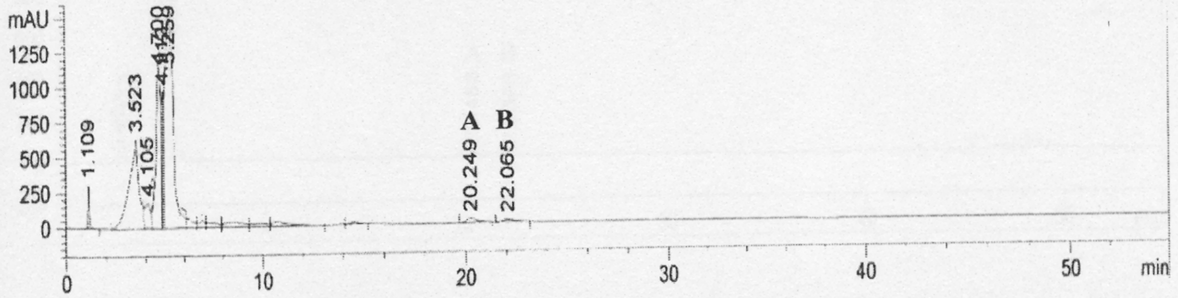
ภาพที่ 90 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA080A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 6

Figure 90. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA080A, chromatograms of group 6.



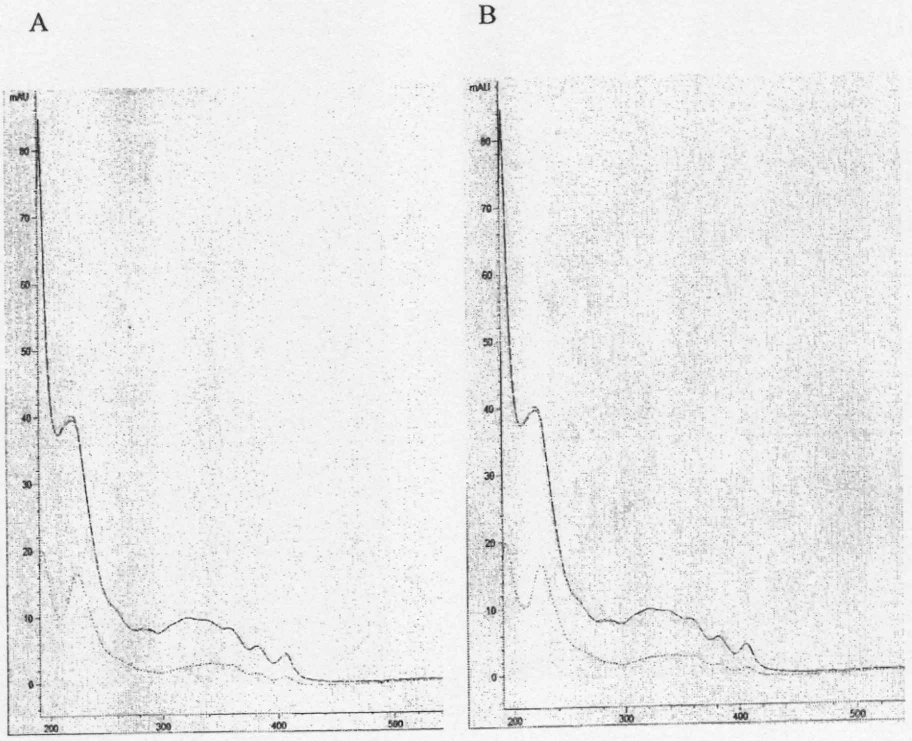
ภาพที่ 91 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA080A

Figure 91. Diode array spectrum of crude extract CNA080A.



