

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: Penggunaan asid lemak dan lipid oleh mycobacteriumIjazah: Sarjana Muda SainsSESI PENGAJIAN: 2001Saya LIM WEI CHOO

(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor-Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh

Amandali
(TANDATANGAN PENULIS)

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

Alamat Tetap: 530, Tmn Clonlee,
73000 Tampin,

Negeri Sembilan.

Nama Penyelia

Tarikh: 13/3/2004

Tarikh:

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu diklasifikasikan sebagai SULIT dan TERHAD.

@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).





HADIAH

PENGGUNAAN ASID LEMAK DAN LIPID OLEH *MYCOBACTERIUM*

LIM WEI CHOO

TESIS INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN DARIPADA
SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS DENGAN
KEPUJIAN

PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

MAC 2004

PERPUSTAKAAN UMS



1400005526

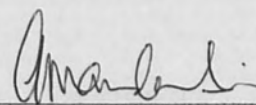


UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

13 Februari 2004



LIM WEI CHOO

HS 2001-1274

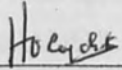


PERAKUAN PEMERIKSA

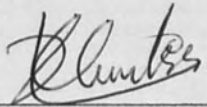
DIPERAKUKAN OLEH

Tandatangan

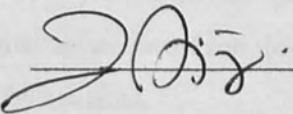
1. PENYELIA
(PROF. DR. HO COY CHOKE)



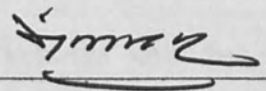
2. PEMERIKSA 1
(DR. LEE PING CHIN)



3. PEMERIKSA 2
(DR. ZALEHA ABDUL AZIZ)



4. DEKAN SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
(PROF. MADYA DR. AMRAN AHMED)





PENGHARGAAN

Saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Sekolah Sains dan Teknologi (SST), Universiti Malaysia Sabah kerana memberi kesempatan kepada saya untuk menjalankan tesis ini.

Saya juga ingin mengambil kesempatan ini untuk merakamkan penghargaan saya kepada penyelia projek saya, Professor Dr. Ho Coy Choke di atas segala tunjuk ajar dan bimbingan beliau sepanjang tempoh kajian ini dijalankan. Penghargaan ini juga tidak lupa dirakamkan kepada Prof. Dr. Perumal Ramasamy, Dr. Jualang @ Azlan Abdullah Bin Gansau, Dr. Lee Ping Chin dan Dr. Zaleha Abdul Aziz atas ilmu pengetahuan dan tunjuk ajar yang dicurahkan sepanjang tempoh pengajian saya di UMS.

Sekalung budi disampaikan kepada pelajar-pelajar pasca-siswazah Bioteknologi terutamanya Hew Chaw Sen, Puah Seok Hwa dan Foo Sek Hen atas nasihat, tunjuk ajar dan bantuan yang diberikan. Tidak lupa juga teman setia terutamanya Teo Gim Mui Cindy yang menghulurkan bantuan sepanjang tempoh kajian ini dilaksanakan.

Akhir sekali, jutaan terima kasih diucapkan kepada ahli keluarga saya diatas segala bimbingan, sokongan dan galakan yang dihulurkan. Segalanya amat dihargai.

