รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดกรอง และศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทใน เนื้อเยื่อต้นต้อยติ่งที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้

Screening and preliminary taxonomic studies of antibiotic-producing endophytic actinomycetes from *Ruellia tuberose* L.

โดย

ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QR
82
.A35
ว419ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 130282
วัน, เดือน, ปี 2 เมย. 2557

.b.12597892
.i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากโครงการทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การคัดกรอง และศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทในเนื้อเยื่อต้นต้อยติ่งที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้

(ภาษาอังกฤษ) Screening and preliminary taxonomic studies of antibiotic producing endophytic actinomycetes from *Ruellia tuberose* L.

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปี 2556 จำนวนเงิน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2555 ถึง 30 กันยายน 2556
ผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
โทรศัพท์ 02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

ในการศึกษาเพื่อหาเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากเนื้อเยื่อต้นต้อยติ่ง สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้จำนวน 20 ไอโซเลต เชื้อแอคติโนมัยสีทเหล่านี้สามารถถูกจัดกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี รวมทั้งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เป็น 2 กลุ่ม เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 1 สร้างเส้นเส้นใยอากาศสีเทา สปอร์มีลักษณะกลมต่อเป็นสายโซ่ยาวแบบเกลียว เชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 2 ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สปอร์มีลักษณะกลมเดี่ยวอยู่บนเส้นใยอาหารสีส้ม การวิเคราะห์ยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อตัวแทนของกลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces cyaneus* (99.7%) ส่วนเชื้อตัวแทนของกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อในสกุล *Micromonospora* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora krabiensis* (99.9%) น้ำหมักของเชื้อแอคติโนมัยสีทตัวแทนในแต่ละกลุ่มถูกสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต และถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยเทคนิคการแพร่จากแผ่นดิสก์ พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และMethicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 ได้ สำหรับสารสกัดหยาบทุกชั้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 2 ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

In the course of our investigation for the antibiotic-producing endophytic actinomycetes, twenty actinomycete isolates were isolated from tissue of of *Ruellia tuberose* L. These isolates could be grouped by morphological, physiological, biochemical characteristics including the antimicrobial activity into two groups. The actinomycetes in group I produced grey aerial mycelia that usually bear long chain of spores in spiral type. Group II could not produce the aerial mycelia. This group produced single spore directly on orange substrate myclia. 16S rRNA gene analysis of the representative of these two groups revealed that the actinomycete in group I belonged to the member of *Streptomyces* and was closely related to *Streptomyces cyaneus* (99.7%) while the representative isolate of group II was a member of *Micromonospora* and was most closed to *Micromonospora krabiensis* (99.9%). The fermentation broth of the representative isolate in each group was extracted with ethylacetate and was tested for anti-microbial activity by disc diffusion technique. The result revealed that crude ethyl acetate extract of actinomycete in group I exhibited the anti-microbial activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) while crude extract of actinomycete in group II could not inhibit the growth of any tested microorganisms.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 การเก็บตัวอย่าง	15
3.2 การแยกเชื้อ	15
3.3 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์	15
3.4 การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ	15
3.5 การสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ	15
3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	16
3.7 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ	18
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท	18
4.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทของตัวแทนในแต่ละกลุ่ม	20
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท (Bérdy, 2005)	3
2	แสดงรายละเอียดลักษณะของตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้แต่ละไอโซเลต	18
3	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP 2	23
4	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีท	25
5	แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะเชื้อ *E. coli* O157:H7	9
2	แสดงลักษณะเชื้อ *Staphylococcus aureus*	11
3	แสดงลักษณะเชื้อ *Bacillus subtilis*	11
4	แสดงลักษณะเชื้อ *Candida albicans*	12
5	แสดงลักษณะเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*	13
6	แสดงลักษณะเชื้อ *Micrococcus luteus*	14
7	แสดงลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีท กลุ่มที่ 1	19
8	แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 2	20
9	แสดงตำแหน่งของเชื้อ RR3-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)	21
10	แสดงตำแหน่งของเชื้อ TR2-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

B. subtilis = *Bacillus subtilis*

C. albicans = *Candida albicans*

E. coli = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

ISP = International *Streptomyces* Project

KB = Krabi province

M. luteus = *Micrococcus luteus*

MeOH = methanol

MHA = Mueller-Hinton Agar

NMR = Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

n-BuOH = n-butanol

nm = nanometre

Ps. Aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

TLC = Thin Layer Chromatography

UV = Ultraviolet

μL = microlitre

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำ รวมถึงปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดยังคงเป็นปัญหาของวงการสาธารณสุขไทยในปัจจุบัน ทำให้การศึกษาค้นคว้าหาแหล่งของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่มีความสำคัญมาก จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารปฏิชีวนะ ท่ามกลางกลุ่มของจุลินทรีย์เหล่านี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีทจัดเป็นเชื้อกลุ่มสำคัญที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด (Bérdy, 2005)

แอคติโนมัยสีท (actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีการสร้างเส้นใย (filamentous bacteria) และสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ทั้งแบบที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้มสปอร์ เรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือโคนิเดีย (conidia) และแบบที่มีถุงหุ้มสปอร์ (sporangium) เรียกว่า สปอแรงกิโอสปอร์ (sporangiospore) สปอร์ที่สร้างนี้ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่สามารถทนต่อความแห้งได้ดีจึงสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอคติโนมัยสีทที่รู้จักกันดี คือ ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากเชื้อแอคติโนมัยสีทถึงร้อยละ 45 เชื้อราร้อยละ 38 และแบคทีเรียชนิดอื่นร้อยละ 17 (Bérdy, 2005) เชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ร้อยละ 70 (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีททั้งหมด รองลงมา คือ เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ร้อยละ 5 (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น เช่น *Streptoverticillium Kitasatospora Actinomadura Saccharothrix Microbispora Microtetraspora Nonomuraea Actinoplanes Dactylosporangium Thermomonospora Thermoactinomyces Nocardia Saccharopolyspora Amycolatopsis Kibdellosporangium Pseudonocardia Actinosporangium Streptosporangium Spirillospora Planobispora* และ *Planomonospora* เป็นต้น (Bérdy, 2005) จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าการค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ นั้นยังมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเทียบกับเชื้อสกุล *Streptomyces* (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการขาดการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคในการแยกเพื่อให้ได้เฉพาะเชื้อสกุลนั้นๆ รวมทั้งขาดการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อจากแหล่งธรรมชาติ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นค้นหาเชื้อแอคติโนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ รวมทั้งสกุล *Streptomyces* เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ไม้ สัตว์ หรือจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จึงมีความเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยสีทนั้นน่าจะมีการกระจายตัวอยู่มากในหลายพื้นที่และมีสายพันธุ์ที่หลากหลายเช่นกัน แอคติโนมัยสีทสามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ในดิน แหล่งน้ำ ฝุ่นละออง และยังสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเรียกว่า เอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท (endophytic actinomycetes) โดยเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้เป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถพบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* และเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทหายากสกุลอื่นๆ (Zhao *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ และค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จำนวนมาก (Bieber *et al.*, 1998 ; Castillo *et al.*, 2002 ; Gu *et*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al., 2006 ; Duangmal *et al.*, 2008 ; Igarashi *et al.*, 2007) จากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทในพืชหลายชนิด

