รายงานการวิจัย
เรื่อง
การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ

ชนิกานต์ คุ้มนก

วท.ม. (ชีววิทยา)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

2544

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

งานวิจัยนี้

ได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

ประจำปีงบประมาณ 2543

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่องการแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ ฉบับนี้สำเร็จลงได้โดยได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ 2543 ผู้วิจัยขอกราบขอพระคุณอธิการบดี และผู้อำนวยการสำนักวิจัยและบริการวิชาการ ที่กรุณาให้งบประมาณสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ และศูนย์วิทยาศาสตร์ฯ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก ที่สนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณคุณกมลภรณ์ บุญถาวร และคุณคงศักดิ์ ดีธงทอง เจ้าหน้าที่ปฏิบัติการประจำห้องวิจัยที่อำนวยความสะดวกตลอดในการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณอาจารย์ศุลิเชษฐ์ ทองกล่ำ ที่ช่วยทำให้เกิดภาพสวย ๆ ในรายงานวิจัยฉบับนี้ และขอขอบคุณอาจารย์อรรถพล นาขวา ที่เป็นกำลังใจและประสานงานตลอดการทำงาน จนงานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลงไม่ได้เลยถ้าไม่ได้ความร่วมมือจากนางสาวรจนา ทองโพธิ์เลน และนางสาวอุมา โพธิ์ปี ที่เอาใจใส่และทุ่มแรงกายแรงใจในการทำวิจัย รวมทั้งนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์/40 เพื่อนอาจารย์ และทุกท่านที่มีส่วนสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยที่ไม่ได้กล่าวนาม ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ชนิกานต์ คุ้มนก

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

หัวข้อวิจัย	การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ
ผู้วิจัย	ชนิกานต์ คุ้มนก
สาขาที่ทำวิจัย	เกษตรศาสตร์และชีววิทยา
ปีที่ทำวิจัย	2543

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน 24 ตัวอย่างจากดิน 8 แหล่งในสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จ.พิษณุโลก ได้แอคติโนมัยซีท 286 ไอโซเลท จากทดสอบหาสารปฏิชีวนะด้วยวิธี paper disc diffusion โดยตรวจผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* พบว่ามีแอคติโนมัยซีทจำนวน 27 ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ โดยที่ *Streptomyces* sp.R7-17 มีความกว้างของวงใสมากที่สุดเท่ากับ 18 มิลลิเมตร และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มีค่าเท่ากับ 1/128 dilution unit/ml.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

Reserch Title	Isolation and Selection of Antibiotic Producing Actinomycetes
Author	Mrs. Chanikarn Koomnok
Field	Agriculture and Biology
Year	1998

Abstract

A total of 286 actinomycetes were isolated from soil samples were collected from 8 different areas of Rajabhat Institute Pibulsongkram, Phitsanulok province. The determination of antibiotics production from the isolated actinomycete strain was carried out by paper disc diffusion method. It was found that 27 actinomycete isolates were capable of producing antibiotics against *S. aureus*. *Streptomyces* sp.R7-17 gave the highest clear zone for 18 millimeters, and the minimal inhibitory concentration was 11128 dilution unit/ml.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
บทที่ 4 ผลการวิจัย	26
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	36
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	39
ข้อเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม	41
ภาคผนวก	42
ประวัติผู้วิจัย	58

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารปฏิชีวนะที่ยังคงใช้ในปัจจุบันที่ผลิตโดยจุลินทรีย์	9
2	แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินแหล่งต่าง ๆ ในสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก	26
3	ผลของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*	28
4	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*	31
5	คุณสมบัติที่ใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยซีทในระดับจีนัส	49
6	คุณสมบัติของ *Streptomyces* sp.	57

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการสร้างเส้นใยของ *Streptomyces* sp.	12
2	ระยะที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบ batch culture	14
3	ลักษณะการเจริญของแอคติโนมัยซีททั้ง 27 ไอโซเลต ในอาหาร GSM	29
4	การยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต R7-17	30
5	ผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*	32
6	ลักษณะการเจริญของไอโซเลต R7 – 17 ที่เจริญบนอาหาร NA เมื่อบ่มเพาะที่ 30^{0}C เวลา 14 วัน	33
7	ลักษณะเส้นใยของแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต R7-17	34
8	ลักษณะของแอคติโนมัยซีทกลุ่ม 20	52
9	ลักษณะของแอคติโนมัยซีทกลุ่ม 22	53
10	ลักษณะของแอคติโนมัยซีทกลุ่ม 23 24 และ 25	54
11	ลักษณะของแอคติโนมัยซีทกลุ่ม 26	55
12	ลักษณะของแอคติโนมัยซีทกลุ่ม 27 28 และ 29	57

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 1

บทนำ

สารปฏิชีวนะ เป็นสารอินทรีย์ที่สร้างมาจากจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาโบลิซึมขั้นที่สอง เป็นสารที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ สารปฏิชีวนะนี้มักจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จะสร้างขึ้นในช่วงท้าย ๆ ของการเจริญที่เรียกว่าระยะ late log phase อันเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มหยุดการเจริญหรือมีการเจริญคงที่

จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้นั้นมีไม่มากนัก แอคติโนมัยซีท เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุด เพราะสามารถสังเคราะห์สารประกอบที่ต่อต้านจุลินทรีย์ได้มากมาย ในแง่ที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน กลไกการทำงานต่างกัน มีผลต่อต้านจุลินทรีย์ในระดับต่าง ๆ กัน แอคติโนมัยซีท สามารถพบได้ทั่วไป เช่น ในดิน น้ำ อากาศ วัตถุเน่าเปื่อย ป่าชายเลน ใต้ทะเล เป็นต้น ซึ่งบริเวณที่พบมักจะมีการสะสมสารอินทรีย์สูง

สารปฏิชีวนะแม้จะสามารถใช้ยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อใช้รักษาโรคต่าง ๆ แต่ปัจจุบันกลับพบว่ามีจุลินทรีย์ดื้อยาเกิดขึ้น ซึ่งเป็นการดื้อยาที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่เคยไวต่อยา ทำให้การรักษาไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาและวิจัยหาสารปฏิชีวนะตัวใหม่ หรือชนิดใหม่ ๆ ที่ดีกว่าเดิมขึ้นมาแทน

การค้นหาแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะนั้นสามารถทำได้โดยการแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด แหล่งที่เหมาะสมในการค้นหาคือดิน เนื่องจากสสารต่าง ๆ ที่ตกลงสู่ดินแล้วมีการย่อยสลายและถูกทำลายเปลี่ยนแปลงโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน และดินที่จะแยกเชื้อนั้นควรเป็นดินจากแหล่งใหม่ที่ไม่เคยมีใครศึกษามาก่อน

ดังนั้นในการทำวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการแยกแอคติโนมัยซีทจากดินหลายๆ แหล่งในจังหวัดพิษณุโลกและทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ แล้วจึงทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้สูง ซึ่งเชื่อว่าน่าจะนำไปสู่การค้นพบสารที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ และในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินในจังหวัดพิษณุโลก
2. เพื่อศึกษาความสามารถของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ
3. เพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นจากแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือก
4. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือก

ผลประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้เชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินในจังหวัดพิษณุโลกที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ
2. ได้สารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*
3. ทราบความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกไว้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*
4. ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีท

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารปฏิชีวนะ (Antibiotics)

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารประกอบที่ผลิตหรือสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจเป็น แบคทีเรีย เชื้อรา หรือแอคติโนมัยซีท สารที่ผลิตขึ้นได้นี้สามารถไปยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของจุลชีพกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง หรือไปมีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์กลุ่มนั้น ๆ ได้โดยใช้ในปริมาณน้อย ดังนั้นยาปฏิชีวนะเป็นยาที่จัดอยู่ในกลุ่มยาต้านจุลชีพที่แยกได้จากจุลชีพนั่นเอง (มาลิน, 2540) ปัจจุบันจะรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ (ยากึ่งสังเคราะห์ หมายถึง สารที่ใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีร่วมกับวิธีผลิตตามธรรมชาติ) ที่ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นต้นแบบด้วย (ดวงพร, 2530)

สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเป็นสารเมตาโบไลท์ขั้นที่สอง (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารเมตาโบไลท์ที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญ แต่ถ้ามีอาจก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเซลล์ที่ผลิต ส่วนใหญ่จะสร้างในช่วง late log phase จนถึงช่วง stationary phase อันเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มมีการเจริญคงที่ สารปฏิชีวนะที่ถูกผลิตขึ้นในช่วงนี้มีประโยชน์เพราะยับยั้งการสร้างสารโมเลกุลใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้ อันจะช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงไปได้ จึงช่วยยืดชีวิตของจุลินทรีย์ให้อยู่นานขึ้น

สารปฏิชีวนะแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ (สายสมร, 2524)

1. Bacteriocidal antibiotics เป็นสารพวกที่ฆ่าหรือทำให้เกิดการแตกสลายของแบคทีเรียที่เข้าทำลาย เช่น penicilin

2. Bacteriostatic antibiotics เป็นพวกที่ยับยั้งการเจริญและการแบ่งตัวของแบคทีเรีย เช่น chloramphenicol

การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบัน สามารถจำแนกได้หลายแบบ และเพื่อสะดวกแก่การศึกษาหรือเลือกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อต่าง ๆ สามารถจำแนกได้ คือ

1. การจัดจำแนกตามลักษณะโครงสร้าง (Tortora et al ,1992 และ Alcamo,1994)

1.1 **Penicillin** โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 2 ส่วน คือ thiazolidine ring และ betalactam ring ทำปฏิกิริยารวมกันเป็น nucleus ของ penicillin เรียกว่า 6-aminopenicillanic acid (6-APA) ชนิดของ penicillin จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับตำแหน่ง side chain ของ betalactam เช่น

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ถ้าตำแหน่ง side chain เป็น benzyl group มีชื่อเรียกว่า penicillin G. ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ penicillin V, penicillin F เป็นต้น

1.2 Caphalosporin มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานคล้ายกับ penicillin ต่างกันที่ cephalosporin มี dihydrothiazine ring แทน thiazolidine ring เมื่อรวมกับ beta-lactam ได้เป็น nucleus ของ cephalosporin เรียกว่า 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ได้แก่ cephalothin, cefamandole และ cefataxime

1.3 Aminoglycoside โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย amino sugar เชื่อมต่อด้วย glycosidic band ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ streptomycin, neomycin และ gentamycin

1.4 Tetracycline มีโครงสร้างพื้นฐานที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันด้วย benzene ring 4 ring เป็น hydronapthacene nucleus สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ minocycline, oxytetracycline และ chlortetracycline

1.5 Chloramphenicol มีโครงสร้างพื้นฐานแบบ nitrobenzene

1.6 Macrolides โครงสร้างพื้นฐานเป็นแบบ macrocyclic lactone ring มี lactone เชื่อมต่อกับน้ำตาล หรืออัลกอฮอล์ มี carbon atom มากกว่า 20 ตัวขึ้นไป ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ ได้แก่ erythromycin, clarithromycin และ azithromycin

1.7 Polypeptide มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย amino acid เชื่อมต่อกันด้วย peptide bond ตัวอย่างสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ได้แก่ bacitracin และ polymyxin B

1.8 Vancomycin เป็นกลุ่มสารปฏิชีวนะที่มีโมเลกุลใหญ่มาก มีมวลโมเลกุลประมาณ 3,500 ประกอบด้วย น้ำตาล และ amino acid ที่ไม่ทราบสูตรโครงสร้างแน่นอน

1.9 Polyene กลุ่มสารปฏิชีวนะที่มี polyene เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น nystatin และ amphotericin

1.10 Rifamycin มีโครงสร้างพื้นฐาน ประกอบด้วย aromatic ring เชื่อมต่อกันด้วย aliphatic bridge มีอนุพันธ์ คือ rifampin

1.11 Griseofulvin มีโครงสร้างเป็นแบบ spirocyclic structure

1.12 Lincomycin มีโครงสร้างประกอบด้วย amino acid เชื่อมต่อกับ amino sugarที่เชื่อมต่อกับซัลเฟอร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา Songkhla Rajabhat University

2. การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะตามขอบเขตในการทำลาย (ดวงพร,2530)

ในการนำสารปฏิชีวนะมาใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องทราบถึงฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 พวก คือ

2.1 Broad-spectrum antibiotics An สารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายแบคทีเรียกรัมบวกรูปร่างกลม แบคทีเรียกรัมลบ เชื้อราและยีสต์ เช่น chloramphenicol และ tetracyclines

2.2 Intermediate-spectrumantibiotics คือ การปฏิชีวนะทีสามารถทำลายแบคทีเรียกรัมบวก รูปร่างกลม แบคทีเรียกรัมลบ และกลุ่ม mycobacteria เช่น streptomycin, gentamycin, kanamycin และ neomycin

2.3 Narrow-spectrum antibiotics คือสารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายจุลินทรีย์พวกใดพวกหนึ่ง โดยอาจทำลายเฉพาะแบคทีเรียกรัมบวก หรือกรัมลบ เช่น penicillin G, erythromycin และ lincomycin

3. การจัดจำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of Action or mode of Action)

การออกฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะ สามารถพบได้ 2 แบบ คือ สารปฏิชีวนะที่มีผลในการฆ่าเชื้อได้โดยตรง (bacteriocidal) และที่มีผลในการยับยั้งการเจริญโดยจุลินทรีย์ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ (bacteriostatic) (Tortora et al.,1992) สารปฏิชีวนะแต่ละกลุ่มมีความสามารถในการทำลายเชื้อของจุลินทรีย์ได้ต่างกัน ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ด้วยกันคือ

3.1 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย macromolecular net work ที่เรียกว่า peptidoglycan ซึ่งสารดังกล่าวพบเฉพาะที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น โดยสารปฏิชีวนะมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลังเจริญ เช่น penicillin และ cephalosporin จะป้องกันการเกิด crosslink ของ peptidoglycan ในขณะที่ bacitracin และ vancomycin ยับยั้งการทำงานของ peptidoglycan synthetase ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง peptidoglycan backbone ของผนังเซลล์ ดังนั้นเมื่อโครงสร้างของผนังเซลล์มีความอ่อนแอไม่สมบูรณ์ เซลล์จึงถูกย่อยสลายได้ในที่สุด สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ host น้อยมาก โดยเฉพาะมนุษย์ เนื่องจากเซลล์ของมนุษย์ไม่มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย peptidoglycan

3.2 ออกฤทธิ์ทำลาย plasma membrane

สารปฏิชีวนะในกลุ่ม polypeptide ทำให้ความสามารถในการนำสารเข้าของ plasma membrane เปลี่ยนแปลง เช่น polymyxins, colistin, nystatin, amphotericin B และ