LIM WEI CHOO

ABSTRAK

Dalam kajian ini, jenis lipid dan asid lemak yang berlainan telah digunakan untuk bertindak sebagai sumber karbon yang utama untuk pertumbuhan *M.smegmatis* jenis liar (mc² 155) H8000 dan juga *M.smegmatis* jenis transforman Δicl dengan menggantikan sumber karbon yang lain, contohnya glukosa. Di samping itu, lipid dan asid lemak ini telah diuji kemampuannya untuk menggantikan glukosa dan asetat sebagai sumber karbon yang lain. Kajian ini telah dilaksanakan dengan menggunakan kaedah yang paling asas dimana kelalang yang mengandungi sumber karbon yang berlainan telah diinkubasikan di dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama tiga hari tanpa penggocangan. Keputusan yang diperolehi telah menunjukkan bahawa media karbon jenis NBD Palm Kernel Olein memberi pertumbuhan sel yang baik dan seterusnya menghasilkan koloni yang banyak kepada *M.smegmatis* jenis liar (mc² 155) H8000 dan juga *M.smegmatis* jenis transforman Δicl . Media karbon jenis NBD Palm Olein hanya berjaya dibuktikan sebagai pengganti 2% glukosa kepada *M.smegmatis* jenis liar (mc² 155) H8000. Asid olik dan asid linolik, bagaimanapun telah diuji kemampuan masing-masing dalam bertindak sebagai pengganti sumber glukosa dan keputusan yang didapati menunjukkan kedua-dua asid lemak tidak tepu ini tidak membantu pertumbuhan sel mikobakteria. Hanya media NBD Palm Kernel Olein dan NBD Palm Olein telah berjaya dibuktikan sebagai pengganti sumber karbon kepada 2 % glukosa yang menggalakkan pertumbuhan koloni baru mikobakteri. Sebagai kesimpulannya, mikobakteria semasa dalam keadaan persistensi menggunakan lipid sebagai sumber karbon yang utama jika dibandingkan dengan asid olik dan asid linolik dalam kajian ini dengan organisma sasaran ialah *M.smegmatis* jenis liar (mc² 155) H8000 dan juga *M.smegmatis* jenis transforman Δicl .



ABSTRACT

Throughout this research, different types of lipids and fatty acids were used as the sole source of carbon for growth in *M.smegmatis* wild type (mc² 155) H8000 and *M.smegmatis* transformant type Δicl in order to replace other carbon sources such as glucose and acetate. In addition, the ability of lipids and fatty acids were tested as substitution for glucose and acetate to be certain on their ability to promote growth in mycobacterium. This research was carried out by applying the simplest method where mycobacterium cultures were supplied by either fatty acids or lipids and next, flasks containing those liquid seed cultures were incubated for three days at 37⁰C without shaking the flasks. Results obtained from the conducted research shows that media containing NBD Palm Kernel Olein does promote a significant growth and therefore producing many new cell colonies of wild type *M.smegmatis* (mc² 155) H8000. Oleic acid and linoleic acid were also tested in their abilities to substitute other carbon sources and the results shows that both of these unsaturated fatty acids were unable to promote cell growth in mycobacteria. This implies oleic acid and linoleic acid are not utilized by both strains of mycobacteria. Only NBD Palm Kernel Olein and NBD Palm Olein were proven as a suitable substitution at 2% glucose and they managed to promote cell growth. Hence multiplying cell density in mycobacteria. In conclusion, during latent persistent stage in mycobacterium, this bacteria makes a turning switch of utilising lipids, preferably NBD Palm Kernel Olein rather than fatty acids when other carbon sources are not available. All of the results obtained were tested on wild type *M.smegmatis* (mc² 155) H8000 and also *M.smegmatis* transformant Δicl



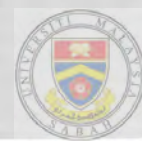
KANDUNGAN

	HALAMAN
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTO	xii
SENARAI SINGKATAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 PENGENALAN	1
1.2 OBJEKTIF	4
BAB 2 ULASAN LITERATUR	
2.1 Mikobakteria	5
2.1.1 Ekologi mikobakteria	7
2.1.2 Ciri-ciri mikobakteria	8
2.1.3 Mikobakteria Persekitaran (EDM)	10
2.1.4 Mikobakteria Patogenik	11
2.1.5 Shunt Glioksilat	12
2.2 Genus <i>Streptomyces</i>	15
2.2.1 Ekologi <i>Streptomyces</i>	17

2.2.2	Antibiotik <i>Streptomyces</i>	17
2.3	Lipid	19
2.3.1	Trigliserid dan lipid kompleks	20
2.3.2	Lipid sebagai nutrien mikroorganisma	20
2.4	Asid lemak	21
2.4.1	Asid lemak tepu	22
2.4.2	Asid lemak tumbuhan dan haiwan	23
2.4.3	Kesan sekatan asid lemak	24
2.4.4	Kesan bakteriostatik	25
2.4.5	Pengoksidaan asid lemak	26
2.4.6	Penggunaan asid lemak	27

BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH

3.1	Bahan-bahan	29
3.2	Teknik Pensterilan	30
3.2.1	Autoklaf	30
3.2.2	Pensterilan Haba	31
3.2.3	Penurasan	31
3.3	Penyediaan Larutan Stok Vitamin B	31
3.4	Penyediaan Oatmeal	32
3.5	Penulenan Koloni Aktinomiset Tunggal	33
3.6	Penyediaan Larutan Stok 20% Gliserol	34
3.7	Penghasilan Metabolit Sekunder	35
3.7.1	Penyediaan Medium	35
3.7.2	Fermentasi	35
3.8	Pewarnaan Gram	36
3.8.1	Penyediaan Reagen	36
	a. Reagen Pewarnaan Kristal Ungu	36
	b. Mordant	36
	c. Pelarut Penyahwarna	37
	d. Counterstain	37



3.8.2	Penyediaan Smear	37
3.8.3	Pewarnaan Gram	37
3.9	Pewarnaan Ziehl-Neelsen	38
3.9.1	Pewarna karbolfuchsin	38
3.9.2	Pelarut penyahwarna	38
3.9.3	Pembalasan-warna	38
3.10	Penyediaan Media Penyaringan : Medium Minimum M9 (Gubahan)	39
3.11	Penyaringan Perencat ICL	41
3.11.1	Penyediaan Media Pertumbuhan <i>M.smegmatis</i>	41
3.11.2	Penyediaan Cakera Kertas (Kertas Turas No. 3 Whatman)	41
3.11.3	Penyediaan Agar <i>M.smegmatis</i>	42
3.11.4	Perletakan Cakera Kertas Dan Inkubasi Piring Penyaringan	42
3.11.5	Catatan Keputusan Ujian Penyaringan	43

BAB 4 HASIL DAN KEPUTUSAN

4.1	Penulenan Aktinomiset	44
4.2	Penyaringan Metabolit Sekunder Dan Stok Gliserol	47
4.3	Keputusan proses penapaian <i>M.smegmatis</i> jenis liar dengan sumber karbon berlainan	48
4.4	Keputusan proses penapaian <i>M.smegmatis</i> jenis transforman <i>Δicl</i> dengan sumber karbon berlainan	49
4.5	Penyaringan Perencat ICL Terhadap Penggunaan Asid Lemak Dan Lipid	56

BAB 5 PERBINCANGAN

5.1	Penulenan Aktinomiset	54
5.2	Fermentasi Aerobik Dan Pengekstrakan Metabolit Sekunder	55



5.3	Penggunaan asid lemak dan lipid oleh mikobakteria	56
5.4	Penyaringan Perencat Berpotensi Terhadap Penggunaan Asid Lemak dan Lipid	59
5.5	Diameter saiz zon perencat berpotensi ICL terhadap penggunaan asid lemak dan lipid oleh mikobakteria	62
5.6	Pewarnaan Ziehl-Neelsen	64
BAB 6 KESIMPULAN		65
RUJUKAN		67



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Halaman
2.1	14
2.2	18
2.3	28
4.1	44
4.2	51

SENARAI RAJAH

No.Rajah		Halaman
2.1	Kitar glioksilat pada bacteria	13
2.2	Proses penceraian lemak	21
3.1	Corak coretan pada piring agar oatmeal	34