ต้นต้อยติ่ง เป็นสมุนไพรมีสรรพคุณทางยาคือ รากใช้ดับพิษ ปัสสาวะพิการและแก้พิษต่าง ๆ ใบ เมล็ด แก้แผลเป็นหนอง แผลเปื่อย ดูดหนอง ให้แผลหายเร็ว สมานบาดแผลเก่าและใหม่ ดูดหนองได้ดี (ที่มา: http://www. arunsawat.com/) เนื่องจากมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรจะมีส่วนร่วมในวิถีเมแทบอไลต์ (metabolic pathway) ของพืชสมุนไพร และสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดที่คล้ายกับพืชสมุนไพรหรือสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้ (Zhao *et al.*, 2011) ทำให้ต้นต้อยติ่งเป็นพืชที่มีความน่าสนใจในการนำมาคัดแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท ซึ่งในปัจจุบันยังมีการศึกษาอนุกรมวิธานของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเพียงเล็กน้อย ด้วยลักษณะอันจำเพาะของแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาตินี้อาจส่งผลให้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ได้

จากข้อมูลเบื้องต้นทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อคัดกรองเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากต้นต้อยติ่ง ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ ตลอดจนศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้น รวมทั้งทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทเหล่านี้ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาและนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสีท (Bérdy, 2005)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากต้นต้อยติ่ง

1.2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

1.2.3 เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากต้นต้อยติ่ง ประมาณ 20 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหาร Yeast extract - malt extract broth เป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซีเตต และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *Candida albicans* ATCC 10231 รวมทั้งศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของโครงการวิจัย

1. สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีจากต้นต้อยติ่ง
2. สามารถทราบข้อมูลฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท
3. สามารถเก็บรวบรวมความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทจากต้นต้อยติ่ง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาวิจัยด้านอื่นต่อไป
4. การวิจัยในครั้งนี้อาจค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสร้างสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ซึ่งอาจจะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาต่อทางด้านเภสัชศาสตร์ เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

2.1 นิยามและความหมายของเอนโดไฟต์

เมื่อจะกล่าวถึงนิยามของเอนโดไฟต์ได้มีผู้ให้คำนิยามของเอนโดไฟต์ไว้หลายนิยามซึ่งโดยทั่วไปจะกล่าวว่าเอนโดไฟต์คือกลุ่มของแบคทีเรีย รา รวมไปถึงแอคติโนมัยซีท ซึ่งสามารถพบได้ในพืชทุกชนิดโดยเฉพาะพืชที่เจริญเต็มที่ คำจำกัดความของเอนโดไฟต์คือ "แบคทีเรียซึ่งอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำอันตรายต่อพืช" ถึงแม้ว่าเอนโดไฟต์จำนวนหนึ่งจะก่อโรคกับพืชแต่จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคหรือก่อโรคไม่รุนแรงที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชเป็นที่รู้ดีว่ามีการชักจูงให้เกิดระบบการต้านทานของพืช ซึ่งความต้านทานต่อโรคของพืชที่ค่อนข้างต่ำนั้น เป็นผลเนื่องมาจากการขาดจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ และจากคุณสมบัติในการไม่ทำอันตรายแก่พืชและกระตุ้นให้พืชเกิดระบบการต้านทานต่อโรคเอนโดไฟต์จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชและยับยั้งสาเหตุของโรคที่เกิดกับพืชและสิ่งแวดล้อม

เอนโดไฟต์ถูกค้นพบครั้งแรกที่ประเทศเยอรมัน ในปี 1904 ซึ่งเอนโดไฟต์ชนิดแรกที่ค้นพบเป็นราเอนโดไฟต์ โดย Freeman ได้ค้นพบเอนโดไฟต์ในหญ้า *Persian darnel* ซึ่งเป็นหญ้าที่มีเอนโดไฟท์อาศัยอยู่อย่างหนาแน่น และมีฤทธิ์ในการต้านแมลง แอคติโนแบคทีเรียที่พบครั้งแรกคือ *Frankia* ซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยอาศัยอยู่บริเวณรากของพืช เอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชสามารถพบได้ในพืชหลายสายพันธ์และการที่เอนโดไฟต์สร้างสารทุติยภูมิขึ้นภายในพืชผลที่เกิดขึ้นก็คือเป็นสารควบคุมทางชีวภาพ (biological control) เช่น เป็นสารต้านสิ่งกระตุ้นต้านแมลง ต้านการเจริญของวัชพืชและต่อต้านโรค ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อผลผลิตในระบบนิเวศ ความน่าสนใจของการใช้ประโยชน์จากสารในพืชซึ่งผลิตโดยเอนโดไฟต์ เป็นที่ดึงดูดให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกเข้ามาศึกษาและสำรวจค้นหาเอนโดไฟต์ซึ่งเป็นการแสดงถึงโอกาสในการค้นพบสารและวิธีการในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และเภสัชกรรม (Rangaswami และ Bagyaraj, 1992)

2.2 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทถูกเรียกว่าแอคติโนแบคทีเรียหรือแบคทีเรียเส้นสาย เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายเส้นใย (ยาวเรียวและมีกิ่งก้าน) แต่เส้นใยนี้มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของรา สามารถพบได้ทั่วไปในดินซึ่งมีอยู่ถึงร้อยละ 10-50 ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมดซึ่งมีความสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ เช่น เซลลูโลสและไคติน ทำให้เกิดการหมุนเวียนของสารอินทรีย์ในธรรมชาติ รวมทั้งทำให้เกิดวัฐจักรคาร์บอนขึ้น ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ และมีความสำคัญในการสร้างฮิวมัสใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดิน แอคติโนมัยซีทบางชนิดอาศัยอยู่ในพืชและสัตว์และมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Mycobacterium, Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus* และ *Streptomyces* บางสายพันธุ์ และยังสามารถพบได้ในบริเวณที่มีการทับทมของใบไม้ ดินตะกอนบริเวณแหล่งน้ำ และจะพบแอคติโนมัยซีทในพื้นที่ที่ทำปศุสัตว์มากกว่าในพื้นที่ที่ทำการเกษตร และในพื้นที่ที่ทำการเกษตรจะมีปริมาณแอคติโนมัยซีทมากกว่าในพื้นที่ที่ปล่อยว่างเนื่องจากแอคติโนมัยซีทเป็นพวกแซโพรไฟต์ จึงมีปริมาณขึ้นกับปริมาณซากสิ่งมีชีวิตในดิน ดินที่อยู่ลึกจึงมีปริมาณแอคติโนมัยซีทน้อยกว่าดินที่อยู่ผิวหน้า (Mark, 1999)

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญจึงไม่สามารถเจริญได้ในดินที่มีน้ำท่วมขังและไม่สามารถอยู่รอดในสภาวะที่แห้งแล้งได้ แต่เมื่อมีการสร้างสปอร์ขึ้นแอคติโนมัยซีทจะสามารถทนต่อสภาวะที่แห้งแล้งได้ดี ในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งแอคติโนมัยซีทจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 30-90 เนื่องจากเมื่อได้รับความชื้น สปอร์ของแอคติโนมัยซีทก็จะงอกออกมาซึ่งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆไม่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้จึงมีจำนวนลดลง แอคติโนมัยซีทสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 5 องศาเซลเซียส แต่จะสามารถพบแอคติโนมัยซีทได้ในดินที่มีอุณหภูมิสูงมากกว่าในดินที่มีอุณหภูมิต่ำ แต่ไม่ได้หมายความว่าแอคติโนมัยซีทชอบอุณหภูมิสูง อุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญอยู่ที่ 28-37 องศาเซลเซียส แต่แอคติโนมัยซีทบางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส จึงสามารถพบแอคติโนมัยซีทได้ในกองปุ๋ยหมัก