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี Rajabhat University

streptomycin ทำให้คุณสมบัติที่เป็น selective permeability เสียไปหรือทำให้เกิดการรั่วไหลของสารออกจากเซลล์ หรือคุณสมบัติการเป็น osmotic barrier เสียไป

3.3 ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั้งพวก procaryote และ eucaryote พบว่าไรโบโซมจะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนใน procaryote ไรโบโซมเป็นชนิด 70s ไรโบโซมประกอบด้วยหน่วยย่อยสองหน่วยคือ 50s และ 30s unit สารปฏิชีวนะชนิด chloramphenicol ออกฤทธิ์ที่ตำแหน่ง 50s คือยับยั้งการสร้าง peptide bond ของสาย polypeptide erythomycin ออกฤทธิ์บริเวณ 50s ของ 70s ribosome เช่นเดียวกัน โดยป้องกันการเกิด translocation – movement ของ mRNA tetracycline ยับยั้งการรวมกันของ tRNA ที่มี amio acid กับ ribosome ป้องกันการต่อกันของ amio acid เพื่อเป็นสายโซ่ polypeptide สารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycoside เช่น gentamycin และ streptomycin จะทำให้รูปร่างของ 30s ของ 70s ribosome เปลี่ยนแปลง ทำให้การอ่านรหัสของยีนบน mRNA ไม่ถูกต้องมีผลในการสังเคราะห์โปรตีนผิดปกติ

3.4 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ nucleic acid

สารปฏิชีวนะที่มีผลต่อขบวนการ metabolism ของ nucleic acid ในการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าบางชนิด เช่น antiviral idoxuridine มีข้อจำกัดในการใช้สูง เนื่องจากสารดังกล่าวมีผลต่อการสังเคราะห์ DNA และ RNA ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วน rifamycin, nalidixic acid และ trimethoprim เป็นสารปฏิชีวนะที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเลือกออกฤทธิ์ทำลาย

3.5 ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร metabolites

สารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร metabolites ที่จำเป็นสำหรับ จุลินทรีย์ เช่น sulfonamides, trimethoprim และ isoniazid สารปฏิชีวนะ ส่วนใหญ่มักมีกลไกการออกฤทธิ์ขัดขวาง โดยการแก่งแย่งที่กัน (competitive inhibition) โดยอาศัยสูตรโครงสร้างที่คล้ายกัน เช่น sulfonamides มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ para – aminobenzoic acid (PABA) ซึ่งเป็นสารที่เชื้อจำเป็นต้องนำไปใช้ในการสังเคราะห์ folic acid หรือ trimethoprim และ pyrimethamine มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับ pteridine portion ของ dihydrofolate ออกฤทธิ์ขัดขวางเอนไซม์ dihydrofolate reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน dihydrofolic acid ไปเป็น tetrahydrofolic acid

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร Rajabhat University

ประโยชน์ของสารปฏิชีวนะ

นับตั้งแต่มีการค้นพบสารที่มีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะในปี คศ. 1929 และมีการเสนอสารดังกล่าวเป็นยารักษาโรค จนกระทั่งในปี คศ. 1944 ที่มีการผลิต penicillin เป็นการค้าครั้งแรก จุดประสงค์หลักก็เพื่อใช้เป็นยาในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่สอง สารปฏิชีวนะจึงเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในการนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคติดเชื้อในมนุษย์ ต่อมาเมื่อมีการศึกษาค้นคว้ายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมาใช้ พบว่ามีการนำสารปฏิชีวนะเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ด้านอื่นนอกเหนือจากการนำมารักษาโรคในมนุษย์ ได้แก่

ด้านเกษตรกรรม มีการนำสารปฏิชีวนะมาใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เช่น สุกร ลูกวัว และสัตว์ปีก เพื่อส่งเสริมการเจริญและเพื่อรักษาโรคติดเชื้อของสัตว์ (Piddock, 1996) ทางด้านการประมง มีการใช้ streptomycin และ tetracycline ผสมในอาหารให้สัตว์น้ำพวกปลากินเพื่อป้องกันโรคของปลาน้ำจืดอันเนื่องมาจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (พัชรี, 2526) ในการเพาะปลูกมีการนำ streptomycin, tetracycline, griseofulvin และ cycloheximide มาควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะในญี่ปุ่นใช้ blasticdin ป้องกันโรคใบไหม้ของข้าว (ดวงพร, 2530) และใช้ zwittermicin A ในการยับยั้งการเกิดโรค damping – off ของ alfalfa (Stabb *et al.*, 1994) นอกจากใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคพืชแล้ว ยังใช้ป้องกันการเสียของพืชหลังการเก็บเกี่ยว ป้องกันการสร้างสารพิษจากเชื้อรา ใช้ aureofungin ป้องกันการเน่าเสียของผัก ผลไม้ โดยเฉพาะระหว่างขนส่งที่ไม่มีระบบทำความเย็น

ด้านการถนอมอาหาร พบว่ามีการใช้ chlortetracycline ในการยืดอายุของปลาที่แช่น้ำแข็ง ทำให้สามารถเก็บปลาได้นานขึ้น ในกรณีของสัตว์ปีกใช้วัตถุมลงในสารละลาย oxytetracycline ความเข้มข้น 55 ppm. สามารถเก็บได้นานกว่าพวกที่ไม่ได้ใช้สารปฏิชีวนะ 2 – 3 เท่า ในอาหารกระป๋องมีการใช้ nicin, subtilin และ tyrosin ปริมาณ 1 – 20 ppm. เพื่อรักษาสภาพและคุณค่าของอาหาร (ศิวาพร, มปป.) นอกจากนี้ยังมีการนำ nisin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะชนิด peptide มาใช้ในการถนอมอาหาร โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม food – spoilage pathogens (Hansen, 1994)

ด้านการศึกษา มีการใช้สารปฏิชีวนะในการศึกษาปฏิกิริยาทางชีวเคมี และใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จากแหล่งธรรมชาติ เช่นในการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน nu ว่าการเติม tunicamycin และ nalidixic ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HV agar ทำให้สามารถแยกเชื้อได้ง่ายขึ้น (Hayakawa *et al.*, 1991a – b)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

จุลินทรีย์ในดิน (Gottieb, 1976 and Tortora et. al., 1992)

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก สามารถพบแพร่กระจายตามแหล่งต่าง ๆ บนพื้นโลกโดยเฉพาะแบคทีเรียสามารถพบได้มากที่สุด สามารถพบได้ทั้งแถบเยือกแข็ง (Antarctic) บริเวณน้ำพุร้อน บริเวณก้นทะเลที่ลึกสุด บริเวณที่ไม่มีแสง ในแหล่งน้ำที่อิ่มตัวด้วยเกลือเช่น ทะเลสาบ Dead sea และอีกหลาย ๆ บริเวณที่สิ่งมีชีวิตทั่ว ๆ ไปไม่สามารถเจริญๆได้ แต่โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ชอบเจริญในแหล่งธรรมชาติที่ระบบนิเวศน์มีความอุดมสมบูรณ์โดยเฉพาะในดินจะพบจุลินทรีย์เจริญเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้เนื่องจากดินประกอบด้วยสารต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้

แบคทีเรีย เป็นจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุด โดยดินบริเวณผิวหน้า (ลึก 3 – 8 เซนติเมตร) สามารถพบจำนวนเชื้อมากที่สุด และจำนวนจะลดลงตามระดับความลึกของดินที่เพิ่มขึ้น แบคทีเรียในดินมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ โดยย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่และเพิ่มความสมบูรณ์ให้กับดิน โดยแบคทีเรียมีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงธาตุต่าง ๆ เช่น วงจรไนโตรเจน วงจรซัลเฟอร์ และวงจรคาร์บอน นอกจากนั้นแบคทีเรียในดินยังมีบทบาทในการย่อยสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ตกค้างในดิน เช่น ยาฆ่าแมลง และสารกำจัดวัชพืช แบคทีเรียที่พบในดินมีหลายประเภท ได้แก่ Autotroph, Heterotroph พวกที่ต้องการและไม่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ กลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลส กลุ่มAmminofying, Nitrifying และ Denitrifying และกลุ่มรีดิวส์เคลือซัลเฟต ซึ่งกลุ่มที่พบมากที่สุดคือ แอคติโนมัยซีท

จุลินทรีย์ในดินเป็นแหล่งที่มีความสำคัญ ส่วนมากจะใช้เป็นแหล่งศึกษาค้นคว้าหาเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะ จากสมมติฐานของ Waksman และ Dubos ที่กล่าวไว้ในปี 1939 ว่าจุลินทรีย์ในดินน่าจะมีประโยชน์ต่อการค้นคว้าหาสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารปฏิชีวนะ จากความคิดดังกล่าวทำให้มีการศึกษาค้นคว้าจุลินทรีย์ในดินเพื่อหาเชื้อที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ ตั้งแต่ยุคเริ่มต้นที่ค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดแรก การศึกษาจุลินทรีย์ในดินก็ยังมีการศึกษากันอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน

จุลินทรีย์ที่สร้างสารปฏิชีวนะ

ในธรรมชาติมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ฟังไจ แอคติโนมัยซีท หรือจุลินทรีย์อื่น ๆ สารปฏิชีวนะถูกค้นพบเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1877 โดย Loius Pasteur ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคแอนแทร็กจะถูกฆ่าเมื่อมีการปะปนโดยแบคทีเรียบางชนิด ต่อมาในปี ค.ศ. 1917 Greig Smith ได้รายงานว่าแอคติโนมัยซีทหลายชนิดสามารถสร้างสารหลายชนิดที่มีผลต่อต้านแบคทีเรีย ซึ่งจากรายงานดังกล่าวนับเป็นการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

เริ่มต้นสำหรับการค้นคว้าเกี่ยวกับสารที่ได้จากจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจุบันได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลาย ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะที่ยังคงใช้ในปัจจุบันที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	สารปฏิชีวนะ
Gram positive rods	
Bacillus subtilis	Bacitracin
B. polymyxa	Polymycin
Actinomycetes	
Streptomyces nodosus	Amphotericin B
S. venezuelae	Cholamphenicol
S aureofaciens	Chlotetracycline, Tetracycline
S. erythraeus	Erythromycin
S. fradiae	Neomycin
S. noursei	Nystatin
S. griseus	Streptomycin
Micromonospora purpurea	Gentamicin
Fungi	
Cephalosporium	Cephalosporin
Penicillium grisefulvum	Griseofulvin
P. notatum	Penicillin

ที่มา : มรกต และครุณี (2543)

จากคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะจึงทำการจัดจุลินทรีย์ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้ (สายสมร, 2535)

1. กลุ่มแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่แท้จริงซึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ ส่วนใหญ่ผลิตโดยสกุล *Bacillus* เช่น *B. licheniformis* ซึ่งจะสังเคราะห์ bacitracin และ *B. polymyxa* ซึ่งจะสังเคราะห์ polymyxin เป็นต้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิษณุโลก Pibulsongkram Rajabhat University

2. กลุ่มเห็ดรา

เป็นกลุ่มที่มีการผลิตสารปฏิชีวนะประมาณ 20% ของสารปฏิชีวนะและใช้มากในทางการแพทย์ จะพบเฉพาะในดิน เช่น กลุ่มสร้างเส้นใยและสร้างสปอร์ (Aspergillales) สารปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ได้แก่ penicillin, cephalosporin และ fusidic acid

3. กลุ่มพวกแอคติโนมัยซีท

ผลิตสารปฏิชีวนะได้ประมาณ 75% ของที่ผลิตได้ทั้งหมด แอคติโนมัยซีทจะสังเคราะห์สารประกอบที่ต่อต้านจุลินทรีย์ได้มากมาย เช่น *Streptomyces aureofaciens* สังเคราะห์ chlorotetra หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า aureomycin, *S. griseus* สังเคราะห์ cyclohexamide เป็นต้น

กลุ่มที่มีความสำคัญที่สุดคือกลุ่มแอคติโนมัยซีท โดยที่สกุล Streptomycetes จะสังเคราะห์สารประกอบที่ต้านจุลินทรีย์ได้มากมายในแง่ที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน กลไกการทำงานต่างกัน และจะมีผลต่อต้านจุลินทรีย์ในระดับต่าง ๆ กัน ดังเช่นในปี ค.ศ. 1980 Meevootisom และคณะ (อ้างโดย สิรินภรณ์, 2543) สามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* ได้ 252 ไอโซเลต จากตัวอย่างดิน 28 ตัวอย่าง โดย 201 ไอโซเลตแยกได้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และ 51 ไอโซเลตแยกได้ที่ 50 องศาเซลเซียส เชื้อที่แยกได้ทั้งหมดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ถึง 57%

Rosado และ Seldin (1993) ได้ศึกษา Bacillus polymyxa พบว่า สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อยีสต์ เชื้อรา แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ พบว่าสารที่พบนี้เป็นสารตัวใหม่ที่ต่างจากกลุ่ม polymyxin ที่พบใน *B. polymyxa* เนื่องจากสารตัวนี้ไม่ยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeroginosa* และ แบคทีเรียแกรมบวกที่ถูกยับยั้งโดย polymyxin

Lebadi และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษา fumgicin M-4 ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นโดย *B. licheniformis* M-4 จัดเป็นสารปฏิชีวนะประเภท hydrophilic peptide มีมวลโมเลกุล 3.4 kDa มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Microsporum canis*, *Mucor mucedo*, *B. megaterium* และ *Corynebacterium glutamicin* นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Sperotrix schenckii* ในสภาวะการเลี้ยงในอาหารเหลว

ปี ค.ศ. 1998 Pogall (อ้างโดย สิรินภรณ์, 2543) แยกสารเคมีชนิดหนึ่ง เรียกว่า paramycins จาก *Streptomyces alboniger* โดยสารตัวนี้ทำการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียเอง คือถ้าสารตัวนี้มีความเข้มข้นต่ำจะมีการกระตุ้นให้มีการสร้าง aerial mycelium แต่ถ้ามีความเข้มข้นสูงจะเกิดการยับยั้งการเจริญขึ้น และ paramycin ยังเป็นสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เชื้อรา และ *Mycobacteria* ซึ่งคาดว่าสามารถยับยั้ง *M. tuberculosis* ได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ Rajabhat University