SENARAI FOTO

No. Foto	Halaman
4.1 Warna miselia aerial atas bagi strain H7944 MBA 94-2 pada agar oatmeal (3 minggu pertumbuhan)	45
4.2 Warnna miselia substrate bawah bagi strain H7944 MBA 94-2 pada agar oatmeal (3 minggu pertumbuhan)	45
4.3 Warna miselia aerial atas bagi strain H7372 c55 pada agar oatmeal (3 minggu pertumbuhan)	46
4.4 Warna miselia substrate bawah bagi strain H7372 c55 pada agar oatmeal (3 minggu pertumbuhan)	46
4.5 Aseton ekstrak yang disediakan	47
4.6 Keputusan piring <i>Mycobacterium Smegmatis</i> jenis liar dengan NBD Palm Kernel Olein sebagai sumber karbon.	52
4.7 Keputusan piring <i>M.smegmatis</i> dengan gen <i>icl</i> yang dikeluarkan dan ditransformasi dengan plasmid yang membawa gen <i>icl</i> daripada <i>M.tuberculosis</i> (ace 1023 + pJM074) H8012 dengan NBD Palm Kernel Olein sebagai sumber karbon.	52
4.8 Keputusan piring <i>M.smegmatis</i> dengan gen <i>icl</i> yang dikeluarkan dan ditransformasi dengan plasmid yang membawa gen <i>icl</i> daripada <i>M.tuberculosis</i> (ace 1023 + pJM074) H8012 dengan NBD Palm Olein sebagai sumber karbon.	53

SENARAI SINGKATAN

ATP	Adenosine triphosphate
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
DNA	Deoxyribonucleic acid
G + C	Guanine + cytosine
ICL	Isocitrat lyase
<i>Δicl</i>	Mutasi pada gen isositrat lyase
INH	Isoniazid
PZA	Pyrazinamide
RNA	Ribonucleic acid
r.p.m	Putaran per minit
TB	Tuberculosis
WHO	World Health Organization
%	Peratus
°C	Darjah selsius
g	Gram
mg	Miligram
L	Liter
mL	Mililiter
μL	Mikroliter
cm	Sentimeter
mm	Milimeter
μM	Mikrometer
v/v	Isipadu per isipadu
w/v	Berat per isipadu



NBD	Neutralised bleached deodorized
spp	spesis
U.V	Ultraungu
TCA	Tricarboxylic acid cycle
psi	Paun per inci persegi
n	Nano



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Pengenalan

Kebanyakan mikroorganisma yang tumbuh dengan asid lemak atau asetat sebagai satu-satunya sumber karbon menggunakan kitaran glioksilat menjalankan sintesis bagi bahan-bahan penting dalam sel. Enzim kunci kepada laluan tersebut ialah isositrat lyase (ICL), enzim dari kitaran glioksilat dan *malate synthase* (Kornberg, 1966). Laluan glioksilat menghalang kehilangan dua karbon dioksida dari kitaran asid trikarbositat (kitaran TCA), yakni membenarkan penyerapan bersih karbon ke dalam struktur sel semasa pertumbuhan di atas asetat. Tambahan lagi, semasa operasi dalam kitaran TCA, kebanyakan asid lemak akan melalui proses metabolic ke asetil-CoA. Ini memerlukan kehadiran isositrat lyase. Tidak hairanlah enzim kitaran ini boleh didapati dalam mikobakteria yang terkenal dengan kandungan lipid.

Dalam mycobacteria, aktiviti isositrat lyase dilaporkan meningkat secara berterusan sejajar dengan umur kultur dalam *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v (Murthy *et al.*, 1973) tetapi bukan di dalam *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_a atau



Mycobacterium smegmatis (Seshadri *et al.*, 1976). Kajian lain melaporkan peningkatan aktiviti enzim kitaran glioksilat di bawah tekanan oksigen rendah (Wayne and Lin, 1982) atau apabila mickobakteria tumbuh dengan kehadiran asetat (Kannan *et al.*, 1985).

Asid lemak eksogenus mewakili suatu kelas sebatian hidrofobik yang bertindak sebagai satu-satunya punca karbon dan tenaga untuk menyokong pertumbuhan dalam bacteria. Dalam *Streptomyces coelicolor*, asid lemak dengan rantaian berbeza (C_4 to C_{18}) secara efisien diturunkan melalui kitaran proses pengoksidaan β , di mana enzimnya boleh membentuk (Banchio *et al.*, 1997). Berbeza sekali dengan enzim kitaran proses pengoksidaan β dari *Escherichia coli* yang dipengaruhi oleh rantaian asid lemak yang panjang (Overath *et al.*, 1969).