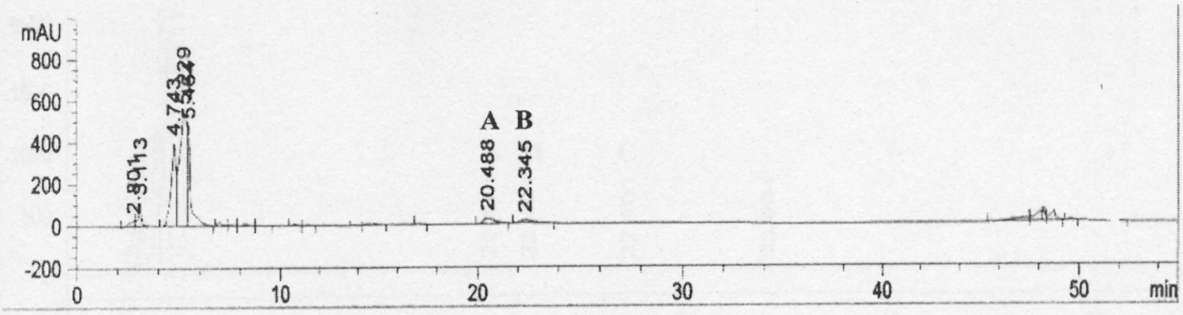
ภาพที่ 92 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA069Bความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 7

Figure 92. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA096B, chromatograms of group 7.



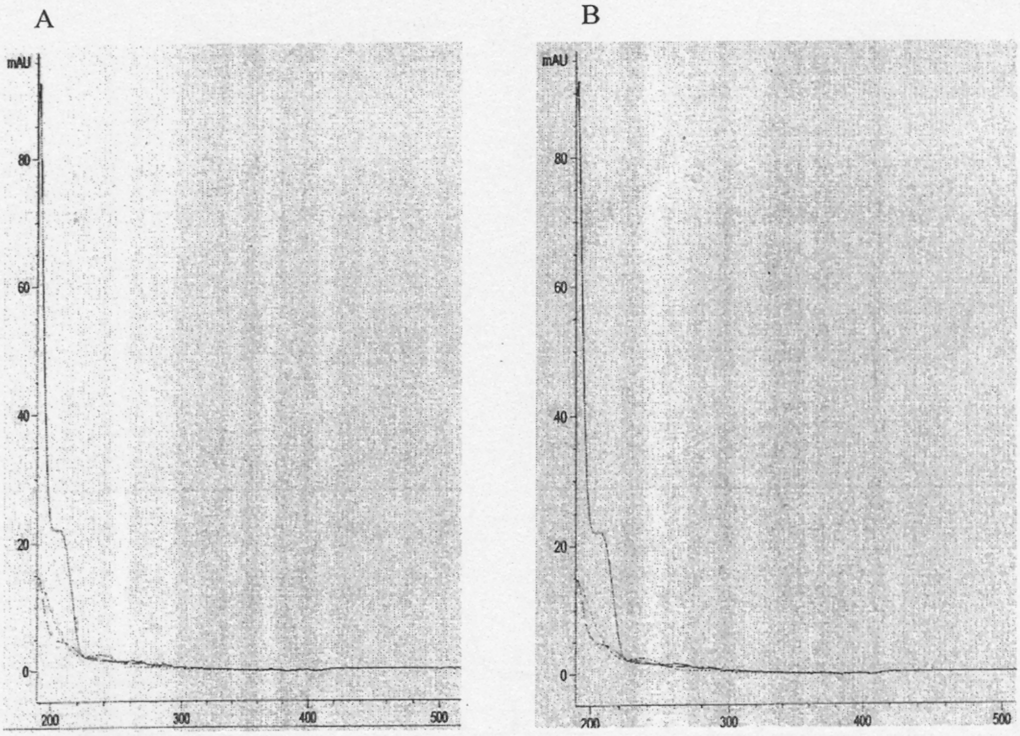
ภาพที่ 93 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA069B

Figure 93. Diode array spectrum of crude extract CNA069B.