ธัญวัฒน์ (1998) สามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* ได้ 252 ไอโซเลต จากดิน 28 ตัวอย่าง โดยแยกได้ 201 ไอโซเลตที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และ 51 ไอโซเลตที่ 50 องศาเซลเซียส เชื้อที่แยกได้ทั้งหมดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะโดยใช้อาหารที่มีส่วนผสมของ glucose , peptone และ Meat extract agar ใช้แบคทีเรียทดสอบได้แก่ B. *subtilis*, S. *aureus*, *Sarcina lutea*, *E. coli*, *Ps. aeroginosa*, *Ps. solanacearum*, *Candida utilis* และ *P. expansum* พบว่าสายพันธุ์ 13-1 และ 19-2 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ A และ B ได้ สาร A จะ active ต่อเชื้อทดสอบทั้ง 8 ชนิด โดยสารนี้มีคุณสมบัติละลายน้ำได้แต่ไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์ จัดเป็น cationic มีความทนทานต่อความร้อนและมีความคงตัวที่ pH 1-13 ส่วนสาร B จะ active ต่อเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus*, *Sarcina lutea* และ *Ps. solanacearum* สามารถละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ และทนความร้อน มีความคงตัวที่ pH 1-10

แอคติโนมัยซีท

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา (Kalakoutskii and Agre, 1976)

แอคติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายฟังไจแต่มีขนาดเล็กกว่า คือมีขนาดประมาณ 0.5 – 1.5 ไมโครเมตร ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า apical region และ intercalary region สร้างผนังกั้นเส้นใยแบบต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ การแตกสาขาของเส้นใยเป็นแบบ monopodial เป็นแบบที่พบได้บ่อยที่สุด พบใน *Streptomyces* แบบ dichotomous *branch* พบใน *Actinobifida* และแบบ verticillate พบใน *Streptoverticillium* แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ primary (substrate) mycelium และ secondary (aerial) mycelium ใน *Streptomyces* aerial mycelium มีลักษณะต่างจาก substrate mycelium อย่างชัดเจนคือ

1. aerial mycelium จะมีลักษณะของเส้นใยที่บางกว่า substrate mycelium
2. aerial mycelium มักจะมีสีเข้ม สร้าง insoluble pigment รวมกันที่ผนังหุ้มชั้นนอก ปรากฏเป็นสีเทาเมื่อมีการฉะท้อนแสง
3. มีการแตกสาขา (branching) น้อยกว่า substrate mycelium
4. ลักษณะของ aerial mycelium ส่วนใหญ่จะไม่มีการเจริญแบบแทงลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. มีการสร้างสปอร์ และ fragmentation ของเส้นใย
6. aerial layer มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic

ปกติเซลล์จะติดสีแกรมบวก แต่ถ้ามีอายุมากอาจเป็นแกรมผันแปรได้

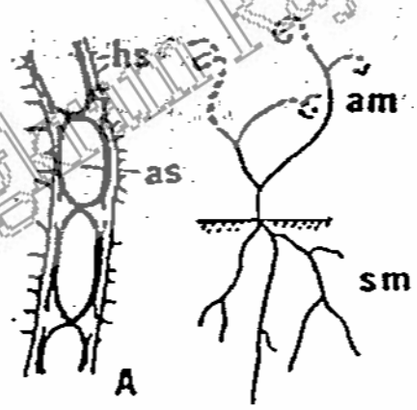
มหาวิทยาลัยศิลปากร Silpakorn University

ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง (surface culture) และในอาหารเหลว (submerge culture) มีลักษณะต่างกันคือ การเจริญในอาหารเหลวเซลล์จะเจริญจับกันเป็นกลุ่มของเส้นใยที่เรียกว่า pellets แต่สำหรับ เชื้อบางชนิด เช่น *Norcadia corallina* เมื่อเจริญในอาหารเหลวทีมีการเขย่าให้อากาศเชื้อจะมีลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod) มีการแบ่งเซลล์แบบ binary fission และแบบ fragmentation เมื่อหยุดการเจริญ ในขณะที่การเจริญบนอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของอาหารเช่นเดียวกับในอาหารเหลว เชื้อเจริญแบบสร้างเส้นใย (filamentous form) ในลักษณะที่ยึดติดแน่นกับผิวหน้าอาหารวุ้น และมี fragmentation ของเส้นใยเมื่อมีอายุมากขึ้นโดยทั่วไปลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งจะมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ สามารถพบได้ 3 แบบคือ

1. โคโลนีแบบหยาบหรือเรียบยึดเกาะกับผิวหน้าอาหารอย่างหลวม ๆ เป็นการสร้าง aerial mycelium ปกคลุมผิวหน้าอาหาร มักพบในแอคติโนมัยซีทที่มีการเจริญในระยะ transient mycelial มีการเจริญของ mycelia ที่ไม่แน่นอน

2. โคโลนีไม่มี substrate mycelium มี aerial mycelium ที่ยึดเกาะกับอาหารด้วยส่วนที่ยึดเกาะพิเศษที่เรียกว่า holdfast

3. โคโลนีมีลักษณะเกาะกันแน่นคล้ายแผ่นหนัง aerial mycelium ค่อนข้างโป่งและยึดกับ substrate ด้วยเส้นใยที่แทงลงไปในอาหารโดยเส้นใยที่อยู่เหนืออาหารเรียกว่า aerial mycelium และเส้นใยที่อยู่ภายใต้อาหารเรียกว่า substrate mycelium สำหรับในอาหารเหลวเรียกเส้นใยที่อยู่บนผิวอาหารว่า generative mycelium และเส้นใยที่อยู่ในอาหารว่า vegetative mycelium



ภาพที่ 1 ลักษณะการสร้างเส้นใยของ *Streptomyces* sp. มีการสร้าง arthrospore (as) ที่มี hydrophobic sheath (hs) หุ้ม ลักษณะสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่บน aerial mycelium (am) ซึ่งไม่พบใน substrate mycelium (sm) (William *et al*., 1989)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแอคติโนมัยซีท โดยทั่วไปพบได้ 2 แบบ **คือ** แบบ **mycelium** fragmentation และแบบ sporulation ในพวก ***Streptomyces*** spp. จะมีการสร้างเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษตามความยาว aerial conidia เกิดจากการขยายตัวของเซลล์และมีผนังหนาขึ้นเรียกว่า **chlamydospore** หรือ **arthrospore** มักพบแบบเดี่ยว ๆ (single spore) หรือต่อกันเป็นสายโซ่ (chain) ในพวก *Actinoplanes armenicus* สามารถสร้างสปอร์ได้ 2 แบบ คือ สปอร์แบบมี flagella เรียกว่า zoospore ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และสร้างสปอร์แบบ Streptomyces – type คือ สร้าง arthrospore บน aerial mycelium ในการสร้างสปอร์แบบใดนั้นมักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญอยู่ เชื้อ *Kitasatoa* spp. และ ***Pilimalia*** spp. มักจะพบมีการสร้างสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ภายใน vesicle และแบบเคลื่อนที่ไม่ได้มีลักษณะต่อกันเป็นสายโซ่ ใน *Micromonospora* spp. สร้างสปอร์แบบ chlamydospore เป็นคู่ที่ตำแหน่งปลายเส้นใย บริเวณ intercalary และบริเวณ interminate

ลักษณะการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยซีท (มาลิน, 2540) สามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ

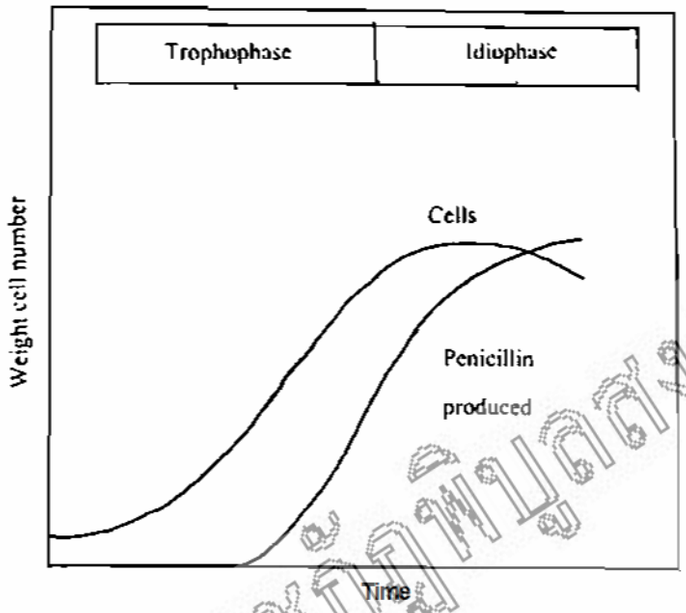
1.Endogenous formation เป็นสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี อยู่ภายใน cytoplasm ของเส้นใยเดิม (parent hyphae) พบในพวก thermophilic actinomycetes เช่น ***Thermoactinomyces*** และ ***Actinobifida***

2.Exogenous formation แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่สร้างสปอร์แบบ exogenous โดยเฉพาะ *Streptomyces* spp.

การสร้างสาร secondary metabolite ที่สำคัญของแอคติโนมัยซีท คือ สารปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อมีการสร้างขึ้นในช่วง idiophase ของการเจริญ โดยสารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยมักจะมีการสร้างในรูปสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มตามลักษณะที่คล้ายคลึงกันออกเป็น family หรือ series ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มักจะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแบบ batch culture โดยการเพาะเชื้อในลักษณะของ spore suspension หรือ seed culture (vegetative) ลงในอาหาร ในระยะแรกเชื้อมีการปรับตัวและมีการแบ่งเซลล์อย่างช้า ๆ (lag phase) ต่อมาเชื้อจะมี metabolism และอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (acceleration phase) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดของการเจริญ (exponential phase) อาหารถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสม biochemical intermediate บางชนิด ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัด (deceleration phase) เชื้อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี Pitthalongkorn Rajabhat University

เริ่มมีการเปลี่ยน biochemical pathway ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารปฏิชีวนะออกมา (Isaae and Jennings, *1995)* ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ระยะที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบ batch culture (Tortora *et al.*, 1992)

สารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นพบว่ามีการสะสมอยู่ที่บริเวณ mycelium หรือสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อหรืออาจพบได้ทั้งบริเวณ mycelium และในอาหารเลี้ยงเชื้อ สารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นมีคุณสมบัติเป็น water soluble antibiotic และ water insoluble antibiotic เช่นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม polyene จัดเป็น water insoluble antibiotic โดยมักพบในรูปของผลึกสะสมที่บริเวณผิวของเซลล์หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ คุณสมบัติที่ปรากฏมักจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญ สำหรับบทบาทและหน้าที่ที่แท้จริงของสารปฏิชีวนะยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัดมีข้อสันนิษฐานมากมายเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างซึ่งได้แก่

1. สารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นเป็นวิวัฒนาการอันหนึ่งของเชื้อในการดำรงชีพ
2. เป็นของเสียที่เชื้อปล่อยออกมาในขบวนการ metabolism
3. เป็นแหล่งที่เชื้อใช้สำหรับเก็บอาหาร หรือใช้เป็นสารที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มสปอร์ของเชื้อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

4. เป็นผลิตผลที่ได้จากการแตกย่อยของสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์

5. สารปฏิชีวนะมีบทบาทในการฆ่า หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ในธรรมชาติ อันเป็นการแก่งแย่งเพื่อความอยู่รอดของเชื้อ

6. การที่เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะ ถือเป็นกลวิธีหนึ่งที่จะรักษากลไกการทำงานของเซลล์ เป็นไปอย่างเดิมในระหว่างที่เชื้อไม่สามารถจะเจริญต่อไปได้เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

7. การผลิตสารปฏิชีวนะ เป็นวิธีการหนึ่งที่จะหลีกเลี่ยงมิให้เซลล์ของเชื้อตาย อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลย์ของการเจริญเติบโต

8. เป็นกลไกในการกำจัดสารพิษของเชื้อ

9. ช่วยในการขนส่งพวกโลหะเข้าสู่เซลล์

10. ระงับการงอกของสปอร์ของตัวเชื้อเอง

การแยกแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน

วิธีการแยกแอคติโนมัยซีทจากแหล่งธรรมชาติส่วนใหญ่พบว่ามักจะนิยมแยกเชื้อจากดิน เพราะว่าในดินมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากทั้งชนิดและปริมาณ ในขั้นตอนแรกจะต้องเลือกแหล่งดินที่มีแนวโน้มว่าน่าจะมีจุลินทรีย์ที่ต้องการอยู่ในปริมาณสูง จากนั้นก็นำมาแยกเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม เนื่องจากในดินมีจุลินทรีย์เจริญอยู่หลายชนิดจึงจำเป็นต้องกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อชนิดที่ไม่ต้องการลงบ้าง เพื่อให้การแยกเชื้อสามารถทำได้ง่ายขึ้น ซึ่งวิธีการที่ใช้ตลอดจนอาหารที่ใช้แยกเชื้อจะมีความแตกต่างกันไปทั้งนี้มักจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่ต้องการแยกเป็นสำคัญ ดังรายงานการวิจัยต่อไปนี้

Rodthong *et al.*, (1984) ทำการแยกแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินด้วยวิธี dilution plate method โดยทำ serial dilution ตัวอย่างดิน 10 กรัม เพาะเลี้ยงบน sodium caseinate agar ที่ประกอบด้วย sodium caseinate 0.2%, glucose 0.1%, K_2HPO_4 0.02%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02%, trace element $FeSO_4.7H_2O$ 0.02% และ agar 1.5% มี pH 7.0 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2–5 วัน สามารถแยกแอคติโนมัยซีทได้ 137 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินทั้งหมด 20 ตัวอย่าง