ในการจัดกลุ่มทางอนุกรมวิธานมีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสีทั้งของเส้นใยและสปอร์ ลักษณะผิวหน้าของโคโลนี และลักษณะของโคนิดิโอสปอร์ (conidiospores) เปอร์เซ็นต์ของเบสกวานีนและไซโตซีนใน DNA องค์ประกอบของฟอสโฟลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์ และปริมาณน้ำของสปอร์ วิธีการใหม่ในการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานที่มีการนำมาใช้คือ การศึกษาลำดับเบสใน 16S rRNA gene (McMurray และคณะ, 1996)

2.3 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อพืช

การเกษตรในปัจจุบันได้มีการประยุกต์โดยการใช้สารเคมีในการทำการเกษตรซึ่งมีอิทธิพลในการควบคุมการเกิดโรคของพืช อย่างไรก็ตามตั้งแต่มีการใช้สารเคมีในการทำการเกษตรทำให้เกิดความเห็นขัดแย้งกันในการทำการเกษตร เนื่องจากเกิดมลพิษและเป็นอันตรายต่อธรรมชาติซึ่งส่งผลต่อสารอินทรีย์ จึงมีการหันมาใช้สารควบคุมทางชีวภาพแทน ซึ่งผลที่ตามจากการใช้สารควบคุมทางชีวภาพขึ้นกับความรู้ขั้นพื้นฐานในการเลือกสารเพื่อใช้กับจุลินทรีย์ก่อโรค โดยทั่วไปการควบคุมทางชีวภาพจะเลือกจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้ควบคุมโดยทำการทดลองภายในห้องปฏิบัติการก่อน เพื่อทดสอบการต่อต้านที่มีต่อเชื้อก่อโรคที่ต้องการและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามผลการทดลองภายในเซลล์ทั้งหมดทำให้รู้ถึงกลไกการควบคุมทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ การเลือกใช้สารต่อต้านต้องคำนึงถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม และโดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์อาจมีปฏิกิริยาที่แตกต่างออกไปเมื่อสภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลง

ความสัมพันธ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์ได้มีการศึกษามาตั้งแต่ในศตวรรษที่ 19 โดยแอคติโนมัยซีทถูกพิสูจน์ว่ามีความใกล้ชิดในการอาศัยอยู่กับพืชโดยสร้างประโยชน์และไม่มีผลกระทบต่อพืช จากการแยก *Frankia* ได้จากปมรากพืชที่แสดงหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนในรากพืชคล้ายกับ *Rhizobium* ในพืชตระกูลถั่ว (L.Cao และคณะ,2004) และมีรายงานครั้งแรกถึงแอคติโนมัยซีทก่อโรคคือ *Streptomyces scabies* ซึ่งก่อโรคในมันฝรั่ง โรคนี้สามารถพบได้ทั่วไปบริเวณที่มีต้นมันฝรั่งเจริญอยู่ทั่วโลกและบางครั้งก็เกิดขึ้นในดินที่ซึ่งเคยปลูกมันฝรั่ง ด้วยเหตุนี้นั่นคือสายพันธุ์ที่สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในดินและในเนื้อเยื่อพืช บางครั้งแอคติโนมัยซีทมีการแสดงลักษณะเด่นทางสรีรวิทยาต่อพืชผู้ให้อาศัย ตัวอย่างเช่น รายงานการศึกษาของ Narisawa และคณะ(2000) ได้มีการศึกษาเมล็ดกะหล่ำปลีของจีนที่ใช้ปลูกโดยมีการเติมเชื้อ *Heteroconium chaetospira* ซึ่งมีฤทธิ์การต่อต้านเชื้อก่อโรค *Plasmodiophora brassicae* และเมื่อเชื้อเจริญก็จะมีการสนับสนุนการเจริญของพืชผู้ให้อาศัย Hasegawa และคณะได้แยกจีนัสใหม่ของแอคติโนมัยซีทได้คือ *Actinosynnema* จากใบหญ้า ซึ่งนี่คือรายงานชิ้นแรกที่บรรยายถึงแอคติโนมัยซีทที่เกิดจากพืชในญี่ปุ่น ถึงแม้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างมันกับพืชจะไม่แน่นอน ได้มีการรายงานผลการทดลองของกลุ่ม Matsukama และกลุ่มของ Okazaki ว่าแหล่งที่อยู่อาศัยของแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชมีขอบเขตที่กว้างขวางเนื่องจากพืชมีความหลากหลาย โดยมีการอาศัยแบบพึ่งพากันและกันหรือแบบพาราสิต มีการบันทึกว่าสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่หายากของแอคติโนมัยซีทซึ่งสำรวจได้จากพืชและพบได้จากสารกระตุ้นจากสารทุติยภูมิจะแสดงลักษณะของสารปฏิชีวนะและเป็นสารควบคุมการเจริญต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น แอคติโนมัยซีทชนิดต่างๆ โดยเฉพาะ *Streptomyces* สามารถคัดแยกได้จากเนื้อเยื่อของรากและบริเวณรอบรากพืช ซึ่งได้มีการพิสูจน์แล้วว่าเป็นสารปฏิชีวนะต่อเชื้อก่อโรคในดินเป็นอย่างมาก โดย *Streptomyces* และ *Microbispora* พบมากที่สุด Bacon และ Hitton (2002) รายงานทั้งหมด 246 สายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีทจากพืชประกอบด้วย *Streptomyces* (97 สายพันธุ์), *Microbispora* (57 สายพันธุ์), *Nocardia* (23 สายพันธุ์), *Micromonospora* (18 สายพันธุ์), *Actinomadura* (4 สายพันธุ์) และอื่นๆอีก จากใบของพืช 9 ชนิดที่ร่วงลงมาจากการค้นพบเอนโดไฟต์ *Streptomyces* จำนวนมากมีความสำคัญต่อการพัฒนาและความสมบูรณ์ เพราะเชื้อมีผลต่อการเจริญของพืชและการดูดซึมสารอาหารของพืช หรือโดยการผลิตสารทุติยภูมิ เท่าที่มีการตรวจสอบพืชเกือบทุกชนิดที่มีระบบท่อจะพบแอคติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อพืช ปกติแล้วสายพันธุ์ของเอนโดไฟต์แอคติโนมัยซีทจะสามารถแยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพบมากที่สุดในรากแต่ใครรู้ว่าจุลินทรีย์ในพืชทำปฏิกิริยาที่เป็นประโยชน์หรือเป็นอันตรายใดๆต่อกิจกรรมภายในเซลล์พืช สิ่งนี้คือสิ่งหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่น่าสนใจที่สุดและการค้นคว้าวิจัยที่มีนัยสำคัญของการทำปฏิกิริยากันระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ จากการเฝ้าสังเกตถึงระดับความพิเศษของการสร้างอาณาเขตภายในปมรากถั่วของ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 การสังเกตชี้บอกว่าการสร้างอาณาเขตเริ่มต้นจากปมเล็กๆและเส้นใยที่ขยายการทำงานจากปมเล็กๆไปบนรากที่เป็นฐานของปุ่มปมเล็กๆนั้น ปมเล็กๆบนผิวรากเกิดเส้นใยแผ่ขยายและทะลุลงสู่เซลล์ การสังเกตนี้ไม่ได้เป็นหลักฐานของความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันระหว่างปุ่มปมและเชื้อแต่เป็นหลักฐานที่แสดงถึงสังคมของแอคติโนมัยซีทกับปมแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์อื่นๆภายในรากอาจจะมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์รวมทั้งสรีรวิทยาของพืช