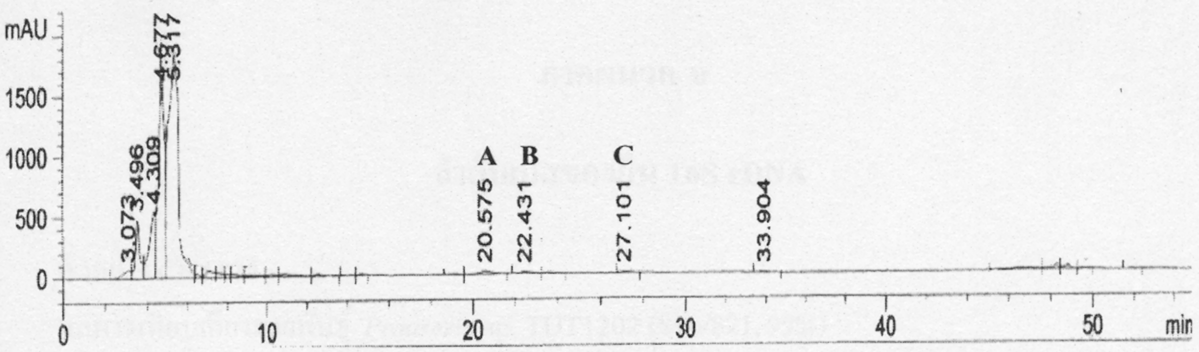
ภาพที่ 94 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA099D ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 8

Figure 94. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA099D, chromatograms of group 8.



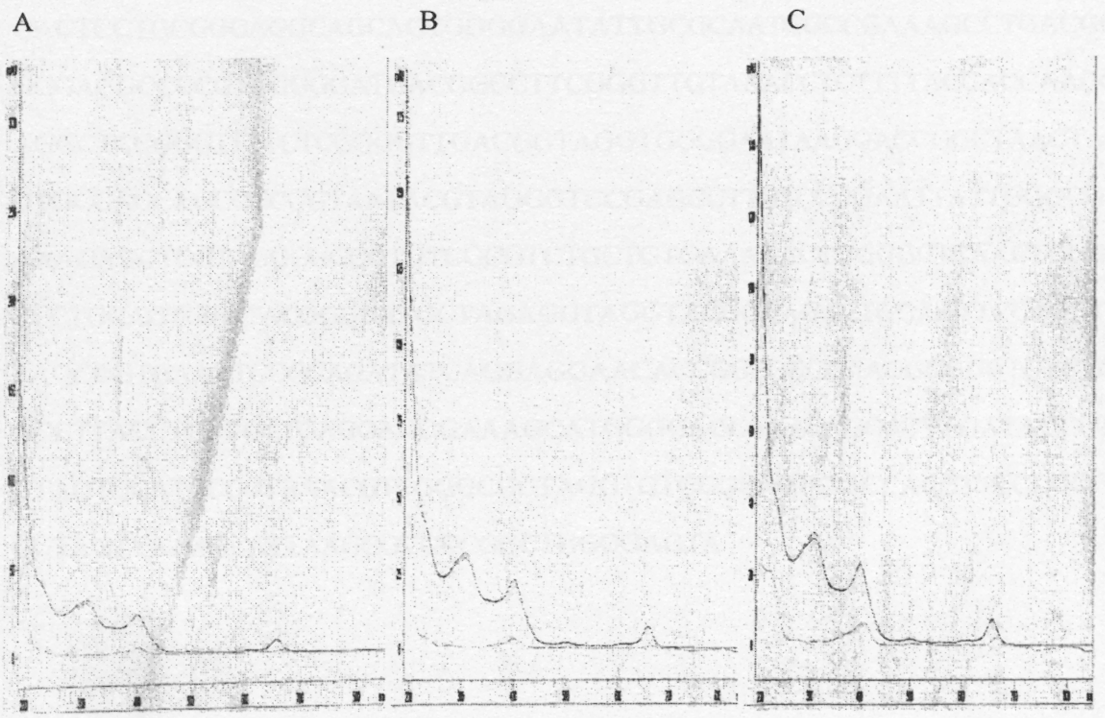
ภาพที่ 95 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA099D

Figure 95. Diode array spectrum of crude extract CNA099D.