Hayakawa *et al.* (1991b) แยก *Micromonospora* และ *Microbispora* จากตัวอย่างดิน โดยใช้วิธี phenol – tunicamycin method สำหรับการแยก *Micromonospora* และใช้วิธี dry heat – phenol *CG* method สำหรับการแยก *Micromonospora* โดยนำตัวอย่างดินมาร่อนผ่านตะแกรงร่อนที่มีขนาด 2mm – meshsieve จากนั้นนำมาตากแห้ง (air dry) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ สำหรับการแยก *Micromonospora* นำตัวอย่างดินที่ air dry มาละลายในน้ำให้มีความเข้มข้น 10^{-1} จากนั้นดูดมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน phosphate buffer sterile pH 7 ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ที่นี

phenol ความเข้มข้น 1.5% (w/v) เก็บส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยคนส่วนผสมตลอดเวลา หลังจากนั้นดูดส่วนผสมดังกล่าว 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำประปาที่ปราศจากเชื้อ ให้มีความเข้มข้นเท่ากัน 10^{-2} นำสารละลาย ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มา spread บน HV agar ที่เติม tunicamycin และ nalidixic acid ความเข้มข้น 20 mg/l บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 สัปดาห์ สำหรับการแยก *Micromonospora* นำตัวอย่างดินที่ air dry ไปให้ความร้อนแห้งโดย การอบใน hot air oven อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาละลายน้ำจนมีความเข้มข้น 10^{-1} ดูดมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายผสมของ 5 mM phosphate buffer pH 7.6 ที่มี phenol 1.5% หรือใน 5 mM collidine buffer pH 7 ที่มี chlorohexidine gluconate (CG) 0.03 % หรือใน 5 mM collidine buffer pH 7 ที่มี phenol 1.5% และ CG 0.03% วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยคนตลอดเวลา นำส่วนผสมมาเจือจางเป็น 1: 10 หรือ 1: 50 ด้วยน้ำประปาที่ปราศจากเชื้อ ดูดสารละลายดังกล่าว 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร มา spread บน HV agar ที่ผสม nalidixic acid ความเข้มข้น 20 mg/l บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 สัปดาห์ วิธีการ pre treatment ดินด้วย phenol เป็นการทำลายแบคทีเรียและ *Streptomyces* แต่ไม่มีผลต่อ *Micromonospora* และ *Microbispora* การใช้ tunicamycin เป็นการส่งเสริมการเจริญของ *Microbispora* บน HV agar ในทางตรงกันข้ามการใช้วิธี dry heat เป็นการลดจำนวนแบคทีเรีย *Streptomyces* และ *Micromonospora* ส่วนการ treat ด้วยสารละลายผสมของ phenol และ CG เป็นการกำจัดแอคติโนมัยซีทที่ทนความร้อนได้โดยไม่มีผลต่อ *Microbispora* เช่นเดียวกัน

ในปีเดียวกัน Hayakawa *et al.* ได้แยก *Streptosporangium* และ *Dactylosporangium* จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ ที่ Yamanashi และ Nagano โดยนำตัวอย่างดินมาร่อนด้วยตะแกรงร่อนดิน จากนั้นนำมาผึ่งลมให้แห้ง (air dry) และอบด้วยความร้อน (dry heat) treat ด้วย benzethoniumchoride (BC) สำหรับการแยก *Streptosporangium* นำตัวอย่างดินที่ air dry และ dry heat ที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นละลายในน้ำที่เติม BC 0.01% เจือจางสารละลายดังกล่าวแล้วนำมาเพาะเลี้ยงบน HV agar ที่เติม nalidixic acid และ leucomycin ส่วนการแยกเชื้อ *Dactylosporangium* นำดินที่ dry heat มาละลายน้ำและ treat ด้วย BC 0.03% เพาะเลี้ยงบนอาหาร HV agar ที่เติม nalidixic acid และ leucomycin ส่วนการแยกเชื้อ *Dactylosporangium* นำดินที่ dry heat มาละลายน้ำ และ treat ด้วย BC 0.03 % เพาะเลี้ยงบนอาหาร HV agar ที่เติม nalidixic acid และ tunicamycin การ dry heat และการ treat ด้วย BC เป็นการกำจัดแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีทที่ไม่ต้องการรวมทั้ง *Streptomyces*

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ Chiang Mai Rajabhat University

Pickup *et al.* (1993) แยก *Streptomyces* จากตัวอย่างดินที่เก็บจาก University of Surrey โดยนำตัวอย่างดินมา 1 กรัม ละลายใน 100 มล. sterile quarter strength Ringer's solution ที่มี tween 80 (0.01% v/v) ใน flask ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า wrist action เป็นเวลา 10 นาที นำมาเจือจางและ spread ลงบนผิวหน้า M3 Agar หรือ MYA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* ได้ผลดี

กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม (2540) รายงานถึงการพัฒนาวิธีการแยกแอคติโนมัยซีทจากดินหลาย ๆ แหล่งในประเทศไทย โดยในการเตรียมตัวอย่างดินเพื่อคัดแยกจะเก็บตัวอย่างจากผิวดินลงไป 4 ซม. นำตัวอย่างดินมาผึ่งลมให้แห้ง (air – dry) 2 – 3 วัน เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่อยู่ในดินออกไปบางส่วน แบ่งตัวอย่างดินเพื่อทำ pre – treatment โดยใช้ความร้อนได้แก การทำ moist hear ที่ 45, 50 หรือ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่าง ๆ และการทำ dry heat โดยนำตัวอย่างดินมาอบแห้งที่ 120 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นทำ pre – treatment ด้วยสารเคมี เช่น เบนซีน โดยนำตัวอย่างดินมาละลายในเบนซีน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังการทำ pre – treatment นำสารละลายดินมาเจือจาง แล้ว spread ลงบน gause (NO.1) mineral medium ที่เติมยาปฏิชีวนะ cyclohexamide และ nystatin เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อรา บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 – 28 วัน เชื้อที่แยกได้จากดิน 14 แหล่ง จาก 14 จังหวัด เช่น ดินสวนยางพารา อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส และจากจังหวัดระยอง ดินบริเวณภูเขาดอยผาตั้ง จังหวัดเชียงราย ดินชายทะเล จังหวัดชลบุรี ได้แบคทีเรียที่อาจอยู่ในกลุ่มแอคติโนมัยซีท 600 ไอโซเลต ในกา pre – treatment ดินตัวอย่างพบราที่ 45 และ 50 องศาเซลเซียสให้ผลไม่แตกต่างกัน สำหรับที่ 70 และ 120 องศาเซลเซียสได้ไอโซเลตที่แตกต่างกันมากขึ้น การทำ air dry และ pre – treatment ต่าง ๆ ของดินตัวอย่างพบว่าจะช่วยกำจัดแบคทีเรีย และราที่ปนเปื้อนในตัวอย่างดินได้ดี แต่ยังคงมีแบคทีเรียพวกที่สร้างเมือกปนอยู่ โดยปริมาณราลดลง

การตรวจหาสารปฏิชีวนะ

ในการค้นหาสารปฏิชีวนะพบว่าโดยธรรมชาติจุลินทรีย์จะผลิตสารออกมาในปริมาณต่ำมาก จึงควรใช้วิธีการทางชีววิทยาในการตรวจสอบขั้นแรก เพราะมีความไวและความจำเพาะมากกว่าวิธีการทางเคมี การตรวจหาสารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ทำได้ 2 วิธี

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี Pibulsongkram Rajabhat University

1. วิธีเจือจาง (dilution method) (Tortora et al., 1992)

เป็นวิธีที่นำสารปฏิชีวนะมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเพาะเชื้อทดสอบลงไป เป็นวิธีที่สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ สามารถทำได้ 2 วิธี

1.1 วิธีเจือจางในอาหารเหลว (tube or broth dilution method)

เป็นการเจือจางความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะลงทีละ 2 เท่า โดยอาหารเหลวในหลอดทดสอบ เพาะเชื้อทดสอบลงไป บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสังเกตการเจริญของเชื้อ

1.2 วิธีเจือจางในอาหารแข็ง (agar dilution method)

เป็นการเจือจางสารปฏิชีวนะในอาหารวุ้นที่หลอมเหลว อุณหภูมิประมาณ 48 – 50 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปมักจะใช้อาหารแข็งหลอมเหลวปริมาณ 19 มิลลิลิตร ผสมสารละลายปฏิชีวนะปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากันดี เทใส่จานอาหารปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัว เพาะเชื้อทดสอบลงบนอาหารโดยวิธี relplicating apparatus หรือ drop plate ซึ่งทราบปริมาณเชื้อที่ใช้ในการทดสอบแน่นอน มักจะใช้ปริมาณเชื้อ 10^4 cfu/spot วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจน spot แห้งนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม สังเกตการเจริญของเชื้อ

2. วิธีแพร่ (diffusion method) (Koneman et al., 1983)

เป็นวิธีการอาศัยการแพร่ของสารปฏิชีวนะในอาหารแข็ง เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ สามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

2.1 Disc diffusion method

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก โดยมีการปรับปรุงมาจากวิธีของ Kirby – Bauer ซึ่งมีวิธีการดังนี้ คือ เตรียมแบคทีเรียทดสอบ โดยการใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะตรงยอดโคโลนีของเชื้อทดสอบที่มีลักษณะคล้ายกัน 4 – 5 โคโลนี ใส่ลงใน tryptic soy broth หรือ Mueller Hinton broth ซึ่งมีปริมาณหลอดละ 2 – 5 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 5 ชั่วโมง นำไปเทียบความขุ่นมาตรฐาน หรือ standard McFarland หรืออาจวัด optical density ด้วย spectrophotometer ที่ *625* nm. ควรมีค่า O.D. ระหว่าง *0.08* – 1.10 ถ้าเชื้อขุ่นมากไปควรเจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อหรืออาหารเหลว วิธีดังกล่าวได้ปริมาณเชื้อประมาณ $1x10^8$ เซลล์/มล. จากนั้นนำมาเพาะลงบนอาหาร โดยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

2.1.1 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อพอหมาด ๆ แล้วนำไปป้ายบนผิวหน้า Mueller Hinton agar จนทั่ว วางทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

2.1.2 ใช้ปิเปตดูดเชื้อมาเทลาดบนผิวหน้าอาหารทดสอบจนทั่ว ดูดเชื้อส่วนเกินทิ้ง วางไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง

2.1.3 ใช้วิธีการ pour plate โดยผสมเชื้อในอาหารแข็งทดสอบที่หลอมเหลว นำมาเทลงในจานอาหาร หรืออาจใช้วิธี double layer คือเตรียมอาหารทดสอบ 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียว ส่วนชั้นบนเป็นอาหารแข็งที่หลอมเหลวผสมเชื้อทดสอบ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัวและผิวหน้าอาหารแห้ง

หลังจากนั้นนำแผ่นกระดาษกรองชุบหรือหยดสารละลายปฏิชีวนะ มาวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อทดสอบ ตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

2.2 วิธีใช้หลุม (agar well method)

เป็นวิธีการทดสอบที่เตรียมอาหารวุ้นทดสอบเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างเป็น base layer ชั้นบนเป็น *seed* layer ซึ่งเพาะเชื้อทดสอบไว้ เจาะวุ้นชั้นบนให้เป็นหลุม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ใส่สารละลายปฏิชีวนะจนเต็มหลุม บ่มเพาะเชื้อ ตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

2.3 วิธีใช้แท่งวุ้น ((agar plug method)

2.3.1 วิธีการที่ให้เชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะเป็น agar plug คือ เลี้ยงเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อสร้างสารปฏิชีวนะและขับออกมาในอาหารวุ้น จากนั้นจึงเจาะวุ้นออกเป็นแท่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 – 1.0 เซนติเมตร นำมาวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ตรวจวงใสที่เกิดขึ้น (อัญชลี, 2526)

2.3.2 วิธีการใช้เชื้อทดสอบเป็น agar plug ทำโดยเลี้ยงเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะโดยการ streak เชื้อบนอาหารแข็งเป็นบริเวณครึ่งหนึ่งของจานอาหาร บ่มเพาะให้เชื้อเจริญเต็มที่ นำแท่งวุ้นที่มีเชื้อทดสอบ (มักจะเป็นเชื้อทดสอบที่เป็นฟังไจ) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางลงบริเวณตรงกลางจานอาหาร บ่มเพาะเชื้อระยะหนึ่ง สังเกตการเจริญของเชื้อทดสอบ (Crawford *et al.*, 1993)

2.4 Droplet method (Pickup *et al.*, 1993)

เป็นวิธีการที่ใช้ peristatic pump หยดอาหารแข็งที่อยู่ในสภาพหลอมเหลว ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารโดยให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 มิลลิเมตร เมื่ออาหารแข็งตัว นำเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะมาเพาะลงบนผิวหน้าแผ่นอาหารดังกล่าว บ่มเพาะจนเชื้อเจริญเต็มที่ จึงเท NA หลอมเหลวที่ผสมเชื้อทดสอบราดบนแผ่นวุ้นในจานอาหาร บ่มเพาะเชื้อระยะหนึ่ง ตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

2.5 Cross streak method

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

คุณสมบัติของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

แบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* เป็นเชื้อที่มีความสำคัญในการก่อโรคในคน เป็นเชื้อที่ทนต่อความร้อนและความแห้งได้ดี อาศัยอยู่ในบริเวณทางเดินหายใจส่วนต้น ผิวหนัง ลำไส้ ช่องคลอดของคนปกติ หรือแม้แต่ตามเสื้อผ้าสิ่งของเครื่องใช้ต่าง ๆ เชื้อนี้สามารถปนเปื้อนจากบุคคลหนึ่งไปยังอีกคนหนึ่งได้โดยการสัมผัสโดยตรง หรือทางอากาศปกติ Staphylococci อาศัยอยู่ตามร่างกายของคนได้โดยไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เมื่อใดก็ตามที่ร่างกายเกิดความผิดปกติ เช่น ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือมีบาดแผล เชื้อที่อาศัยอยู่เหล่านั้นจะก่อโรคได้ทันที โดยสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ทั่วร่างกาย จึงพบว่าเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีบาดแผลหรือผู้ป่วยหลังผ่าตัด Staphylococci จะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดเป็นหนองและอาจทำให้เนื้อเยื่อตาย นอกจากนี้ยังสร้างพิษซึ่งทำให้เกิดกลุ่มอาการต่าง ๆ ขณะเดียวกันเชื้อยังจะลุกลามเข้าสู่กระแสโลหิตทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบต่าง ๆ เป็นโรคแทรกซ้อนรุนแรงจนถึงชีวิตได้

Staphylococci เป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวกรูปกลม อยู่ในวงศ์ Micrococcaceae สกุล *Staphylococcus* มีอยู่ด้วยกันอย่างน้อย 20 เชื้อสาย แต่เชื้อสายที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ได้แก่ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *S. saprophyticus* เชื้อสายที่มีความสำคัญและก่อโรคในคนได้บ่อยที่สุดคือ *S. aureus*

S. aureus มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 -- 1.2 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่มีการเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (grapelike clusters) บางครั้งอาจพบเดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ โดยเฉพาะถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เชื้อนี้ย้อมติดสีแกรมบวก แต่ถ้าเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้นานหรือเชื้อที่ตายแล้วอาจมีขนาดและการติดสีผิดไปได้เชื้อนี้ไม่มีแฟลกเจลลา ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์

S *aureus* มีชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของผนังเซลล์ที่หนาและมีกรดไตโคอิกกระจายอยู่ทั่วไปทำให้ผนังเซลล์แข็งแรง จะถูกทำลายได้ด้วยกรดเข้มข้นหรือไลโซไซม์เท่านั้น ชั้นของเปปติโดไกลแคนนี้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน และมีความจำเพาะสำหรับ *S. aureus* ทุกพันธุ์ต่าง ๆ ถัดจากชั้นเปปติโดไกลแคนเป็นชั้นโปรตีน *S. aureus* เกือบทุกสายพันธุ์จะมีโปรตีน

สำนักวิทยบริการสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

ชนิดหนึ่งเรียกว่า "โปรตีน เอ" ซึ่งมีคุณสมบัติจับกับส่วน Fc ของอิมมิวโนโกลบุลิน จี (IgG) โดยส่วนของ Fab ยังคงจับกับแอนติเจนได้ โปรตีน เอ นี้นำไปใช้ประโยชน์ในการพิสูจน์ และแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้ด้วยวิธีโคแอกกลูติเนชัน (coagglutination) ที่ผนังเซลล์ของ *S. aureus* ยังมีเอนไซม์โคแอกกูเลสซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับไฟบริโนเจนในพลาสมา ทำให้เชื้อเกิดเกาะกลุ่มได้ เอนไซม์นี้ จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า "clumping factor" นอกจากนี้ *S. aureus* บางสายพันธุ์มีแคปซูลทำให้เชื้อไม่ถูกจับกินโดยกระบวนการ phagocytosis

S. aureus เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาเกือบทุกชนิด เป็นพวก facultative anaerobes คือ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic) แต่เจริญได้ดีกว่าในที่มีออกซิเจน เชื้อจะเจริญได้ช่วงอุณหภูมิ 10– 45 องศาเซลเซียส และดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ที่ pH 4.5 – 9.3 แต่ดีที่สุดที่ pH 7 – 7.5 ลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ เป็นเงา ขนาดประมาณ 1–4 มิลลิเมตร *S. aureus* สามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองที่เรียกว่า tricrpenoid carotenoids ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีเหลืองทอง การสร้างรงควัตถุของเชื้อนี้จะเห็นได้ชัดขึ้นเมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 24 – 48 ชั่วโมง แต่เชื้อจะไม่สร้างรงควัตถุในที่ไม่มีออกซิเจนหรือในอาหารเหลว *S. aureus* เกือบทุกสายพันธุ์สลายเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบน blood agar จะเป็นโซนใส (β - hemolytic zone) รอบ ๆ โคโลนี

S. aureus ย่อยน้ำตาลได้หลายชนิด โดยจะย่อยได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจน (respiration) และแบบการหมักที่ไม่ใช้ออกซิเจน (fermentation) ผลผลิตของการหมักย่อยน้ำตาลจะได้กรดแลกติก แต่ไม่ให้ก๊าซ *S. aureus* จะทนความแห้งและความร้อนได้ดี (50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (15% NaCl) ซึ่งต่างกับแบคทีเรียทั่ว ๆ ไป

S. aureus สามารถก่อโรคโดยสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นปัจจัยช่วยให้เชื้อสามารถเจริญลุกลามไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ และทำให้เกิดการติดเชื้อชนิดมีหนอง (pyogenic infection) นอกจากนี้เชื้อยังสามารถสร้างสารพิษหลายชนิดซึ่งก่อให้เกิดกลุ่มอาการต่าง ๆ

การดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* ยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาการติดเชื้อของ *S. aureus* นั้นเดิมใช้ยา penicillin ต่อมาพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ดื้อยานี้ และมีเพียงประมาณร้อยละ 20 ที่ยังไวต่อยานี้อยู่

ว
ร๗๑
ช๑๕ก
๒ ๑
136633

ดังนั้นการรักษาจึงหลีกเลี่ยงการใช้ penicillin การดื้อยาของเชื้อ *S. aureus* แบ่งได้ 3 ชนิด

1. กลุ่มเชื้อที่ดื้อยาพวก β - lactams ได้แก่ กลุ่ม penicillin โดยเชื้อสร้างเอนไซม์ β - lactamase ออกมาทำลาย β - lactam ring ของยาปฏิชีวนะยาที่ใช้ได้ผลกับเชื้อที่ดื้อยา กลุ่มนี้ได้แก่ Methicillin, Nafcilin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin และ Cephalothin

2. กลุ่มเชื้อที่ดื้อยา Methicillin (Methicillin – resistant *S. aureus* (MRSA)) มียีนที่ควบคุมการดื้อยาอยู่ที่โครโมโซม ยาที่ใช้รักษาคือ Vancomycin และ Teicoplanin

3. กลุ่มเชื้อที่มีความทนต่อยาปฏิชีวนะ กลุ่ม β - lactams ได้สูงกว่าปกติ

ดังนั้นการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ Staphylococci จำเป็นต้องอาศัยผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นแนวทางในการรักษาที่เหมาะสม และไม่ก่อให้เกิดสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเพิ่มมากขึ้นไปอีก

ปัญหาสำคัญเมื่อมีการระบาดของเชื้อคือ ปัญหาการดื้อยาของเชื้อ ทำให้ไม่สามารถรักษาและทำลายแหล่งเชื้อได้นอกจากนี้ยังพบปัญหาการกลับมาเป็นซ้ำ เนื่องจากเชื้อ *S. aureus* มีความคงทนสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานในที่แห้ง เช่น เสื้อผ้า ผ้าปูที่นอน และรวมทั้งปลอกหมอนได้ด้วย

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ตัวอย่างดินจากแหล่งต่าง ๆ ในสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก
2. เชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus*
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
   - 3.1 Hickey and Tresner's medium (HT agar)
   - 3.2 Trypticase soy broth (Diffco)
   - 3.3 Nutrient agar (NA)
   - 3.4 Glucose soy bean medium (GSM)
4. เครื่องมือ
   - 4.1 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
   - 4.2 เครื่องเขย่าแบบซ้ายขวา (Shaker; orbital Heidolph Unimax 2010)
   - 4.3 Autoclave ยี่ห้อ Tomy SS-325
   - 4.4 ตู้อบอุณหภูมิสูง (Hot air oven)
   - 4.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (high speed centrifuge)
   - 4.6 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Telstar AU-100
   - 4.7 Spectophotometer ยี่ห้อ Shimadzu UV-1601
5. อุปกรณ์อื่น ๆ
   - 5.1 จานเพาะเชื้อ
   - 5.2 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
   - 5.3 หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร
   - 5.4 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์
   - 5.5 ปิเปตขนาด 0.1 และ 1.0 มิลลิลิตร
   - 5.6 กระบอกตวงขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
   - 5.7 เข็มเขี่ยเชื้อ
   - 5.8 กระดาษกรอง whatman no.2
   - 5.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์
   - 5.10 ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

5.11 บีกเกอร์ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร

5.12 แท่งแก้วงอเกลี่ยเชื้อ

5.13 เครื่องเจาะกระดาษขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 มิลิเมตร

5.14 ปากคีบ

วิธีการวิจัย

<u>การทดลองที่ 1</u> การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มโดยเลือกดินในพื้นที่ภายในสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม (ทุ่งทะเลแก้ว) จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 8 แหล่ง แหล่งละ 3 ตัวอย่าง โดยเลือกเก็บบริเวณที่มีอินทรีย์สารสูง ทำการเก็บตัวอย่างโดยเกลี่ยผิวหน้าดินออกเล็กน้อย ตักดินลึกจากผิวหน้าดินประมาณ 5-10 เซนติเมตร ประมาณ 500 กรัม ใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงและบันทึกแหล่งที่เก็บดังนี้

แหล่งที่ 1 ดินบริเวณริมแม่น้ำน่าน

แหล่งที่ 2 ดินบริเวณขอนไม้ผุ

แหล่งที่ 3 ดินบริเวณต้นไผ่

แหล่งที่ 4 ดินบริเวณจอมปลวก

แหล่งที่ 5 ดินสวน

แหล่งที่ 6 ดินนา

แหล่งที่ 7 ดินบริเวณกองหญ้า

แหล่งที่ 8 ดินโคลน

2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

2.1 นำตัวอย่างดินมาผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการเจือจางดิน โดยชั่งดิน 10 กรัม ใส่ในขวดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าขวดให้เชื้อแยกจากดินทิ้งไว้สักครู่ เพื่อให้ดินตกตะกอน

2.2 ทำ suspenstion ของดินที่ความเจือจาง 10^3, 10^4 และ 10^5 ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร HT agar ใช้แท่งแก้วงอปราศจากเชื้อเกลี่ยจนกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

2.3 ตรวจหาเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเป็นปุยสั้น q มี aerial mycelium และ substrate mycelium ฝังแน่นในอาหาร ผิวหน้าของโคโลนีค่อนข้างแห้ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสายขนาดเล็กกว่าเชื้อรา สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก นำมาลากซ้ำบนอาหารใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อที่แยกได้มาใส่รหัสดังนี้คือ

เชื้อที่แยกได้บริเวณริมแม่น้ำ	R1
เชื้อที่แยกได้บริเวณสวน	R2
เชื้อที่แยกได้บริเวณนา	R3
เชื้อที่แยกได้บริเวณขอนไม้ผุ	R4
เชื้อที่แยกได้บริเวณต้นไผ่	R5
เชื้อที่แยกได้บริเวณจอมปลวก	R6
เชื้อที่แยกได้บริเวณกองหญ้า	R7
เชื้อที่แยกได้บริเวณโคลน	R8

<u>การทดลองที่ 2</u> การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ ทำโดยวิธี agar plate diffusion

1. นำเชื้อแอคติโนมัยซีทบริสุทธิ์ที่แยกได้มาเลี้ยงใน GSM โดยเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ที่มีอาหาร 5.0 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบซ้ายขวา (reciprocal shaker) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

2. แยกเซลล์ออกโดยการนำไปเหวี่ยงด้วย microcentrifuge เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนที่เป็นเซลล์ทิ้งไป นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทดสอบสารปฏิชีวนะ

3. การเตรียมเชื้อทดสอบเพื่อทดสอบสารปฏิชีวนะ

โดยการนำเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่อยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม มา streak บน NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อจำนวน 2 – 3 โคโลนี เพาะลงในหลอดทดลองที่มี trypticase soy broth ปริมาณ 3 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดความขุ่นโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ซึ่งควรมีค่า OD ระหว่าง 0.08 – 1.1 ถ้าขุ่นมากให้เจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อหรืออาหารเหลว จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อพอหมาด ๆ แล้วนำไปป้ายบนผิวหน้าอาหาร NA จนทั่ว วางทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง

4. นำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 ที่เตรียมไว้โดยการเจาะด้วยเครื่องเจาะกระดาษขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ จำนวน 2 แผ่นซ้อนกันชุบน้ำเลี้ยงเชื้อมาวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงตรวจวงใสที่เกิดขึ้น

5. คัดเลือกเชื้อที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยสังเกตจากวงใสที่เกิดขึ้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

<u>การทดลองที่3</u> การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะในการยังยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

3.1 เจือจางน้ำเลี้ยงแอคติโนมัยซีทไอโซเลตที่สร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทีละ 2 เท่า ในหลอดทดสอบที่มี trypticase soy broth โดยทำให้เจือจางเป็น 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. 1/64, 1,128 และ 1/256 เท่า

3.2 จุ่มกระดาษกรองฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้ (paper disc) ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ กัน นำมาวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ บ่มเพาะเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ความเจือจางสุดท้ายที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (มีหน่วยเป็น dilution unit / ml)

<u>การทดลองที่ 4</u> การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีส

I. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการนำเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลตที่คัดเลือกจากความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้สูงสุดมา streak บนอาหาร NA จากนั้น นำกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อปักลงตรงบริเวณรอย streak บ่มเพาะที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นใช้ปากคีบที่สะอาดดึง cover glass ซึ่งมีเชื้อแอคติโนมัยซีสเจริญติดอยู่ไปตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

2. จัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยนำมาเปรียบเทียบกับแอคติโนมัยซีทที่ได้จำแนกแล้วในหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vulume 4 และหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 4

ผลการวิจัย

<u>ผลการทดลองที่ 1</u> การแยกแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดิน

จากการแยกแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยเก็บแหล่งละ 3 ตัวอย่าง สามารถแยกแอคติโนมัยซีท ได้ทั้งหมด 286 ไอโซเลต โดยพบว่าดินบริเวณต้นไผ่สามารถแยกแอคติโนมัยซีทได้มากที่สุด จำนวน 65 ไอโซเลต รองลงมาคือดินบริเวณจอมปลวก แยกได้ 56 ไอโซเลต ส่วนดินบริเวณริมแม่น้ำ, ดินสวน, ดินนา, ดินบริเวณขอนไม้ผุ, ดินบริเวณกองหญ้า และดินโคลน สามารถแยกแอคติโนมัยซีทได้ 29, 31, 37, 22, 26 และ 20 ไอโซเลต ตามลำดับ เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่จะมีลักษณะโคโลนีมีสีขาวฟู และติดแน่นอยู่บนผิวหน้าอาหาร ดินที่แยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ส่วนใหญ่มี pH อยู่ระหว่าง 7-7.5 ดังผลในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินแหล่งต่าง ๆ ในสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก

บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนดินตัวอย่าง	pH	จำนวนแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ (Isolates)
ดินบริเวณริมแม่น้ำ	3	7	29
ดินสวน	3	7.3	31
ดินนา	3	7.4	37
ดินบริเวณขอนไม้ผุ	3	7.2	22
ดินบริเวณต้นไผ่	3	7.5	65
ดินบริเวณจอมปลวก	3	7.4	56
ดินบริเวณกองหญ้า	3	7.5	26
ดินโคลน	3	7.5	20

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

<u>ผลการทดลองที่ 2</u> ผลการตรวจหาแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะโดยวิธี paper disc diffusion

จากการนำแอคติโนมัยซีทจำนวน 286 ไอโซเลต ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร GSM ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร บ่มเพาะบนเครื่องเขย่าแบบซ้ายขวา (reciprocal shaker) ความเร็ว 225 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 3 จากนั้นนำไปตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยวิธี paper disc diffusion พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 27 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยั้งยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งตรวจผลได้จากการสร้างวงใสจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยวงใสที่เกิดขึ้นมีความกว้างระหว่าง7-18 มิลลิเมตร ขนาดวงใสที่พบมากที่สุดคือ 9 มิลลิเมตร ซึ่งเกิดแอคติโนมัยซีท 6 ไอโซเลต คือไอโซเลต R2-1 L R4-3, R6-21, R6-27, R6-43 และ R7-10 ขนาดความกว้างของวงใสที่พบรองลงมาคือ 8 มิลลิเมตร มีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ R1-22, R4-13, R5-60 และ R7-20 และขนาดของวงใส 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 และ 18 มิลลิเมตร จะมีเพียง 1-2 ไอโซเลต ดังผลการทดลองตามตารางที่ 3 จากขนาดความกว้างของวงใสที่กว้างที่สุดเกิดจากแอคติโนมัยซีทไอโซเลต R7-17 โดยมีขนาดเท่ากับ 18 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินบริเวณกองหญ้า ดังแสดงในภาพที่ 4

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 3 ผลของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