ซึ่งการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถทำได้โดยเก็บตัวอย่างของพืชที่ต้องการศึกษามาล้างทำความสะอาดก่อนที่จะฆ่าเชื้อที่บริเวณพื้นผิวของพืชเพื่อเป็นการทำลายจุลินทรีย์อื่นที่ติดมากับพืช และทำการตัดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชเลี้ยงในอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของ บ่มไว้ที่สภาวะที่เหมาะสมคือที่ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส และตรวจสอบโคโลนีที่ขึ้นมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะเป็นโคโลนีที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของพืชแล้วทำการศึกษาลักษณะของเชื้อ

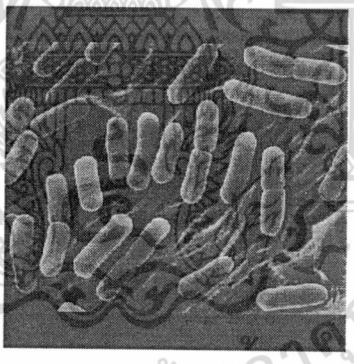
2.4 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (ภัทรชัย, 2549)

การอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตอย่างน้อย 2 ชนิด (symbiosis) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ แต่การอาศัยของเชื้อจุลินทรีย์ในร่างกายคน มักเป็นภาวะที่เอื้อประโยชน์ต่อแบคทีเรีย ในภาวะปกติจุลินทรีย์จำนวนมากจะอาศัยอยู่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในร่างกายโดยไม่ก่อให้เกิดโรค เรียกภาวะนี้ว่าภาวะอิงอาศัย (commensalisms) แต่จุลินทรีย์บางชนิดมีประโยชน์กับร่างกาย เช่น ช่วยย่อยสลายสารอาหาร หรือสร้างวิตามินเพื่อช่วยในการดูดซึมอาหาร เรียกภาวะนี้ว่าภาวะพึ่งพาอาศัย (mutualism) ในขณะที่การอาศัยของเชื้อบางชนิดก่อให้เกิดโทษ เมื่อเข้าสู่ร่างกายก็จะนำไปสู่การเกิดโรค เรียกภาวะนี้ว่าภาวะปรสิต (parasitism) และเรียกเชื้อในกลุ่มนี้ว่า เชื้อก่อโรค (pathogen) ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 *Escherichia coli* (ภัทรชัย, 2549)

เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง (Gram negative rod) ขนาด 1-2 ไมโครเมตร จัดเป็นพวก facultative anaerobic แต่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobe) เคลื่อนที่โดย Peritrichous flagella เป็นสปีชีส์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุด โดยเป็นเชื้อประจำถิ่นในทางเดินอาหาร โดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ และเป็นสปีชีส์ที่พบก่อโรคในคนได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม Enterobacteriaceae ส่วนใหญ่ก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร เกิดลำไส้อักเสบเป็นแผล เรียกว่า Hemorrhagic colitis เกิดจากเชื้อ *E. coli* ในกลุ่ม Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) หรือ Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้องเกร็งอย่างรุนแรง อาเจียน และถ่ายเป็นเลือด (Blood diarrhea) ซึ่งกลไกสำคัญในการก่อโรค คือ สารพิษ Shiga toxin หรือ Shiga-like toxin (Stx) โดยซีโรกรุ๊ป(Serogroup) ที่พบก่อโรคได้บ่อย ได้แก่ Serogroup O157 โดยซีโรไทป์ (Serotype) ของ O157 ที่สามารถสร้าง Shiga toxin ได้ คือ O157:H7 และ O157:NM (nonmotile)แต่บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infection) โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Meningitis) โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteremia)



รูปที่ 1 *E. coli* O157:H7

(ที่มา : http://www.astrographics.com)

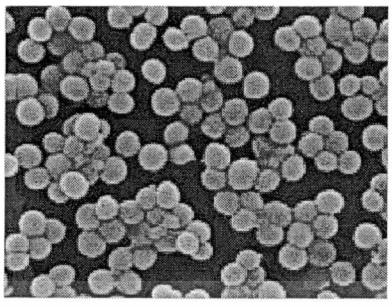
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 *Staphylococcus aureus* (ภัทรชัย, 2549)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม (Gram-positive cocci) เกาะกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (Grape-like cluster) เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีขนาดใหญ่ กลม และมีสีเหลืองทอง พบทั่วไป บริเวณผิวหนัง และจมูกของคน ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค Minor skin infection เช่น สิว หนองฝี ลักษณะสำคัญของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. aureus* คือเกิดการอักเสบเป็นหนองในตำแหน่งติดเชื้อ เรียกว่า ไพโอจีนิค อินเฟคชั่น (Pyogenic infection) หรือมักทำให้เกิดฝีหนอง (Abscess) โดยเอนไซม์ coagulase จะกระตุ้นการจับกลุ่มของเส้นใยไฟบริน (Fibrin) ทำให้เกิดการสร้างผนังขึ้นล้อมรอบรอยโรค เกิดเป็นก้อนฝี ซึ่งภายในจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่เน่าตายรวมกันเป็นหนอง ซึ่งเชื้อจากรอยโรคอาจแพร่กระจายเข้าสู่เส้นเลือด ทำให้สามารถก่อโรคติดเชื้อในระบบอื่นๆได้ เช่น โรคติดเชื้อในชั้นผิวหนัง โรคติดเชื้อของระบบไหลเวียนเลือด โรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร โรคติดเชื้อของกระดูกและข้อ และ Toxic shock syndrome (TSS) (ภัทรชัย, 2549)

บางสายพันธ์สามารถสร้างสารพิษ คือ เอนเทอโรทอกซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดี สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดได้นานถึง 60 นาที ดังนั้น จึงต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จึงทำลายสารพิษนี้ได้ โรคที่เกิดจากเชื้อนี้มีชื่อ Staphyloenterotoxicosis หรือ Staphyloenterotoxemia อาการเป็นพิษจะเกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน พบว่า ภายใน 2-6 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษปนเปื้อน ผู้ป่วยจะเกิดการบวมพองของผนังลำไส้และกระเพาะ ความรุนแรงของ อาการ ขึ้นอยู่กับภูมิต้านทานของร่างกายและปริมาณเชื้อที่ได้รับ โดยทั่วไปต้องมากกว่า $1x10^5$ โคโลนีต่อกรัมและยังขึ้นอยู่กับ ปริมาณสารพิษซึ่งโดยทั่วไปเพียง 1.0 ไมโครกรัม ก็จะทำให้เกิดอาการได้ โดยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อ่อนเพลียถ้าเป็นมากจะปวดศีรษะ ปวดตามกล้ามเนื้อ และเกิดการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตและอัตราการเต้นของ ชีพจรชั่วคราว อย่างไรก็ตาม อาการจะหายได้ภายใน 2-3 วัน แต่ถ้าเป็นมากจะใช้เวลานานกว่านี้ (อิ่มเอิบ, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