Streptomyces menghasilkan pelbagai jenis metabolit sekunder, kebanyakan mereka mempunyai aplikasi penting seperti antibiotik (Miyadoh, 1993). Hampir kebanyakan data diterbitkan berkaitan penghasilan antibiotik merujuk kepada penjelasan tentang petanda psikologikal dan mekanisma penyeliaan. Tidak banyak diketahui tentang punca karbon untuk pembentukan antibiotik. Degradasi lipid neutral ini oleh lipase endogenus ialah suatu sumber dalaman untuk asid lemak. Ia pernah dihipotesiskan bahawa pengoksidaan β asid lemak bebas kepada asetil-CoA ialah sumber unit karbon bagi biosintesis kebanyakan sebatian poliketid (Olukoshi & Packter, 1994). Jika ini

adalah benar, maka aktiviti ACS atau aktiviti terlibat dalam pengaktifan asid lemak kepada *CoA thioesters* akan memainkan peranan penting dalam penghasilan antibiotik.



1.2 Objektif Kajian

Objektif utama kajian ini ialah untuk menguji pelbagai jenis lipid dan asid lemak yang berbeza untuk bertindak sebagai sumber karbon yang utama dengan menggantikan sumber-sumber karbon yang lain seperti glukosa dan asetat dan selepas itu, pertumbuhan mikobakteria dengan sumber karbon yang berlainan akan dikaji dan seterusnya dicatatkan. Objektif yang lain adalah menuliskan aktinomiset daripada sampel-sampel yang dibagi. Koloni-koloni aktinomiset yang telah dituliskan ini akan dijalankan proses fermentasi secara aerobik dengan tujuan menghasilkan metabolit sekunder berpotensi ICL. Metabolit sekunder akan diekstrak selepas fermentasi dijalankan selama lima hari dan kemudian digunakan untuk menguji kehadiran enzim isositrat lyase (ICL) yang digunakan oleh mikobakteria untuk mengutilasi asid lemak atau lipid sebagai sumber karbon yang utama. *Mycobacterium smegmatis* jenis liar dan transforman akan ditumbuhkan dalam media minimal M9 (gubahan).



BAB 2

ULASAN LITERATUR

2.1 Mikobakteria

Mikobakteria mempunyai ciri di mana mereka tidak mudah dicelup dan apabila dicelup, ia tidak boleh dilunturkan oleh asid. Perwatakan ini menyebabkan ia dikenali dengan nama kumpulan asid cepat. Ia mengandungi bahan granul dan melekit yang menyumbang kepada perwatakan asid cepat dan keperluan untuk prosedur pencelupan khusus bagi membenarkan penyerapan kesan celupan tersebut. Mereka adalah panjang, Gram-positif, rod asid cepat yang mempunyai ketahanan membran sel dan kadangkala menjadi pepohon (*branching*). Kebanyakan spesis dari kumpulan ini (patogenik) tumbuh sangat lambat, atau tidak tumbuh langsung, di atas media tiruan dan memerlukan media disediakan khas bagi mengaktifkan mereka. Semua spesis dari *genus* mikobakteria adalah aerobik, tidak aktif (*non-motile*) dan tidak membentuk sporanya sendiri.

Mycobacterium tuberculosis, punca penyakit tuberkulosis (TB) yang menjangkiti manusia dan haiwan adalah spesis paling penting genus ini. Sesetengah spesis dari genus ini juga merupakan punca penyakit, tetapi kebanyakan adalah



tidak patogenik dan dijumpai dalam tanah, jerami atau rumput dan kulit serta membran mukus manusia dan haiwan.