Isolate	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (มม.)
R1-22	8
R-23	17
R1-29	10
R2-11	9
R2-15	12
R3-22	12
R4-3	9
R4-11	11
R4-13	8
R4-15	12
R5-1	7
R5-34	13
R5-51	17
R5-57	13
R5-60	8
R6-21	9
R6-22	14
R6-27	9
R6-35	10
R6-43	9
R7-10	9
R7-17	18
R7-18	15
R7-19	14
R7-20	8
R7-22	15
R8-14	16

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

(a)

(b)

(c)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ภาพที่ 3 ลักษณะการเจริญของแอคติโนมัยซีททั้ง 27 ไอโซเลต ในอาหาร GSM

ภาพ (a) R1-22, R1-23, R1-29, R2-11, R2-15, R3-22, R4-3 R4-11 R4-15 และ R5-1

ภาพ (b) R4-12, R5-34, R5-51, R5-57, R5-60, R6-21, R6-22 R6-27, R6-35 และ R6-43

ภาพ (c) R7-10, R7-17, R7-18, R7-19, R7-20, R7-22 และ R8-14

ภาพที่ 4 การยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต R7-17

ผลการทดลองที่ 3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

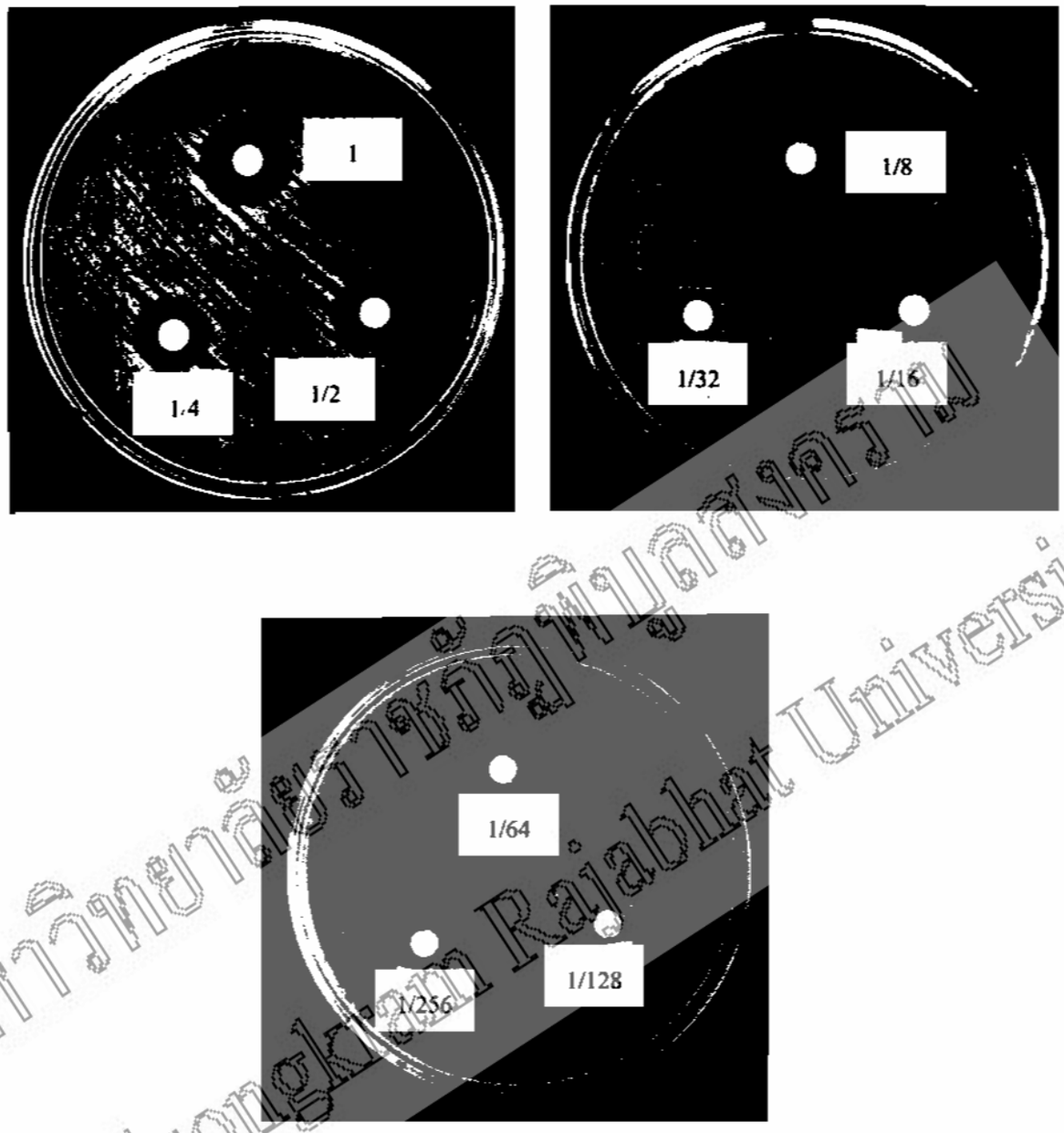
เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ทั้ง 27 ไอโซเลต มาเจือจางลงที่ละ 2 เท่า แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญ *S. aureus* พบว่าส่วนใหญ่จะมีค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) อยู่ที่ความเจือจาง 1 dilution unit/ ml คือมีจำนวน 9 ไอโซเลต รองลงมาคือ ความเจือจางที่ 1/8 dilution unit/ml มี 5 ไอโซเลต และที่ความเจือจาง 1/2, 1/4, 1/6, 1/32 และ 1/128 dilution unit/ml จะมีจำนวน 3, 2, 3,4 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ โดยเชื้อไอโซเลต R7-17 จะเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่ความเจือจาง 1/128 dilution unit/ml รองลงมาคือ ไอโซเลต R8-14, R5-51,R7-18 และ R7-22 มีความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะทีความเจือจาง 1/32 dilution unit/ml ส่วนไอโซเลตอื่น ๆ จะมีความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* มีค่าความเข้มข้นต่ำกว่า ดังตารางที่ 4

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

Isolate	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (มม.) ในแต่ละความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (dilution units/ml.)								
	1	1/2	¼	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
R1 – 22	8	-	-	-	-	-	-	-	-
R1 – 23	17	14	12	10	9	-	-	-	-
R1 – 29	10	9	8	-	-	-	-	-	-
R2 – 11	9	8	-	-	-	-	-	-	-
R2 – 15	12	10	9	8	-	-	-	-	-
R3 – 22	12	10	9	8	7	-	-	-	-
R4 – 3	9	-	-	-	-	-	-	-	-
R4 – 11	11	10	8	-	-	-	-	-	-
R4 – 13	8	-	-	-	-	-	-	-	-
R4 – 15	12	11	9	8	-	-	-	-	-
R5 – 1	7	-	-	-	-	-	-	-	-
R5 – 34	13	12	10	9	-	-	-	-	-
R5 – 51	17	15	14	13	12	9	-	-	-
R5 – 57	13	12	10	8	-	-	-	-	-
R5 – 60	8	-	-	-	-	-	-	-	-
R6 – 21	9	-	-	-	-	-	-	-	-
R6 – 22	14	11	9	7	-	-	-	-	-
R6 – 27	9	-	-	-	-	-	-	-	-
R6 – 35	10	8	-	-	-	-	-	-	-
R6 – 43	9	8	-	-	-	-	-	-	-
R7 – 10	9	-	-	-	-	-	-	-	-
R7 – 17	18	15	14	12	10	9	8	7	-
R7 – 18	15	13	12	10	9	7	-	-	-
R7 – 19	14	12	11	9	8	-	-	-	-
R7 – 20	8	-	-	-	-	-	-	-	-
R7 – 22	15	14	11	10	9	8	-	-	-
R8 – 14	16	14	13	12	10	8	-	-	-

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ภาพที่ 5 ผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

<u>ผลการทดลองที่ 4</u> การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต R7-17

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต R7-17 ที่แยกได้จากดินบริเวณกองหญ้า โดยการเลี้ยงไอโซเลต R7-17 บนอาหาร NA บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 30^{0}C ระยะเวลา 14 วัน พบว่าลักษณะผิวหน้าโคโลนีของไอโซเลต R7-17 จะมีลักษณะเป็นฝุ่นผงแห้งสีเทาเข้ม พบผิวหน้าอาหารและลักษณะโคโลนีภายใต้อาหาร จะมีสีน้ำตาลแกมเหลือง ดังภาพที่ 6 และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะของเส้นใยของเส้นของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต R7-17 โดยวิธี slide culture ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีลักษณะเป็นเส้นสายขนาดเล็ก สร้างสปอร์ต่อกันเป็นเส้นสายและมีลักษณะม้วนงอ ดังภาพที่ 7 ซึ่งสามารถจัดแอคติโนมัยซีท R7-17 อยู่ในจีนัส *Streptromyces* เพราะมีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *Streptromyces* ที่ได้จัดจำแนกไว้แล้วในหนังสือ Bergey's Manual Determinative Bacteriology 9th edition

ลักษณะผิวหน้าโคโลนี ลัษณะโคโลนีภายใต้อาหาร

ภาพที่ 6 ลักษณะการเจริญของไอโซเลต R7 – 17 ที่เจริญบนอาหาร NA เมื่อบ่มเพาะที่ 30^{0}C เวลา 14 วัน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ภาพที่ 7 ลักษณะเซลล์ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต R7-17

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดิน 8 แหล่ง ในบริเวณสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม ทุ่งทะเลแก้ว จังหวัดพิษณุโลก พบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 286 ไอโซเลต โดยใช้อาหาร HT agar โดยทำการเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 14 วัน ในระยะแรกแอคติโนมัยซีทมีการเจริญที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายแบคทีเรียแต่ต่างกันที่โคโลนีของแอคติโนมัยซีทจะฝังติดแน่นกับผิวหน้าอาหารและมีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ HT agar นั้นเป็นอาหารที่เหมาะสำหรับการเจริญของแอคติโนมัยซีท เนื่องจากในอาหารมีส่วนประกอบของ Co ที่ช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยซีท และนอกจากนั้นยังมี yeast extract ที่ช่วยส่งเสริมการสร้างสปอร์อีกด้วย (Kalakoutskii and Age, 1976) การแยกแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในการวิจัยนี้เป็นการแยกแบบไม่ได้เฉพาะเจาะจงชนิดของแอคติโนมัยซีท จึงเพียงแต่ผึ่งลมให้ดินแห้งตามธรรมชาติแล้วจึงทำการ spread plate และบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ^{0} เซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้

ตัวอย่างดินที่ให้จำนวนชนิดหรือไอโซเลตมากคือ ดินตัวอย่างบริเวณต้นไผ่ ซึ่งมีจำนวนแอคติโนมัยซีทถึง 65 ไอโซเลต ดินบริเวณดังกล่าวจะมีสีคล้ำ มีกลิ่นเหม็น เนื้อดินค่อนข้างละเอียดร่วนซุย มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4 ซึ่งดินลักษณะดังกล่าวมักเป็นดินที่มีโอกาสพบแอคติโนมัยซีทสูง (Koneman t al., 1983) สำหรับแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ส่วนใหญ่มีลักษณะไม่ค่อยแตกต่างกัน โดยพบว่าโคโลนีมีลักษณะสีขาว ฝังติดแน่นอยู่บนผิวหน้าอาหาร มีการสร้างสปอร์และเส้นใยมีลักษณะม้วนงอขึ้นไปบนอากาศ

จากการคัดเลือกแอคติโนมัยซีททั้งหมด 286 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ด้วยวิธี paper disc agar diffusion พบว่ามีแอคติโนมัยซีทเพียง 27 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบคือ *S. aureus* ได้ ซึ่งคิดเป็น 9.4 % ของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ทั้งหมด โดยที่ไอโซเลต R7-17 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้สูงสุดคือมีความกว้างของวงใสเท่ากับ 18 มิลลิเมตร ส่วนแอคติโนมัยซีทไอโซเลตอื่น ๆ มีการสร้างวงใสที่มีความกว้างน้อยกว่านี้ ความสามารถในการสร้างสารได้ในปริมาณต่ำหรือสูงสามารถวัดได้จากความกว้างของวงใสที่เกิดจากการยับยั้งของแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือก ถ้าความกว้างของวงใสกว้างแสดงว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ดี (มรกต, 2534) ดังนั้นในการทดสอบความสามารถของสารปฏิชีวนะที่แอคติโนมัยซีทสร้างได้จึงต้องควบคุมสภาวะและ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสม ซึ่งจะทำให้ผลที่ได้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการทดสอบได้แก่

1. ชนิดอาหารที่ใช้ทดสอบ ต้องเป็นอาหารที่เชื้อทดสอบสามารถเจริญได้ตามปกติ ไม่มีสารยับยั้งหรือกระตุ้นการเจริญเป็นพิเศษ

2. ความแข็งของอาหารที่ใช้ทดสอบ ถ้าอาหารมีปริมาณวุ้นมากเกินไป ทำให้สารปฏิชีวนะแพร่กระจายได้ช้า

3. ความหนาของอาหาร ถ้าหนาเกินไปความกว้างของวงใสจะแคบกว่าปกติเพราะว่ามันจะไปมีผลต่อการแพร่ของสารปฏิชีวนะ ขณะเดียวกันถ้าอาหารบางจะทำให้ได้วงใสที่กว้างกว่าปกติ

4. ปริมาณเชื้อตั้งต้นของเชื้อทดสอบ

5. การวางแผ่น disc ผิวหน้าของอาหารทดสอบจะต้องแห้ง ถ้าผิวหน้าอาหารเปียกชื้นจะทำให้สารปฏิชีวนะกระจายไปกับน้ำ ดังนั้นจึงควรวางจานอาหารที่มีเชื้อทดสอบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-20 นาที

6. ระยะเวลาในการวางแผ่น disc ไม่ควรนานเพราะถ้าให้เวลานานเชื้อทดสอบอาจจะเจริญไปก่อน ทำให้วงใสแคบกว่าปกติ

7. อุณหภูมิที่ใช้บ่มเพาะเชื้อควรใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการแพร่กระจายของสารปฏิชีวนะ เนื่องจากอุณหภูมิต่ำจะเพิ่มความหนืดของอาหารทำให้สารปฏิชีวนะแพร่กระจายช้า ทำให้วงใสแคบกว่าปกติ

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีททั้ง 27 ไอโซเลต พบว่าแอคติโนมัยซีทแต่ละไอโซเลตมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแตกต่างกัน โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลต R7-17 มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ 1/128 dilution unit/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าแอคติโนมัยซีทตัวอื่น ๆ หมายความว่าไอโซเลตนี้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดโดยมีปริมาณน้อยที่สุดก็สามารถยับยั้งการเจริญของ S. aureus ได้

