

**FTIR SPECTRA OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*  
AND SPECTRAL CHANGES OF *PSEUDOMONAS*  
*AERUGINOSA* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**SURIYAPHONGSE KULKERATIYUT**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MEDICAL TECHNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2004**

**ISBN 974-04-5586-7  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

เอฟทีไออาร์สเปกตรัมของคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนส์ และการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมของซูโดโมนาส โดโมเนส แอรูจินา และสแตฟีโลคอกคัส ออเรียส (FT-IR SPECTRA OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* AND SPECTRAL CHANGES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*)

สุริยพงศ์ กุลกิริยุด 4236019 MTMT/D

ปร.ด. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ปิยพร ฌ นคร, Ph.D. (Physical Chemistry), วีระพงษ์ ปรัชญาสิทธิกุล, Ph.D. (Molecular Biology), โสภณ เรืองสำราญ, Ph.D. (Organic Chemistry), ศรีสุรางค์ ตันติมาวานิช, Ph.D. (Microbiology)

#### บทคัดย่อ

สภาวะในการเพาะเชื้อและวิธีการเตรียมสิ่งตัวอย่างเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่ทำให้ได้อินฟราเรดสเปกตรัมที่มีคุณภาพและมีความคงที่สูง ปัจจัยหลักที่สำคัญต่อคุณภาพของสเปกตรัม 2 ปัจจัยได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และกระบวนการเตรียมฟิล์ม การรบกวนจากนิคมข้างเคียงเกิดจากจุลชีพปล่อยหรือใช้สารรอบ ๆ นิคม การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอินฟราเรดสเปกตรัมของจุลชีพที่ถูกรบกวนโดยนิคมข้างเคียงมีความแตกต่างกันในเกือบทุก ๆ ช่วงของสเปกตรัมที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 และการทดลองนี้ได้วัดสัมประสิทธิ์การแพร่ของน้ำและกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อโดย pulse field gradient–nuclear magnetic resonance (PFG-NMR) โดยพบว่าสารเหล่านี้แพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้รวดเร็วมาก ส่วนกระบวนการเตรียมฟิล์มตัวอย่างโดยการอบที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงให้ความสม่ำเสมอสูงกว่าเมื่อเตรียมโดยการอบภายใต้สูญญากาศที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 โดยเฉพาะในจุลชีพแขวนลอยที่เกิดฟองอากาศขนาดเล็กผุดขึ้นได้ง่ายในระหว่างการอบภายใต้สูญญากาศ ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของฟิล์มที่ได้ แต่สเปกตรัมที่ได้จากการเตรียมฟิล์ม 2 วิธีนี้มีความแตกต่างกันเล็กน้อยเนื่องจากการอัดตัวของสายกรดไขมันและปริมาณของหมู่คาร์บอนิลในโปรตีนที่เกิดพันธะไฮโดรเจนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนและส่งผลต่ออินฟราเรดสเปกตรัม การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุลขนาดใหญ่อันเนื่องมาจากจำนวนของพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไป การเคลื่อนตำแหน่งของพีกที่เกิดจากการสัมผัสความร้อนนั้นเกิดอย่างคงที่ และตำแหน่งของพีกเคลื่อนไปน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับของสเปกตรัมที่ได้จากจุลชีพต่างสายพันธุ์กัน และผลการทดสอบระบุชนิดของจุลชีพโดยตัวอย่างที่เตรียมจากทั้ง 2 วิธีนี้ยังให้ผลเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกันอย่างถูกต้อง การวิจัยนี้แนะนำให้เก็บเชื้อแบคทีเรียจากนิคมที่เจริญห่างจากนิคมอื่น ๆ และลดเวลาการเลี้ยงเชื้อลงโดยกำหนดเวลาเก็บจุลชีพเมื่อได้ปริมาณเพียงพอต่อความต้องการเพื่อลดการรบกวนจากการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและควบคุมทุกขั้นตอนโดยปฏิบัติตามวิธีที่ได้กำหนดไว้อย่างเข้มงวด โดยเฉพาะการเพาะเชื้อและเตรียมตัวอย่าง

การศึกษากำหนดคริปโตคอกคัส นีโอฟอร์แมนส์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงพีโนไทป์ไปเล็กน้อยโดย FT-IR ได้ผลสอดคล้องกับข้อมูลจาก karyotype และ รูปแบบของค่า MIC ของยาด้านเชื้อรา

FT-IR SPECTRA OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* AND SPECTRAL CHANGES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

SURIYAPHONGSE KULKERATIYUT 4236019 MTMT/D

Ph.D.(MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: BYAPORN NA NAGARA, Ph.D.(PHYSICAL CHEMISTRY), VIRAPONG PRACHAYASITTIKUL, Ph.D.(MOLECULAR BIOLOGY), SOPHON ROEUNGSUMRAN, Ph.D.(ORGANIC CHEMISTRY), SRISURANG TANTIMAVANICH, Ph.D.(MICROBIOLOGY).

ABSTRACT

Culture condition and sample technique of sample preparations are the two important factors for high quality and good reproducibility of the infrared spectra. Two major factors which affect spectra are media components and film preparation. The influence of neighbor colonies occurs from the release or utilization of substances around their colonies. Test results showed the difference in infrared spectrum caused by influence of neighbor colonies in all spectral windows at a 95 % confidence limit. Measuring the diffusion coefficient of water and glucose in culture medium by pulse field gradient-nuclear magnetic resonance (PFG-NMR) indicated the rapid movement of small molecules under cultivative agar medium. Reproducibility of Bacterial film that derived from drying at 42 °C for 1 h generated a more consistency IR spectra than that prepared by vacuum at a 95 % confidence limit. This was especially true in suspension of microorganisms that can form small bubbles during application of the vacuum, which affects the quality of the film. The spectra were significantly different from films dried by vacuum due to the change of fatty acid chain packing and the amount of H-bonded carbonyl in protein which affected protein secondary structure. Configuration changes in macromolecules were also studied by determines the change of the number of H-bonded in protein. Band shift from heating is consistent but of a small extent compared to spectra difference of different strains, hence, the identification of microorganism by IR is possible. This study suggests harvesting bacteria from colonies grown far from other colonies and decreasing the cultivation time to minimize these effects. Control of all conditions during cultivation and sample preparation should always be carefully monitored.

The classification of closely relate *Cryptococcus neoformans* using FT-IR spectroscopy agreed with the karyotyping and MIC of anti-fungal patterns.

KEY WORDS : FT-IR / BACTERIA / INFLUENCE / SAMPLE PREPARATION / BOUND CARBONYL