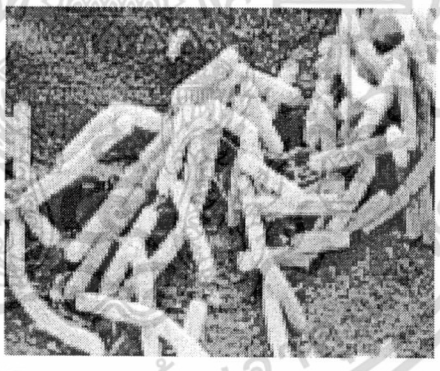


รูปที่ 2 *Staphylococcus aureus*

(ที่มา : www.biology4kids.com/extras/dtop_micro/7821.html)

2.4.3 ***Bacillus subtilis*** (ภัทรชัย, 2549)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง (Gram positive bacilli) มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือเรียงตัวเป็นสาย บางสายพันธุ์สามารถสร้างแคปซูลได้ เป็นพวกต้องการอากาศอย่างแท้จริง (Obligate aerobe) สามารถสร้างเอนโดสปอร์ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี พบได้ทั่วไปในดิน เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดเมือกบนขนมปัง บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคปอดบวมชนิดรุนแรง ภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด โรคลิ้นหัวใจอักเสบ และการติดเชื้อของบาดแผลผ่าตัด



รูปที่ 3 *Bacillus subtilis*

(ที่มา : http://en.wikibooks.org/wiki/Image:Bacillus_subtilis.jpg)

2.4.4 ***Candida albicans***

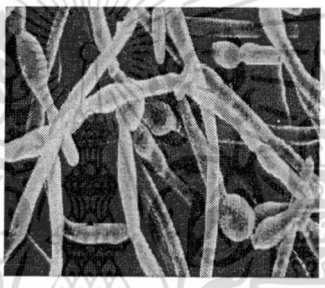
เป็นเชื้อที่พบประมาณ 40-80 เปอร์เซนต์ ในคนปกติเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) บริเวณเยื่อบุปาก ทางเดินอาหารและช่องคลอดในรูปของเซลล์ยีสต์ โดยตัวเชื้อจะมีหลายรูปร่าง (Dimorphic fungus) มีทั้งเซลล์ยีสต์ (Yeast form) และเส้นสาย (Mycelial form) รูปร่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ของยีสต์กลมหรือรูปไข่ ขนาด 5-7 ไมโครเมตร เมื่อมีปัจจัยส่งเสริมที่เหมาะสม จึงจะทำให้เกิดโรคขึ้น โรคที่รู้จักกันดีคือ Candidiasis ปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดโรคจากเชื้อ *Candida* มีสาเหตุมาจาก

1. ภาวะกดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppression) หรือ โรคเอดส์ (AIDS)

2. มีจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) ลดลง เนื่องจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะและสเตอรอยด์ เป็นเวลานาน (ซามีมี, 2549)



รูปที่ 4 *Candida albicans*

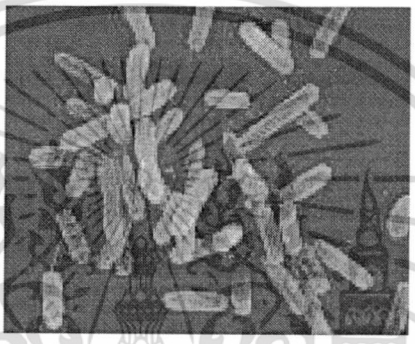
(ที่มา : http://www.humanillnesses.com/original/U-Z/Yeast-Infection-Vaginal.html)

2.4.5 *Pseudomonas aeruginosa* (ภัทรชัย, 2549)

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (Gram negative bacilli) มักพบเป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์สามารสร้างแคปซูลได้ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่ส่วนปลายเซลล์ 1 เส้น (polar flagella) บางสปีชีส์สามารถสร้างเม็ดสี โดย *Ps. aeruginosa* สามารถสร้างเม็ดสีได้ 4 ชนิด ที่พบได้บ่อยคือ ไพโอไซยานิน (Pyocyanin) หรือ ฟีนาซีน (Phenazine) มีสีเขียวน้ำเงิน และไพโอเวอดิน (Pyoverdin) หรือ ฟลูออเรสซีน (Fluorescein) มีสีเขียวสะท้อนแสง ทำให้หนองที่เกิดจากการติดเชื้อมีสีเหลืองเขียว การติดเชื้อมักไม่พบในคนที่มีสุขภาพแข็งแรงทั่วไป แต่มักก่อให้เกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง และเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล เชื้อมักเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลที่ผิวหนังหรือเยื่อเมือกบุผิว หรือตำแหน่งที่มีให้สารน้ำทางหลอดเลือดและสายสวนปัสสาวะ ซึ่งเชื้อสามารถลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดทำให้เกิดการติดเชื้อได้ในหลายระบบ ได้แก่ การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ซึ่งมักพบในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทำให้เกิดโรคปอดบวมชนิดรุนแรงที่มีเนื้อเยื่อเน่าตาย (Necrotizing pneumonia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia) การอักเสบติดเชื้อของกระจกตา ทำให้เกิดแผลที่กระจกตา (Corneal ulcer) หรือเกิดการอักเสบของลูกตา (Endophthalmitis) การติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งอาจทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบและฝีในสมอง เชื้อ *Ps. aeruginosa* ยังเป็นสาเหตุก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญในผู้ป่วยเอดส์ โดยเฉพาะการติดเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างแคปซูล ซึ่งทำให้การกำจัดเชื้อทำได้ยากและเกิดการติดเชื้อเรื้อรังได้



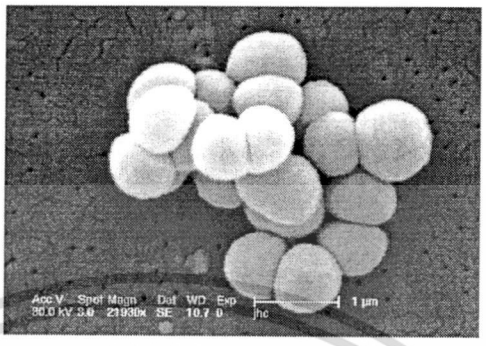
รูปที่ 5 *Pseudomonas aeruginosa*

(ที่มา : http//www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp)

2.4.6 *Micrococcus luteus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม มี 4 เซลล์ เรียกว่า tetrad เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศแท้จริง (Obligate aerobe) เป็นเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนังและเยื่อเมือกบุผิว เป็นเชื้อปนเปื้อนในสิ่งส่งตรวจ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง สามารถก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาท และการติดเชื้อในกระแสเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 *Micrococcus luteus*

(ที่มา : http://cellbiology.med.unsw.edu.au/.../lecture0802.htm)