จากผลการบ่งบอกในระดับจีนัสของแอคติโนมัยซีทไอโซเลต R7-17 ด้วยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าอยู่ในจีนัส *Streptomyces sp.* ซึ่งเป็นจีนัสที่พบได้มากในธรรมชาติ ซึ่งแต่ละสปีชีส์มีความแตกต่างกันทางสัณฐาน สรีระวิทยา และชีวเคมี เมื่อดมกลิ่นของไอโซเลตนี้จะมีกลิ่นคล้ายดินไถเบิกใหม่ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Streptomyces* และมีการสร้างสปอร์เป็นสายยาวมีลักษณะเป็นลูกโซ่ หรือสปอร์เป็นสายบิดเป็นเกลียวบน aerial mycelium

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ผลการวิจัยทำให้ทราบว่าแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งจุลชีพอื่น ส่วนใหญ่จะเป็นแอคติโนมัยซีทที่อยู่ในจีนัส *Streptomyces* ดังรายงานของศิโรรัตน์ (2541) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับผลการยับยั้งของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลนต่อการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด พบว่าแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้คือยู่ในจีนัส *Streptomyces* และรัตนภรณ์ (2541) ได้ศึกษาและแยกแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ผลที่ได้คือแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานของสิรินภรณ์ (2543) ที่ทำการวิจัยเกี่ยวกับผลการยับยั้งของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินต่อการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ พบว่ากลุ่ม *Streptomyces* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis, M. luteus, S aureus* และ *S. cerevisiae* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยซีท กลุ่ม *Streptomyces* มีประโยชน์มากในการผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์และอุตสาหกรรม จากผลการวิจัยนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาในขั้นสูงต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยซีท จำนวน 286 ไอโซเลต ที่แยกได้จากดินภายในสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม (ทุ่งทะเลแก้ว) จังหวัดพิษณุโลก 8 แหล่งจำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่ามีแอคติโนมัยซีท 27 ไอโซเลตสร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* โดยที่ไอโซเลต R7-17 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดโดยมีขนาดความกว้างของวงใสเท่ากับ 18 มิลลิเมตร เมื่อนำไปหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้มีค่าเท่ากับ 1/128 dilution unit/ml. จากการตรวจสอบทางด้านลักษณวิทยา สามารถบ่งบอกชนิดในระดับจีนัสของไอโซเลต R7-17 ได้พบว่าอยู่ในจีนัส *Streptomyces*

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ข้อเสนอแนะ

การทำวิจัยในครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียว เชื้อที่ใช้ทดสอบเพียงชนิดเดียว ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะด้วย ถ้าหากมีการวิจัยต่อไปควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลาย ๆ ชนิด และหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารปฏิชีวนะ และใช้เชื้อทดสอบมากกว่า 1 ชนิด เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารปฏิชีวนะพวกที่มีผลยับยั้งแคบหรือกว้าง นอกจากนั้นควรทำการศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่แอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกมีการสร้างสารปฏิชีวนะในปริมาณสูงสุด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในทางการแพทย์รักษาโรคต่าง ๆ รวมทั้งด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 2540. **การเก็บรวบรวมและรักษาสายพันธุ์ *Actinomycetes* ในดิน.** ประมวลข่าว 13(2): 10 - 11.

กนกรัตน์ ศิริพานิชการ. 2541. **โรคติดเชื้อ.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 18-95.

จรัสโฉม ทองเหลือง. 2539. **สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะของ *Myxococcus virescens* และ *M. macrosporus*.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ครุณี เทพปาน. 2541. **การคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสจากดิน ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. **จุลชีวอุตสาหกรรม:ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 104 - 139.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 102 - 108.

ธัญวัฒน์ ใจใส. 2541. **ผลการยับยั้งของ *Bacillus subtilis* ต่อการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด.** วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 535-542.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2536. **จุลชีววิทยาสำหรับพยาบาลศาสตร์ และสาธารณสุขศาสตร์.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 220-239.

พัชรี สุนทรนันท์. 2526. **การแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila*.** วิทยาศาสตร์ ม.ก. 2(3): 18 - 18.

พลับพลึง เทพวิทักษ์กิจ. 2540. **การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสโดยเชื้อ *Streptomyces* sp.MH2-16.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มรกต สุกโชติรัตน์ และครุณี เทพปาน. 2543. **การผลิตสารปฐมภูมิและทุติยภูมิบางชนิดในกระบวนการสร้างและสลายของจุลินทรีย์:สารปฏิชีวนะจากเชื้อบาซิลลัสที่แยกได้จากดิน.** รายงานการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์. 2541. การเก็บรวมรวมและการตรวจหา Actinomycetes จากดินป่าชายเลนที่สามารถยับยั้งจุลชีพ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 6(1) :23-33.

มาลิน จุลศิริ. 2532. **ยาต้านจุลชีพ.ภาควิชาจุลชีววิทยา.** มหาวิทยาลัยมหิดล. 203 หน้า.

วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2542. **การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม.** ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวาพร ศิวเวชช. มปป. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** ศูนย์วิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหารแห่งประเทศไทย. หน้า 261 - 279.

สายสมร ลำยอง. 2524. **สารปฏิชีวนะและปฏิกิริยาการต่อต้านจุลินทรีย์.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สิรินภรณ์ บัตรสูงเนิน. 2543. **ผลยับยั้งของ Streptomyces ที่แยกได้จากดินต่อการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์.** วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก.** สหมิตรออฟเซต. กรุงเทพฯ. 250 หน้า.

อัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ. 2528. **การค้นหาเชื้อบาซิลลัสชายพันธุ์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะจากดินในเขตพื้นที่ 4 จังหวัด.** คณะสาธารณสุขศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

อุไรวรรณ วิจารณกล. 2534. **ปฏิบัติการจุลชีวิทยา.** ภาควิชาชีววิทยา วิทยาลัยครูพิบูลสงคราม. พิษณุโลก.

Alcamo, E. 1994. Foundamentals of Microbiology. 4th edition. The Benjamin/Cummings. Publishing Company, Inc. USA. p. 689-709.

Bates, J., J. Z. Jordens. And D. T. Griffiths. 1994. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin – resistant enterococcal infection in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 34:507-514.

Chopra, I., J. Hodgson., B. Metcalf. And *G*. Poste. 1997. The search for antimicrobial agent effective againt bacteria resistant to multiple antibiotecs. *Antimicrobial* Agent *and Chemotherapy.* 41(3):497-503.

Coleman, K., M. Athalye., A Clancey., M. Davison. and D. I. Payne. 1994. Bacterial resistance mechanisms as therapeutic target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 333:1091-1116.

Davis, W. W and T.R. *Stout.* 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. *Applied Microbiology.* 22 (4) : 659 – 665.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Gottlieb, D. 1976. The production and role of antibiotics in soil. *The Journal of Antiobitics*. 29(10):987 - 1000.

Hansen, J. N. 1994. Nisin as food preservative. *Critical Reviews Food Science Nutrition*. 34(1):69 - 93.

Hayakawa, M. ,T. Kajiura. and H. Nonomura. 1991. (a). New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangium* and *Dactylosporangium* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72(5):327 - 333.

Hayakawa, M. ,T. Sadakata., T. Kajiura. and H. Nonomura. 1991(b). New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72(5):320 - 326.

Holt. 3. G. .N. R.Krieg., P.H. A. Sneath., J. T. Staley. And S. T. Williams.1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Williams& Wilkins. Baltimore, p. 605-623.

Huck, T. A., N. Porter. and M. E. Bushell. 1991. Positive selection of antibiotic producing soil isolate. *Journal of General Microbiology*. 137(Pt 10):2321 - 2329.

Isaac, S. and D. Jennings. 1995. Microbial Culture. Bios Scientific Publishers Limited. UK. 133 pp.

Kalakoutskii, D. V. and N. Agre. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Review*. 40(2):469-524.

Koneman, E. W., H. M. Sommers., S. D. Allen. and V. R. Dowell. 1983. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2th edition. J.B.-Lippincott Company. Philadelphia. p. 425 - 458.

Levy, S. B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36(4):695-703.

Martin, J. F. and A. L. Demain. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*. 44:230-251.

Pickup, K., R. D. Nolan. and M. E. Bushell. 1993.A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *Streptomyces* isolates in new antibiotic screen. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 76(2):89 - 93.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Piddock, L. J. V. 1996. Does the use of antimicrobial agent in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic - resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 38:1 - 3.

Rao, K. V. W. P. Cullen. and B. A. Sobin. 1961. A new antibiotic with antitumor properties. *Antibiotics and Chemotherapy*. 12(3):182 - 186.

Rodthong, S. P. Sunthornandh., B. Yongsmith. and L. Maksongsri. 1984. Selection of antibacterial antibiotic producing actinomycetes from Thai soils. *Microbial Utilization of Renewable Resource*. 4:327 - 334.

Ryan, W. L, P. T. Williams. and H. J. Igel. 1961. A disposable tube dilution test *Antibiotic and Chemotherapy*. 11(5):307 – 311.

Sneader, W. 1985. Drug Discovery. The Evolution of Modem Medicines. John Wiley & Sons. New York. p. 7 - 27.

Tortora, G. J., B. R. Funke. and C. L. Case. 1992. Microbiology. 4th edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc. California p. 672 - 676.

Stabb, E. V., L. M. Jacobson. and J. Handelsman. 1994. Zwittermicin A producting strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied Environmental Microbiology*. 60(12): 4404-4412.

Williams, S. T., M. E. Shape. and J. G. Holt. 1989. Bergey's manual *and* Systematic Bacteriology. Volumn 4. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. p. 2333 - 2469.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1.1 Hickey – Tresner's medium (HT agar)

Dextrin	10	g.
Yeast extract	1.0	g.
Beef extract	1.0	g.
N – Zamine	2.0	g.
$CoCl_2.6H_2O$	0.02	g.
Agar	15.0	g.
Distillated water	1,000	ml.

pH 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{0}C เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Glucose soybean medium (GSM)

Glucose	20.0	g.
Soybean	20.0	g.
NaCl	4.0	g.
K_2HPO_4	0.05	g.
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	g.
$CaCO_3$	5.0	g.
Distillated water	1,000	ml.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{0}C เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

1.3 Nutrient agar

Beef extract	3.0	g.
Peptone	5.0	g.
Agar	15.0	g
Distillated water	1,000	ml.

(pH 6.8)

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน โดยนำไปต้มจนวุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

1.4 Trypticase soy broth

Trypticase soy medium	30.0	g.
Distillated water	1,000	ml.

ละลายอาหารในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ภาคผนวก ข

การเตรียม Paper disc

1. นำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 มาเจาะด้วยเครื่องเจาะกระดาษ (paper punch) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 มม.

2. นำแผ่นกระดาษกรองที่เจาะได้บรรจุลงในจานอาหาร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาอบให้แห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ภาคผนวก ค

คุณสมบัติที่ใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยซีส

ตารางที่ 5 คุณสมบัติที่ใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยซีสในระดับจีนัส (Hoh *et al.*, 1994)

Diagnostic Amino acid	Diagnostic Sugar	Typical key morphological feature and additional Chemical properties	Possible genetic assignment (group number)
No DAP*	NA*	Only substrate mycelium formed;breaks into motile elements	*Oerskovia* (22)
		Only substrate mycelium formed;breaks into motile cocoid elements in older cultures	*Jonesia* (22)
		Sterile aerial mycelium formed; substrate mycelium breaking up into nonmotile elements	*Promicromonospora* (22)
	Xylose	Sporangia with motile spores	*Actinoplanes* (24)
	Madulose	chains of conidia on the aerial mycelium	*Actinomadura* (26)
L-DAP	NA	Both aerial and substrate mycelia breaking up into fragments	*Nocardioides* (22)
		Only substrate mycelium formed; breaks into rods and cocci	*Terrabacter* (22)
		Only substrate mycelium formed bearing terminal or subterminal vesicles	*Intrasporangium* (25)
		Aerial mycelium with long chains of spores	*Streptomyces* (25 *Kitasatosporia* (29)
		Sclerotia formed (*Chainia* type)	*Streptomyces* (25)
		Very short chains of large conidia formed (*Micromonosporia* type) on aerial and vegetative mycelium	*Streptomyces* (25)
		Whorls of straight chains of conidia formed	*Streptoverticillium* (25)
		No aerial mycelium; club-shaped sporagia formed terminally on the vegetative mycelium	*Kineosporia* (25)
		Aerial mycelium only. motile elements formed	*Sporichthya* (25)
meso-DAP*	Xylose and Arabinose	No sporangia; single conidia formed on substrate mycelium, often in large black mucoid masses	*Micromonospora* (24)
		No sporangia; short chains of conidia formed protruding from The surface of the colonies	*Catellatospora* (24)
		Chains of conidia on aerial mycelium	*Glycomyces* (29)
		Dactyloid oligosporic sporangia protruding from the surface of the colonies; spores motile	*Dactylosporangium* (24)
		Sporangia containing spherical motile spores formed on the surface of colonies	*Actinoplanes* (24)
		Same; rod-shaped sporangiospores motile by polar flagella	*Ampullariella* (24)
		Same; sporangiospores with lateral flagella	*Pilimelia* (24)
		Multilocular sporangia formed; spores nonmotile	*Frankia* (23)

* Abbreviations DAP, Diaminopimelic acid ; NA, not applicable; NMA, nocardomycolic acid

May also contain hydroxy forms of DAP that may even replace *meso*-DAP

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 5 (ต่อ) คุณสมบัติที่ใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยซีสในระดับจีนัส

Diagnostic Amino acid	Diagnostic Sugar	Typical key morphological feature and additional Chemical properties	Possible genetic assignment (group number)
meso-DAP	Madurose	Short chain of conidia on aerial mycelium, often curled into crozier	*Actinomadura* (26)
		Chains of conidia with only two spores	*Microbispora* (26)
		Chains of conidia mainly with four (2-6) spores	*Microtetraspora* (26)
		Sporangia formed with two motile spores	*Planobispora* (26)
		Sporangia formed with only one motile spore	*Planomonospora* (26)
		Spherical sporangia formed on aerial mycelium containing many motile rod-shape spores	*Spirillospora* (26)
		Spherical sporangia formed on aerial mycelium containing many aplanospores	*Streptosporangium* (26)
		Multilocular sporangia formed	*Dermatophilus* (23) *Frankia* (23)
meso-DAP	Fucose	Multilocular sporangia formed	*Frankia* (23)
		Sporangia formed with motile spores	*Actinoplanes* (24)
	Rhamnose and galactose	Both aerial and substrate hyphae fragment into nonmotile elements	*Saccharothrix* (29)
	Rhamnose, Galactose and mannose	*Streptomyces* type of morphology	*Streptoalloteichus* (27)
	Galactose	*Streptomyces* type of morphology	*Kitasatospora* (29)
	Arabinose and galactose	NMA* present; morphology ranging from fugaceous substrate mycelium only to Streptomyces-like	*Norcadia* (22)
		NMA present; soft salmon to pink organisms	*Rhodococcus* (22)
		NMA present; soft substrate mycelium formed, which break into rod and cocci	*Gordona* (22)
		NMA present; soft substrate mycelium formed, which break into single, paired, or massed rods	*Tsukamurella* (22)
		NMA present; paired spores formed on substrate mycelium; aerial mycelium sparse	*Actinobispora* (22)
		NMA absent; long cylindrical spores on the aerial mycelium; spores formed by budding	*Pseudonocardia* (22)
		NMA absent; single spores formed mainly on the aerial hyphae	*Saccharomonospora* (22)
		NMA absent; very long chains of conidia on the aerial mycelium	*Saccharopolyspora* (22)
		NMA absent; long chains of conidia on the aerial mycelium, halophile	*Actinopolyspora* (22)
		NMA absent; substrate mycelium tends to break into nonmotile elements; aerial hyphae may be formed and may also segment	*Amycolata* (22) *Amycolatopsis* (22)

* Abbreviations : DAP, Diaminopimelic acid ; NA, not applicable, NMA, mocardomycolic acid.