ภาพที่ 96 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบ CNA0100A ความเข้มข้น 3 mg/ml เป็นสารกลุ่ม 9

Figure 96. Chromatogram of HPLC analysis at 210 nm of 3 mg/ml crude extract CNA100A, chromatograms of group 9.



ภาพที่ 97 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ CNA100A

Figure 97. Diode array spectrum of crude extract CNA100A

ภาคผนวก จ

ลำดับเบสของยีน 16S rDNA

ตัวอย่าง CNA035

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Prauseria* sp. TUT1202 (816/821, 99%)

GGAGGGGAGCTACCTGCAGTCGAGCGGTAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAAC
GGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCGGTGGAAACGCC
GTCTAATACCGGATACGACCTTCCGCCTCATGGTGGAGGGTGGAAAGTTTTTCGGTC
AGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGAT
TACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTGCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCA
GCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTACCACCAACGC
AGGCTCCGGGTTTTCTCGGGGTTGACGGTAGGTGGGGAATAAGGACCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGAGCTCGTAGGCGGCGTGTCGCGTCTGCTGTGAAAGACCGGGGCTTAACTCCGG
TTCTGCAGTGGATACGGGCATGCTAGAGGTAGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTCTCTGG
GCCTTACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACTTTTCCACGTTTCCGCGC
CGTAGCTAAAGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTA

ตัวอย่าง CNA060

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces flavofungini* (832/838, 99%)

GGCAGGGGGCTTACCTGCAGTCGACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCG
AACGGGTCACTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAAC
GGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGC
GGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGG
CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGA
TGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGG
GAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT
CGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGT
CGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA
AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACT
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCCCGTTGTCCGTGCCGCAGCT
AACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACCGCCGCAAGGCTAA

ตัวอย่าง CNA063

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces parvulus* (828/829, 99%)

CCCAAAANNNNGGCAGGGGCTACCTGCAGTCGAAGATGAACCACTTCGGTGGGGATT
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCC
TGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCTTCACGGGCATCTGTGAAGGTCGAAA
GCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCT
CACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
AAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCT
TTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCG
GGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTG
GGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCC
GTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAA
CTCA

ตัวอย่าง CNA065

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces champavatii* isolate XSD-106 (843/845, 99%)

GGGGATGCGGGGCTTACCATGCAAGTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCT
GGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGC
TCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCA
CCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAA
AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
AGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
CTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGG
CCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTANACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGT
GCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACT
CNAAG

ตัวอย่าง CNA071

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces flavofungini* (833/840, 99%)

CCCAGGCGGGGTCTACACATGCANTCGAACGATGAACCGCTTTCGGGCGGGGATTAG
TGGCGAACGGGTCAGTACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGG
AAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTC
CGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACC
AAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAG
CCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAG
CAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
AGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTG
CAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCG
GTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCG
ATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTANACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCC
GCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGNCAAGCTAAAACTCAA

ตัวอย่าง CNA076

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. 6G49 (834/838, 99%)

GGGGTGGGGCTACCTGCAGTCGAAGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAAC
GGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGG
GTCTAATACCGGATACTGATCCTCGCAGGCATCTGCGAGGTTCGAAAGCTCCGGCGGT
GCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGA
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGC
AGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAA
GAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
AGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCG
ATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGA
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTANACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAA
CGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAANACTCAA

ตัวอย่าง CNA083

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces cacaoi* subsp. (836/838, 99%)

AAAGAGGCGCGGTCTAACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCT
GGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAG
CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCT
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
AGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGAGCTCGTAGGCGGCCTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
CTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGG
CCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTANACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCCACGTCGTCCGTG
CCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTC
A

ตัวอย่าง CNA086

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. HBUM79010 (845/852, 99%)

GGTGATGCGCGGCTTACACATGCAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCT
GGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAG
CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCT
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
AGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGAGCTCGTAGGCGGCCTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
CTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGG
CCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCCACGTCGTCCGTG
CCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGNCAGGCTAANACTC
A