พืชที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

ต้องติ่ง

เป็นพรรณไม้ล้มลุก ตามลำต้นจะมีขนอ่อน ๆ ขึ้นปกคลุมอยู่เล็กน้อย ลำต้นสูงประมาณ 20-30 เซนติเมตร ออกใบเดี่ยว เรียงกันเป็นคู่ ๆ ไปตามข้อต้น ลักษณะของใบเป็นรูปมนรี ปลายใบมน โคนใบแหลม ขอบใบเรียบไม่มีจัก แต่อาจจะเป็นคลื่นเล็กน้อย ขนาดของใบกว้างประมาณ 1-1.5 นิ้วยาว 2.5-3 นิ้ว มีสีเขียว ลักษณะของดอกเป็นรูปกรวยปลายดอกแยกออกเป็น 5 กลีบ ออกเป็นช่อ หรือบางทีก็ออกดอกเดี่ยว ตามง่ามใบที่ส่วนยอดของต้น มีสีม่วง ฝักเป็นฝักยาว ซึ่งยาวประมาณ 1 เมื่อถ้าได้รับความชื้นมาก ๆ หรือถูกน้ำ ผลนี้จะแตกออกเป็น 2 ซีก ภายในมีเมล็ดอยู่ 8 เมล็ด มีสรรพคุณทางยาคือ รากใช้ดับพิษ ปัสสาวะพิการและแก้พิษต่าง ๆ ใบ เมล็ดแก้แผลเป็นหนอง แผลเปื่อย ดูดหนอง ให้แผลหายเร็ว สมานบาดแผลเก่าและใหม่ ดูดหนองได้ดี (ที่มา: http://www.arunsawat.com/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บต้นต้อยติ่ง ตามธรรมชาติโดยเก็บตัวอย่างราก ลำต้น และใบ ของพืชที่โตเต็มที่แล้วมาล้างด้วยน้ำสะอาด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงขั้นตอนการแยกเชื้อ

2. การแยกเชื้อ

2.1 ทำการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของใบ ลำต้น รากของพืช

2.2 บดใบ ลำต้น รากของพืชนำน้ำมาทำให้กระจาย (spread plate) ลงบนอาหารแข็งสตาร์ช เคซีน (starch casein agar) และอาหารแข็งฮิวมิก แอซิด วิตามิน (humic acid vitamin agar) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-30 วัน

2.3 คัดเลือกโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแอคติโนมัยสีท ทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยการขีดเชื้อ (steak) ลงบนอาหารแข็งยีสต์สกัดและมอลต์สกัด (yeast extract-malt extract agar)

3. การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

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

4. การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ

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

5. การสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมักเชื้อ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเลี้ยงเชื้อใน Yeast extract – Malt extract broth บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำน้ำหมักเชื้อมาทำการ partition กับตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซีเตต แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน และนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี agar diffusion Lorian, 1980) วิธีการทดสอบมีขั้นตอนดังนี้ คือ เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดเดียวกับในข้อ 16.3 นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำ disk ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาณ 20 μL/disc (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบอยู่และทำชุดควบคุมเชิงลบโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายสารสกัดและชุดควบคุมเชิงบวกโดยใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

7. การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีท

7.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญ

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlied, 1966) ตรวจผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งการทดลองนี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อและบ่งบอกลักษณะของเชื้อคร่าวๆได้

7.2 การตรวจสอบลักษณะทางจีโนไทป์ โดยการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rRNA gene และวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

นำ DNA ที่แยกได้ มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rDNA โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และalignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้ BLAST program และ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

130282

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างต้นต้อยติ่ง พบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดลักษณะของตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้แต่ละไอโซเลต

ชนิดของตัวอย่างต้นต้อยติ่ง	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ใบ	LR1	LR1-1, LR1-2, LR1-3
ลำต้น	TR2	TR2-1, TR2-2, TR2-3, TR2-4, TR2-5, TR2-6, TR2-7
ราก	RR3	RR3-1, RR3-2, RR3-3, RR3-4, RR3-5, RR3-6, RR3-7, RR3-8, RR3-9, RR3-10

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท

ในจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมด 20 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

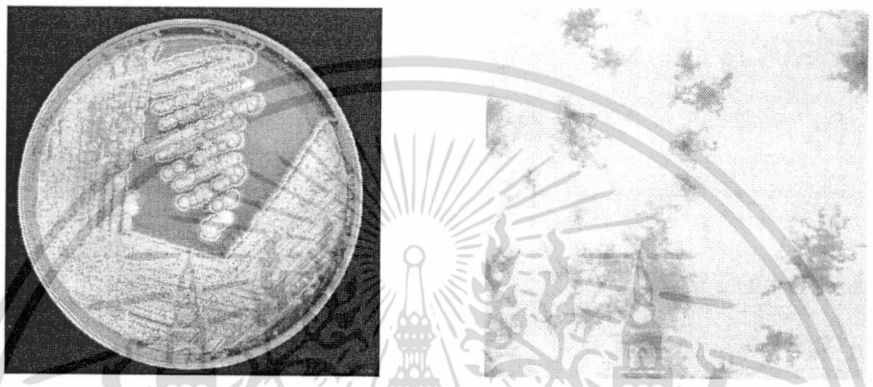
กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีในอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) สามารถสร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา มีการสร้างรงควัตถุเป็นสีเหลืองอ่อน สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเกลียว (รูปที่ 7) มีสมาชิก 16 ไอโซเลต ได้แก่ RR3-1, RR3-2, RR3-3, RR3-4, RR3-5, RR3-6, RR3-7, RR3-8, RR3-9, RR3-10, LR1-1, LR1-2, LR1-3, TR2-5, TR2-6, TR2-7

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนในนม เจลาติน และแป้งได้ รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (ตารางที่ 3 และ4)

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อตัวแทนกลุ่ม พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces cyaneus* NRRL B-2296^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ99.7 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ การทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ86 (รูปที่ 9)



ก ข

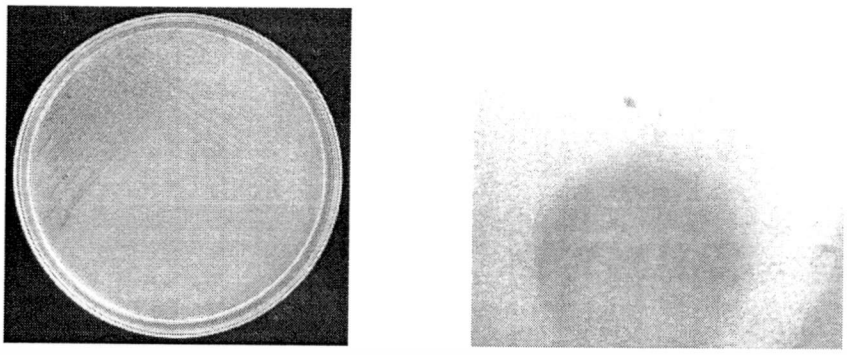
รูปที่ 7. แสดงลักษณะของโคโลนี (ก) และสปอร์ (ข) ของเชื้อแอคติโนมัยสีท กลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมน้ำตาล ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสีเหลือง และสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหาร (รูปที่ 9) มีสมาชิก 4 ไอโซเลต ได้แก่ TR2-1, TR2-2, TR2-3, TR2-4

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 2 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เจลาติน และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่สามารถย่อยแป้งได้เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้ทุกไอโซเลตผลิตสารทุติยภูมิที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด (ตารางที่ 3 และ 4)

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อตัวแทนกลุ่ม พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora krabiensis*^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ99.9 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 99 (รูปที่ 10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