Dalam kebanyakan organisma, ekspresi aktiviti isositrat lyase bergantung kepada punca karbon dalam medium pertumbuhan. Höner Zu Bentrup dan rakan-rakan (1999) mendapati jumlah aktiviti spesifik isositrat lyase dalam *Mycobacterium avium* mempunyai perbezaan besar bergantung kepada sumber karbon utama. Mereka mendapati pertumbuhan *Mycobacterium avium* pada asetat atau palmitate menunjukkan tahap pengenalan tinggi (439.6 ± 0.2 and $1,193.4 \pm 0.2$ nmol/ min/ mg protein masing-masing). Apabila kultur ditumbuh atas *palmitate* dengan glukosa, tahap aktiviti enzim adalah kira-kira separuh dari kultur *acetate* (217.5 ± 0.51 nmol/ min/ mg protein). *Mycobacterium avium* dikultur atas *acetate* dengan glukosa menunjukkan aktiviti kurang iaitu pada 84.7 ± 0.35 nmol/min/mg protein. Pertumbuhan *Mycobacterium avium* atas kombinasi succinate dan acetate atau susinat dan palmitat dalam medium minimal, walaupun, tidak menunjukkan peningkatan enzim. Oleh itu, kehadiran sumber karbon alternatif tidak sepenuhnya menahan penyerapan isositrat lyase kecuali susinat hadir.

Palmitat menggalakkan aktiviti isositrat lyase (tiga kali ganda) ke tahap lebih tinggi dari asetat (hanya dua kali ganda) dan juga succinate menahan aktiviti enzim di bawah tahap pengesanan (Höner Zu Bentrup *et al.*, 1999). Ekspresi ICL boleh dipertingkatkan melalui pertumbuhan kedua-dua *Mycobacterium avium* dan

Mycobacterium tuberculosis dalam medium minimal yang ditambah dengan asetat atau palmitat.

Aktiviti isositrat lyase ditingkatkan dalam bacteria apabila tumbuh atas punca karbon lain dalam kehadiran palmitat dan asetat. *E. coli* (Kornberg, H.L., and H. Beevers, 1957) , *Rhodobacter capsulatus* (Blasco, R., J. Cardenas, and F.Castillo, 1991) dan *Bradyrhizobium japonicum* (Green, L. S., D.B.Karr, and D.W. Emerich, 1998), yang mengekspres isositrat lyase apabila asid lemak atau asetat membekalkan satu-satunya punca karbon tetapi tidak mengekspres enzim dalam kultur pertumbuhan atas sebarang substrat, tanpa mengambil kira kehadiran atau tidak acetate. Dalam *Mycobacterium avium*, isositrat lyase jelasnya ditingkatkan apabila sel mengutilisasikan asetat sebagai satu-satunya punca karbon. Pertumbuhan atas palmitat meningkatkan aktiviti enzim ini sebanyak dua kali ganda.

2.1.1 Ekologi Mikobakteria

Pengenalan kepada kaedah mencelup berdasarkan alcohol-asid telah membuka jalan baru untuk membezakan mikobakteria daripada mikroorganisma yang lain. Pada tahun 1899, Möller berjaya mengisolasi mikobakteria daripada paya, lopak air, permukaan tumbuhan, tanah dan juga bahan kompos melalui kaedah pencelupan Ziehl-Neelsen. Beliau juga



menemui bakteria asid-fast pada rumput Timothy dan menamakan bakteria tersebut sebagai "Timothy bacillus I dan II". Organisma itu berasal daripada sejenis spesies, iaitu *M. phlei* (Lehman & Neumann, 1899).

Robert Koch dan Rabinowitsch (1897) menekankan bahawa mycobakteria lain mempunyai kemungkinan yang besar wujud dalam makanan, terutamanya mentega. Kemungkinan ini adalah lebih tinggi berbanding dengan *M. tuberculosis*. Rabinowitsch gagal menemui sebarang tuberkel bacilli dalam 80 sampel mentega yang dikumpunya di Berlin dan Philadelphia.

2.1.2 Ciri-ciri Mikobakteria

Mikobakteria ialah mikroorganisma bersifat mesofilik dan memerlukan suhu antara 28⁰C hingga 31⁰C untuk pertumbuhan optimal. Proses penggandaan koloninya bermula pada suhu antara 18⁰C hingga 22⁰C dan berterusan walaupun pada suhu antara 41⁰C hingga 52⁰C.