ตัวอย่าง CNA088

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces cacaoi* subsp. (840/844, 99%)

จำนวนเบสของลำดับนิวคลีโอไทด์ 853 bp

GGCGCGGCGGAGCTTAACATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCT
GGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAG
CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCT
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
AGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGAGCTCGTAGGCGGCCTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
CTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGG
CCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCCACGTCGTCCGTG
CCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGNGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTC

ตัวอย่าง CNA091

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. HBUM79010 (840/844, 99%)

GGAGATGGGCGGCTTACCATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCT
GGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAG
CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCT
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
AGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGAGCTCGTAGGCGGCCTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
CTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGG
CCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTANACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCCACGTCGTCCGTG
CCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGNGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTC
AA

ตัวอย่าง CNA098

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. HBUM79010 (844/849, 99%)

CCGATGCGCGGCTTACCATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAG

TGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTG

GAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGC

TCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTA

CCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAG

ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA

GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCA

GCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTG

CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA

GAGCTCGTAGGCGGCCTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTC

TGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAG

CGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC

GATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT

AGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCCACGTCGTCCGTGCC

GCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGNCAGGCTAAAACTCA

ตัวอย่าง CNA099

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. HBUM79010 (831/835, 99%)

AAAGATGGAGGGTAACGTGCAGTGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTAGTGG
CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAA
ACGGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCC
GGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCA
AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC
TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGC
AGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGA
GCTCGTAGGCGGCCTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTG
CATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCG
GTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCG
ATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTANACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCCACGTCGTCCGTGCCG
CAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGNGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAA

ตัวอย่าง CNA100

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. HBUM79010 (839/846, 99%)

GGCGATGCGGAGCTTACCATGCAAGTCGAACGATGAACCGGTTTCGGCCGGGGATTA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCT
GGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGGCCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAG
CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCT
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC
AGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
AGAGCTCGTAGGCGGCCTGTCGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
CTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGG
CCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTANACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGGCATTCCACGTCGTCCGTG
CCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCCGCAGGCTAAAACTCA
AAG

ตัวอย่าง CNA102

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. A00108 (835/837, 99%)

GGTGAGCGCGCTACCTGCAGTCGAAGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGG
GGTCTAATACCGGATATTGACCTTCACGGGCATCTGTGAGGTTCGAAAGCTCCGGCGG
TGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATG
CAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA
AGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCG
TAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCG
ATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGA
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAA
CGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAA

ตัวอย่าง CNA104

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. A00108 (833/838, 99%)

AAGATGGGGCTACCTGCAGTCGAAGATGACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACG
GGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGG
TCTAATACCGGATATTGACCTTCACGGGCATCTGTGAGGTTCGAAAGCTCCGGCGGTG
CAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGAC
GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
GCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAG
AAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA
GGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGAT
ACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG
CGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACG
CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TANACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACG
CATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAANACTCAAAG

ตัวอย่าง CNA112

ผลการเทียบเคียงสายพันธุ์ *Streptomyces fradiae* strain A160 (829/821, 99%)

AAGCGCGGGCTAACTGCAGTCAACGATGAACACCTTCGGGTGGGGATTAGTGGCGAA
CGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGG
GGTCTAATACCGGATACTGACCTGCCAAGGCATCTTGGCGGGTCGAAAGCTCCGGCG
GTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGG
AAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTC
GATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA
ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTG
ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT
AACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCA

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายธีรวัฒน์ อ่อนลมูล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4882059

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

On-Lamoon, T., Maneerat, S. and Kanjana-Opas, A. 2007. Screening for Antimicrobial Activities of Marine Derived Actinomycetes and their Identification by 16S rDNA Sequencing Analysis. TSB Aunnal Meeting: The 19th Aunnal Meeting of the Thai Society for Biotechnology; Biotechnology for Gross National Happiness on Technology, Thammasat University, Pathumthani, Thailand P-058 (Poster presentation)