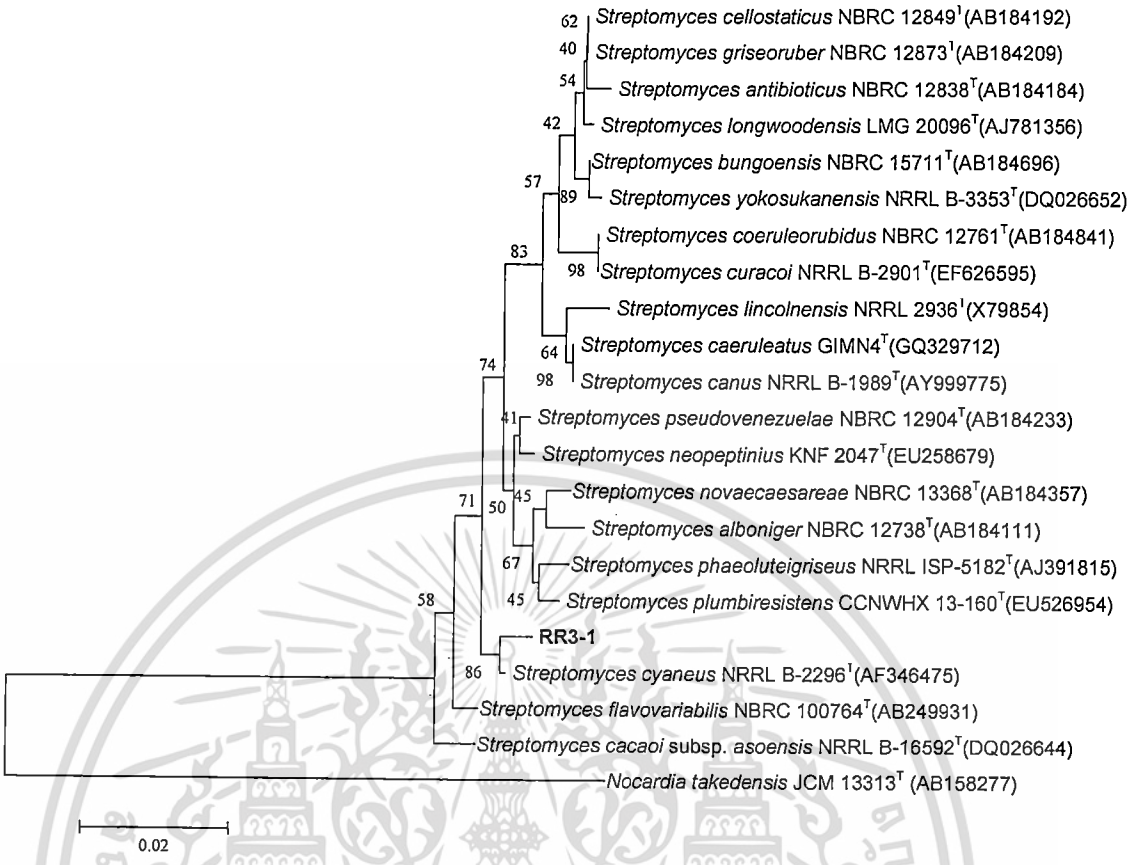
รูปที่ 8. แสดงลักษณะของโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 2

4.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีทของตัวแทนในแต่ละกลุ่ม

ได้ทำการสกัดน้ำหมักเชื้อจากเชื้อตัวแทนในแต่ละกลุ่มด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซีเตต ผลที่ได้พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซีเตตของเชื้อกลุ่มที่ 1 แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัดหยาบในทุกชั้นของเชื้อในกลุ่มที่ 2 ไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด

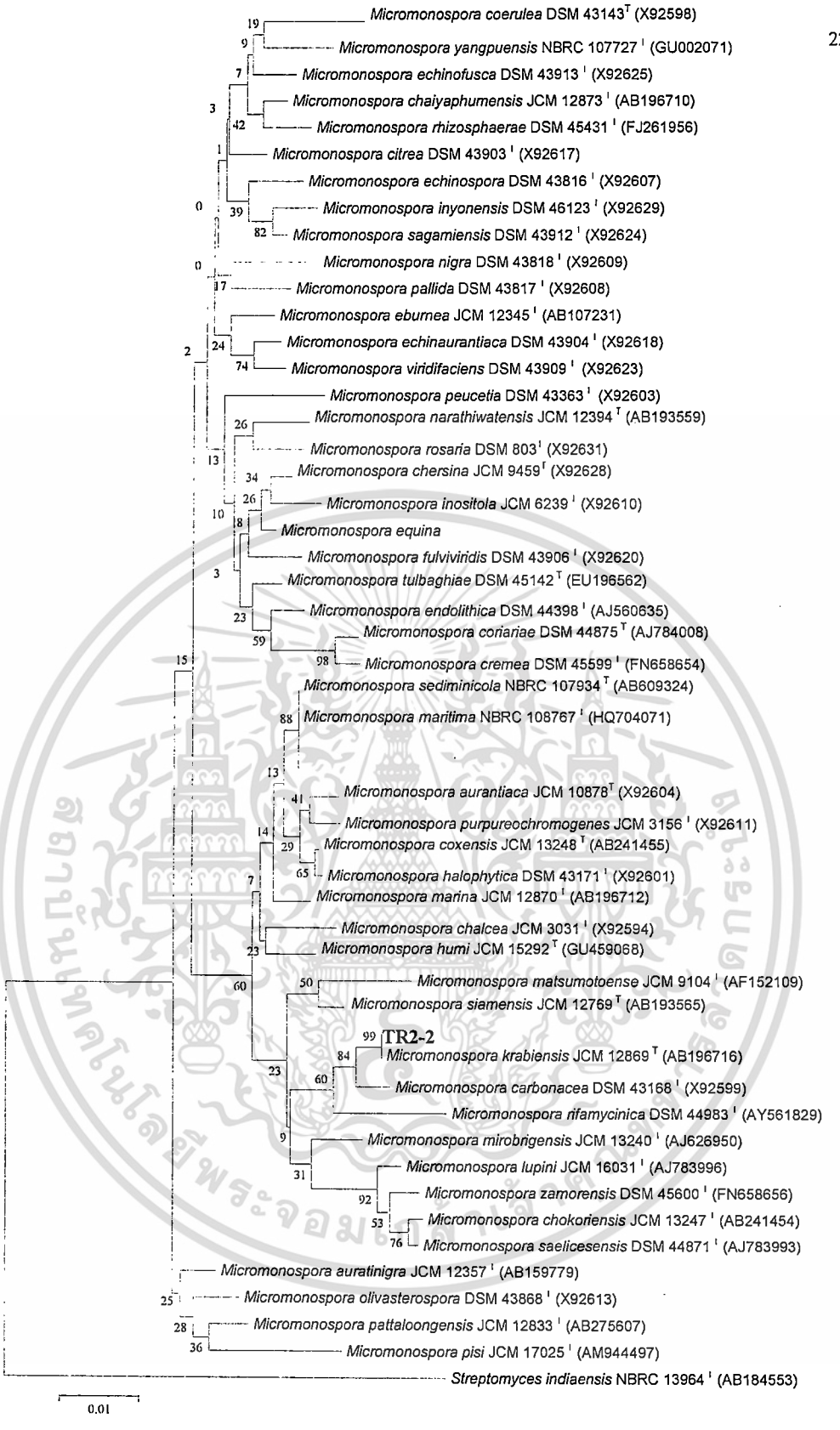
จากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ทั้ง 20 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นพบว่ามี 16 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มที่ 1 ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี โดยพบว่าสารสกัดหยาบในชั้นของเอทิลอะซีเตตแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* *B. subtilis* *MRSA* และ *M. luteus* ดังแสดงในตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงตำแหน่งของเชื้อ RR3-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 แสดงตำแหน่งของเชื้อ TR2-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP 2