Mikobakteria mengalami percambahan semasa pertumbuhan dan membentuk filamen. Filamen mikobakteria akan mengalami frakmentasi dan berubah menjadi rod

RUJUKAN

- Banchio, C., Gramajo, H.C. 1997. Medium- and long-chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2): first characterization of a Gram-positive bacterial system. *J. Microbiology* 143, 2439-2447.
- Bartmann.K. 1975. Biometrie der Mykobakterien In: Mykobakterien and mykobateriell Krankheiten. Vol.III. 19-58, Meissner G, Schmiedel A, Nelles A, Eds. VEB Gustav Fischer, Jena.
- Bryan, A. H., Bryan, C. A., Bryan, C. g. 1962. Bacteriology: Principles and practice, 6th ed. 1962. Barnes & Noble Books, London.
- Christie, W.W. 1973. Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids.pp. 892. Pergamon Press, London.
- Collins, C. H., Grange, J. M. & Yates, M. D., 1997. Tuberculosis bacteriology : Organization dan practice, 2nd edition. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Delic, I., Robbins, P.& Westpheling, I. 1992. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolic control. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1885-1889
- Feldlaufer, MF., Lusby, WR, Knox, DA., Shimanuki. (1993a) Isolation and identification of linoleic acid as an antimicrobial agent from the chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. *Apidologie* 24:89-94.
- Feldlaufer, MF., Knox, DA., Lusby, WR., Shimanuki. (1993b) Antimicrobial activity of fatty acids against *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Apidologie* 24: 95-99.
- Harry, J., Deuel, Jr. 1957. The lipids-their chemistry and biochemistry, volume III: Biochemistry, biosynthesis, oxidation, metabolism, and nutritional value. Interscience Publishers, Inc., New York.
- Hodgson, D. 1982. Glucose repression of carbon source uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen Microbiol* 128, 2417-2430
- Höner Bentrup, K., Miczak, A., Swenson, D.L. & Russell, D.G. 1999. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 181, 7161-7167



RUJUKAN

- Banchio, C., Gramajo, H.C. 1997. Medium- and long-chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2): first characterization of a Gram-positive bacterial system. *J. Microbiology* 143, 2439-2447.
- Bartmann.K. 1975. Biometrie der Mykobakterien In: Mykobakterien and mykobateriell Krankheiten. Vol.III. 19-58, Meissner G, Schmiedel A, Nelles A, Eds. VEB Gustav Fischer, Jena.
- Bryan, A. H., Bryan, C. A., Bryan, C. g. 1962. Bacteriology: Principles and practice, 6th ed. 1962. Barnes & Noble Books, London.
- Christie, W.W. 1973. Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids.pp. 892. Pergamon Press, London.
- Collins, C. H., Grange, J. M. & Yates, M. D., 1997. Tuberculosis bacteriology : Organization dan practice, 2nd edition. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Delic, I., Robbins, P.& Westpheling, I. 1992. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolic control. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1885-1889
- Feldlaufer, MF., Lusby, WR, Knox, DA., Shimanuki. (1993a) Isolation and identification of linoleic acid as an antimicrobial agent from the chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. *Apidologie* 24:89-94.
- Feldlaufer, MF., Knox, DA., Lusby, WR., Shimanuki. (1993b) Antimicrobial activity of fatty acids against *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Apidologie* 24: 95-99.
- Harry, J., Deuel, Jr. 1957. The lipids-their chemistry and biochemistry, volume III: Biochemistry, biosynthesis, oxidation, metabolism, and nutritional value. Interscience Publishers, Inc., New York.
- Hodgson, D. 1982. Glucose repression of carbon source uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen Microbiol* 128, 2417-2430
- Höner Bentrup, K., Miczak, A., Swenson, D.L. & Russell, D.G. 1999. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 181, 7161-7167



- Hassinen, J.B., Durbin, G.T., and Bernhart, F.W. 1951. *Arch. Biochem. Biophys.* 31, 183-189
- Kabara, JJ (1978) Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents (a review).
In: *The Pharmacological Effects of Lipids* (Kabara JJ ed) *Am Oil Chem Soc. Champaign, IL*
- Kannan, K.B., V.M. Katoch, V.P. Bharadwaj, V.D. Sharma, A.K. Datta, and C.T. Shivannavar. 1985. Metabolic studies on *mycobacteria*. II. Glyoxylate by-pass (TCA cycle) enzymes of slow and fast growing *mycobacteria*. *Indian J. Lepr.* 57, 542-548
- Korn-Wendisch, F. & Kutzner, H. J. 1991. The family *Streptomycetaceae*. In *The Prokaryotes*, pp. 921-995. Edited by A. Barlows, II. Trüper, M. Dworkin, W.I. Iarder & K. Schleifer. New York: Springer.
- Kornberg, H.L. 1966. Anapleurotic sequences and their role in metabolism. *Essays Biochem.* 2, 1-31
- Lehmann, K.B., Neumann, R. 1899. *Lehmann's medicin handatlantent. X. Atlas und Grundriß der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik.* 2nd ed. München.
- Loudon, R.G., Frantz, R.A., LeMaistre, C.A. 1969. Laboratory for the study of mycobacterial aerosols. *Amer Rev Resp Dis* 100:160-164.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2002. *Brock Biology of Microorganisms.* Prentice Hall International, Inc. New Jersey.
- Miyadoh, S. 1993. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. *Actinomycetology.* 7, 100-106
- Miyashita, K., Fuji, T. & Sawada, Y. 1991. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *Gene.* 137, 2065-2072
- Murthy, P.S., Sirsi, M., and Ramakrishnan, T. 1973. Effects of age on the enzymes of tricarboxylic acid and related cycles in *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v. *Am. Rev. Respir. Dis.* 108, 689-690
- Olukoshi, E.R., and Packter, N.M. 1994. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology.* 140, 931-943
- Overath, P., Pauli, G., and Scharett, U. 1969. Fatty acid degradation of *Escheridia coli*. An inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants. *Eur. J. Biochem.* 7, 559-574



- Rabinowitsch, L. 1897. Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen in Markbutter. *Zeitschr Hyg infektinskrankh* 26:90-111.
- Sarles, W.B., Frazier, W.C., Wilson, J.B. 1956. *Microbiology General and Applied*, 2nd ed., pp. 58-59. Harper & Brothers, New York.
- Segal, W. 1984. *The Mycobacteria: A Sourcebook* (eds Kubica, G.P. & Wayne, L.G.), pp. 547-573. Dekker, New York.
- Sharma, V., Sharma, S., Höner Zu Bentrup, K., McKinney, J.D., Russell, D.G., Jacobs, Jr. W.R. and Sacchettini, J.C. 2000. Structure of isocitrate lyase, a persistent factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Structural Biology* 7, 663-668
- Shimanuki, H; Knox, DA, Feldlaufer, MF (1992) Honey bee disease interactions: The impact of chalkbrood on other honey bee brood diseases *American Bee Journal*. 132: 735-736.
- Sermin-González, L. & Bibb, M.J. 1994. Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dag A*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 140, 2555-2565
- Seshadri, R., P.S. Murthy, and T.A. Venkitasubramaniam. 1976. Isocitrate lyase in *Mycobacteria*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 13, 95-96
- Smith, C.P. & Chater, K.F. 1988. Structure and controlling sequences for the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon. *J. Mol Biol* 204, 569-580
- Thompson, C.J., Fink, D., NguYen, L.D. 2002. Minireview: Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coecilor* genome sequence. *Genome Biology* 3(7): reviews 1020.1-1020.4
- Viroille, M.J. & Bibb, M.J. 1988. Cloning, characterization ad regulation of an α -amylase gene from *Streptomyces linnosus*. *Mol Microbiol.* 2, 197-208
- Wayne, L.G., and K.-Y. Lin. 1982. Glyoxylate metabolism ad adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* 181, 7161-7167