กลุ่มที่	ไอโซเลต	การเจริญ[a]	สีของโคโลนีด้านบน[b]	สีของโคโลนีด้านล่าง[c]	รงควัตถุ[d]	สปอร์
1	LR1-1	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	LR1-2	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	LR1-3	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	TR2-5	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	TR2-6	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	TR2-7	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-1	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-2	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-3	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-4	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-5	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-6	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-7	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-8	ดี	สีเทาอมขาว	สีเทา	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-9	ปานกลาง	สีเทาอมขาว	สีเทาเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว
	RR3-10	ปานกลาง	สีเทาอมขาว	สีเทาเข้ม	เหลือง	โซ่ยาวขดเป็นเกลียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท (ต่อ)

กลุ่มที่	ไอโซเลต	การเจริญ[a]	สีของโคโลนีด้านบน[b]	สีของโคโลนีด้านล่าง[c]	รงควัตถุ[d]	สปอร์
2	TR2-1	ดีมาก	ส้ม	สีส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์เดี่ยว
	TR2-2	ดีมาก	ส้ม	สีส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์เดี่ยว
	TR2-3	ดีมาก	ส้ม	สีส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์เดี่ยว
	TR2-4	ดีมาก	ส้ม	สีส้มเข้ม	เหลือง	สปอร์เดี่ยว

หมายเหตุ **a** = การเจริญบนอาหารต่างๆ โดยรวม

b = สีโคโลนีด้านบนของเชื้อในอาหารต่างๆ โดยรวม

c = สีโคโลนีด้านล่างของเชื้อในอาหารต่างๆ โดยรวม

d = สีรงควัตถุที่ละลายน้ำในอาหารต่างๆ โดยรวม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีท

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (° C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*B.subtilis*	*M.luteus*	*S.aureus*	*E.coli*	*MRSA*	*C.albicans*
1	LR1-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	LR1-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	LR1-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	TR2-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	TR2-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	TR2-7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	RR3-10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีท (ต่อ)

กลุ่มที่	รหัสเชื้อ	ความเข้มข้นของเกลือ(%)							พีเอช					อุณหภูมิ (° C)					Skim milk		Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Antimicrobial activities					
		1.5	2	3	4	5	6	7	4	4.5	5	6	9	20	37	40	45	50	Peptonization	Coagulation				*B.subtilis*	*M.luteus*	*S.aureus*	*E.coli*	*Ps.aeruginosa*	*C.albicans*
2	TR2-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	TR2-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	TR2-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	TR2-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 5 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ โดยวิธี Agar disc diffusion

เชื้อกลุ่มที่	สารสกัดหยาบ (50 มก/มล)	บริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone, mm*)					
		Bacillus subtilis	*Micrococcus luteus*	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*MRSA*	*Candida albicans*
1	เอธิลอะซีเตต (EtOAc)	25	32	28	-	22	-
2	เอธิลอะซีเตต (EtOAc)	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ *** รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ (เส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ = 6 มิลลิเมตร)**
ขนาดของบริเวณการยับยั้งตั้งแต่ 10 มิลลิเมตรขึ้นไป ถือว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างเนื้อเยื่อต้นต้อยติ่ง สามารถทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต และได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้นั้นสามารถเจริญได้ดีในอาหาร Yeast extract - Malt extract agar และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ในโทนสีขาวอมเทา สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในโทนสีเทา และส้ม ลักษณะของสปอร์ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของภาพ 1,000 เท่า มีลักษณะขดเป็นเกลียวเป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือลักษณะเป็นสปอร์เดี่ยว ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีเทาอมขาว มีการสร้างเส้นใยอากาศสีเทา มีการสร้างรงควัตถุเป็นสีเหลือง สร้างสปอร์สายยาวต่อกันเป็นเกลียว เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อตัวแทนกลุ่ม พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces cyaneus* NRRL B-2296^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ99.7

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีส้มอมน้ำตาล ไม่สร้างเส้นใยอากาศ ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ และสปอร์เป็นสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อตัวแทนกลุ่ม พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora krabiensis*^{T} มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ99.9

ในการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าร้อยละ 80 ของเชื้อแอคติโนมัยสีททั้งหมดมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารสกัดหยาบที่ได้นี้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดยสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 1 เท่านั้น ที่แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 3 ชนิด คือ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ methicillin resistant *Staphylococcus aureus (MRSA)* ในขณะที่สารสกัดหยาบทุกชั้นของเชื้อแอคติโนมัยสีทกลุ่มที่ 2 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบใดๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. จากการวิจัยครั้งนี้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี จึงควรมีการวิจัยต่อเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ถึงระดับสกุลและสปีชีส์
2. สารทุติยภูมิที่เชื้อแอคติโนมัยสีทเหล่านี้สร้างมีความน่าสนใจมาก เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ค่อนข้างดี จึงควรทำการวิจัยต่อในเชิงการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารทุติยภูมิที่เชื้อสร้างขึ้น เพื่องานวิจัยที่สมบูรณ์ต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Bérdy, J. 2005. "Bioactive microbial metabolites." **Journal of Antibiotics.** 58 : 1-26.

Bieber, B., J. Nuske, M. Ritzau, and U. Grafe. 1998. Alnumycin, a new naphthoquinone antibiotic, produced by an endophytic *Streptomyces* sp. **J. Antibiot.** 51 : 381–382.

Caffrey, P. 2003. Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. **Chembiochem.** 4 : 654–657.

Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Albert, H. and Robison, R. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology.** 148 : 2675–2685.

Dimarco, A., G. Cassinelli and F. Arcamone. 1981. The discovery of duanorubicin. **Cancer Treatment Rep.** 65: 3-8.

Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Ara, I., Matsumoto, A. and Takahashi. Y. 2008. *Kineococcus gynurae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58 : 2439–2442.

Gu, Q., Luo, H.L., Zheng, W., Liu, Z.H. and Huang, Y. 2006. *Pseudonocardia oroxyli* sp. nov., isolated from *Oroxylum indicum* root. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56 : 2193–2197.

Hazen, E.L. and R. Brown. 1951. Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. **Proc. Soc. Exp. Biol.** 76 : 93.

Hopwood, D.A. and Sherman, D.H. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. **Annu Rev Genet.** 24 : 37–66.

Igarashi, Y., Trujillo, M.E., Martínez-Molina, E., Miyanaga, S., Obata, T., Sakurai, H., Saiki, I., Fujita, T. and Furumai, T. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 17 : 3702–3705.

Ikeda, H., T. Nonomiya, M. Usami, T. Ohta and S. Omura. 1999. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 96: 9509-9514.

Melino, M.R. and N.H. Sigal. 1990. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. **J. Immunol.** 144: 251-258.

Simpson, T.J. 1995. Polyketide biosynthesis. **Chem. Ind.** 11: 407-411.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weber, J.M., C.K. Wierman and C.R. Hutchinson. 1985. Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythraea*. J. **Bacteriol**. 164: 425-433.

Zhao, K., Penttinen, P., Guan, T., Xiao, J., Chen, Q., Xu, J., Lindstrom, Km., Zhang, L., Zhang, X., Strobel, G.A. 2011. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. **Curr Microbiol.** 62 : 182–190.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้