May also contain hydroxy forms of DAP that may even replace *meso*-DAP

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ตารางที่ 5 (ต่อ) คุณสมบัติที่ใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยซีสในระดับจีนัส

Diagnostic Amino acid	Diagnostic Sugar	Typical key morphological feature and additional Chemical properties	Possible genetic assignment (group number)
		NMA absent; aerial mycelium bearing curled hyphae embedded in an amorphus matrix	*Kitdekusporangium* (29)
		NMA absent; long chains of spores formed on aerial and substrate mycelium; spores become motile in an aqueous environment	*Actinokineusporia* (22)
		NMA absent; aerial mycelium tends to fragment into rods and cocci ; short chains of spores also formed	*Pseudonocardia* (22)
	No diagnostic sugar	Single conidia formed; these are heat-resistant bacterial endospores.	*Thermoactinomyces* (28)
		Same as above but the spores are not heat-resistant	*Thermomonospora* (27)
		Long chains of spores formed by the aerial hyphae	*Nocardiopsis* (27)
		Aerial hyphae, often united into synnemata releasing motile spores	*Actinosynnema* (27)
		Multicular sporangia releasing motile spores	*Geodermatophilus* (27)

* Abbreviations : DAP, Diaminopimelic acid : NA, not applicable; NMA, nocardamycolic acid

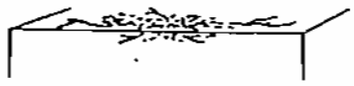
* May also contain hydroxy forms of DAP that may even replace meso-DAP

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ภาคผนวก ง

ลักษณะของแอคติโนมัยซีทในจีนัสต่าง ๆ

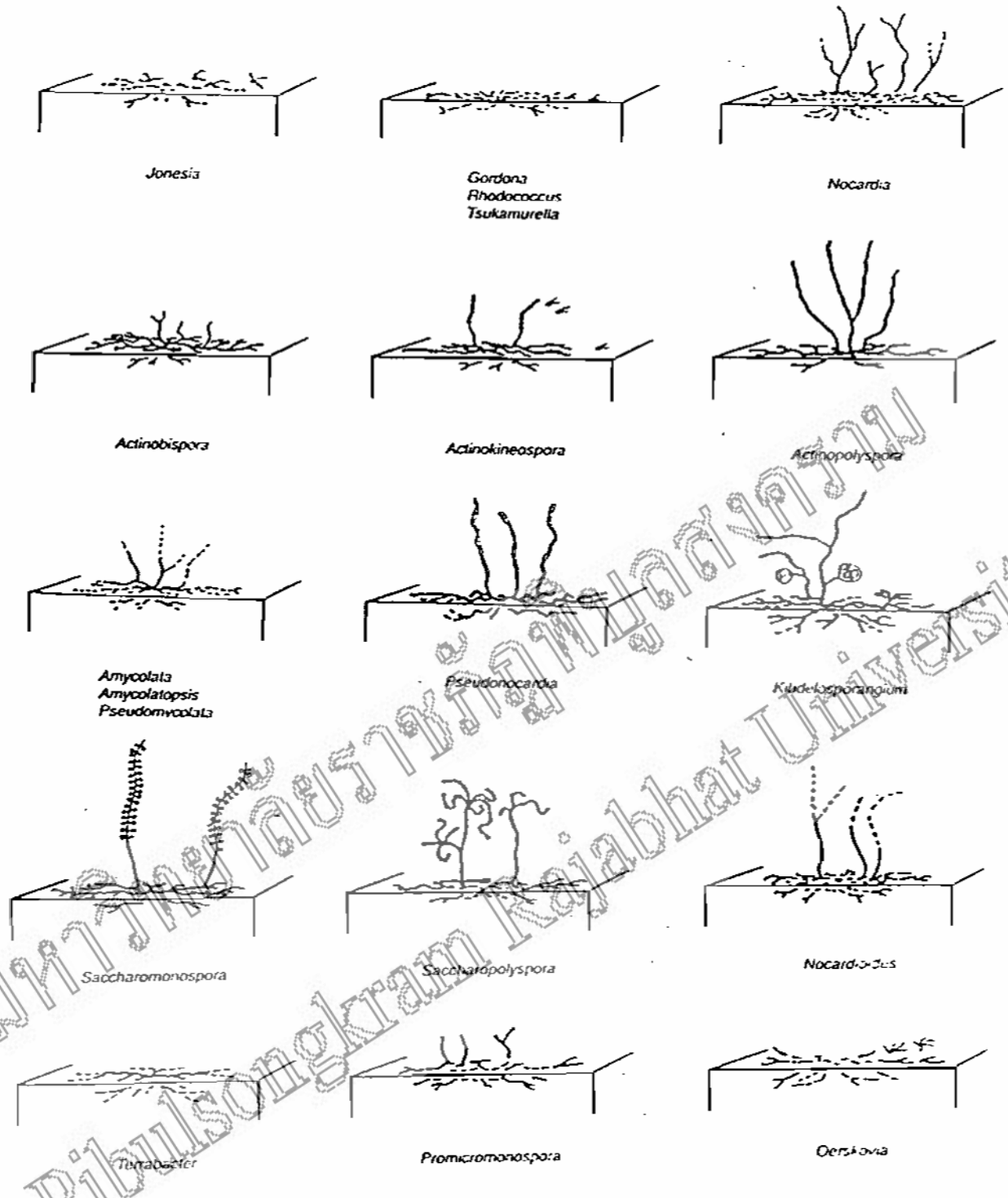
ลักษณะของแอคติโนมัยซีทในจีนัสต่าง ๆ (Holt et.al., 1994)



Actinomyces
Rothia
Agromyces

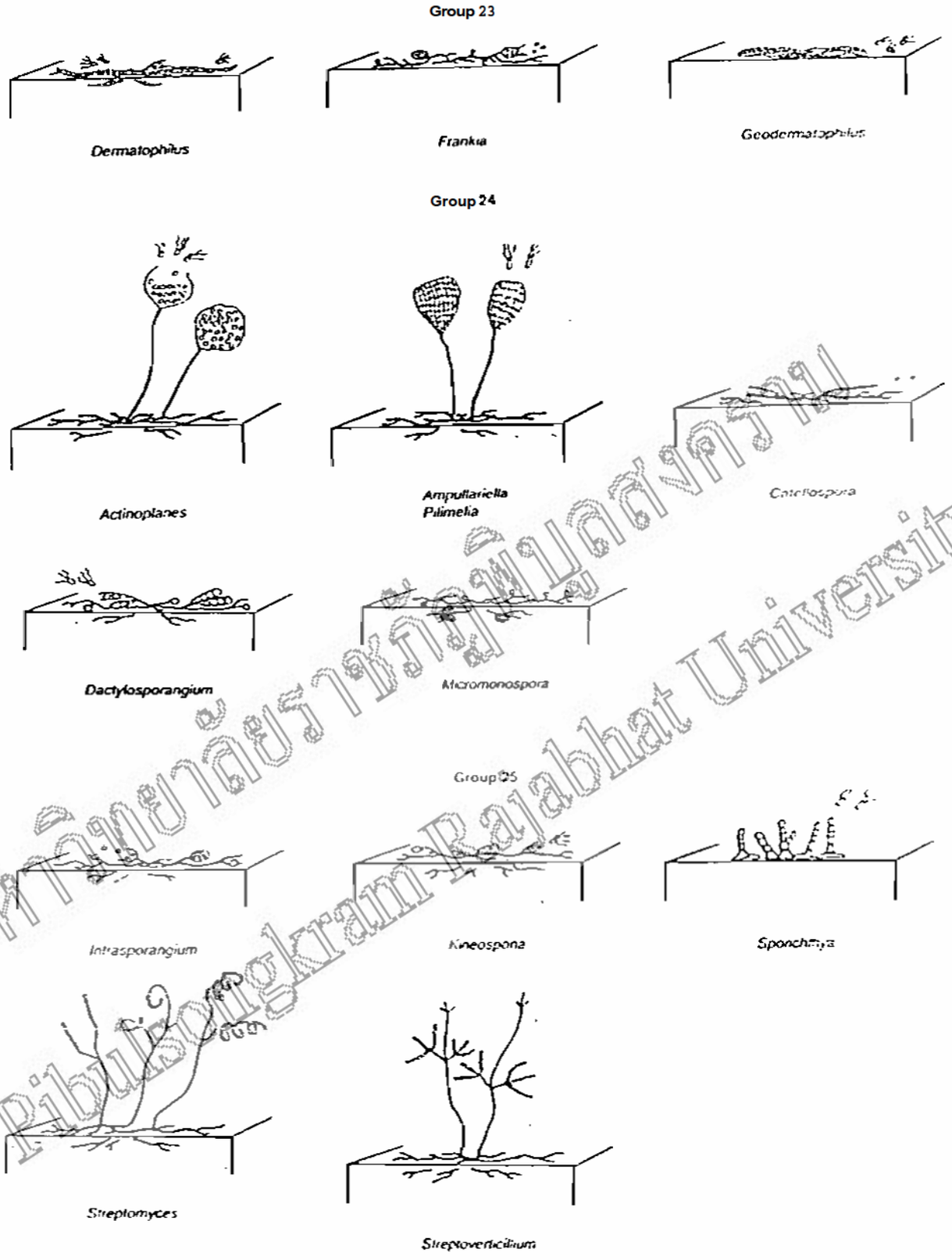
ภาพที่ 8 ลักษณะของแอคติโนมัยซีสกลุ่ม 20

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University



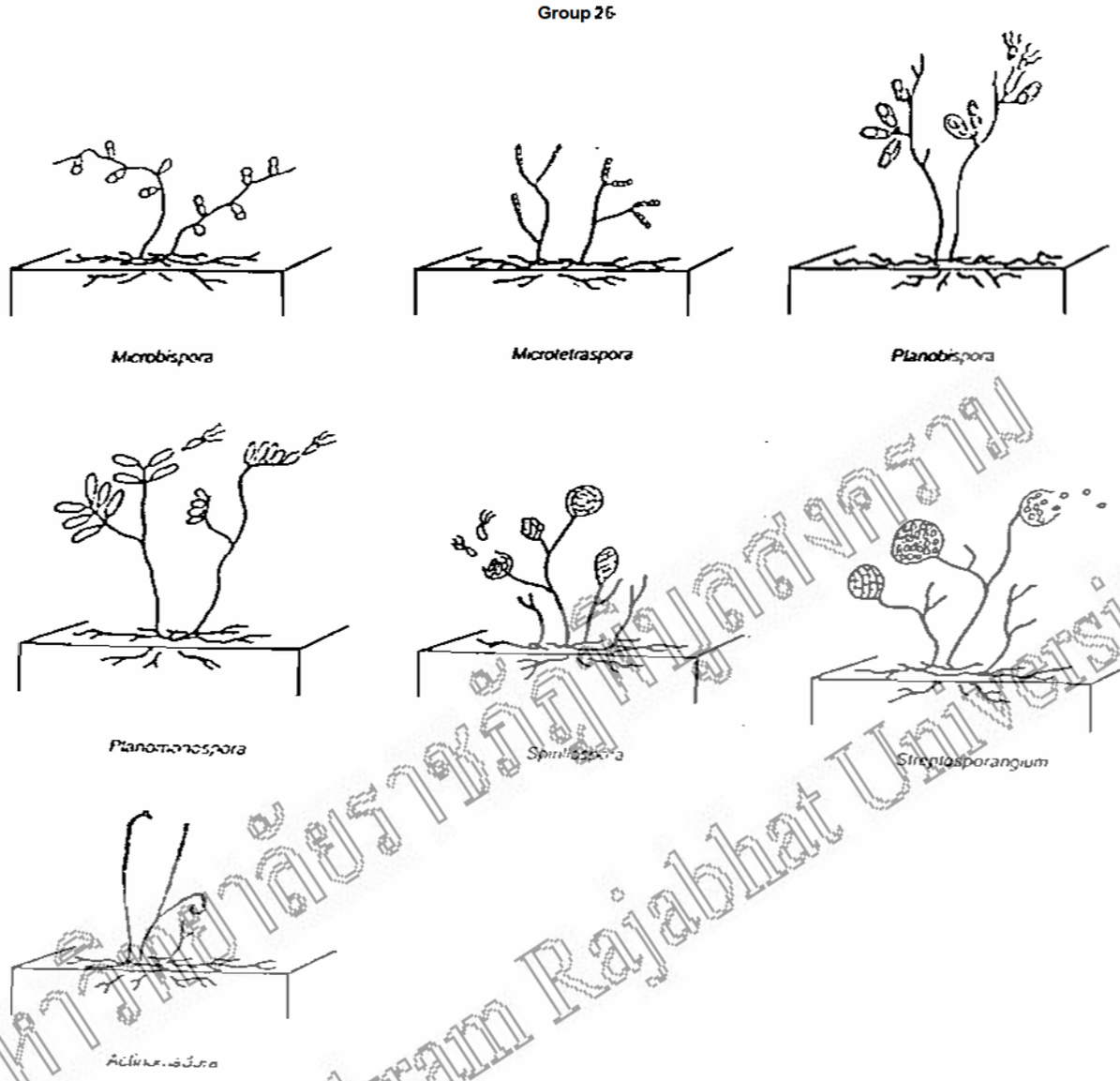
ภาพที่ 9 ลักษณะของแอคติโนมัยซีสกลุ่ม 22

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



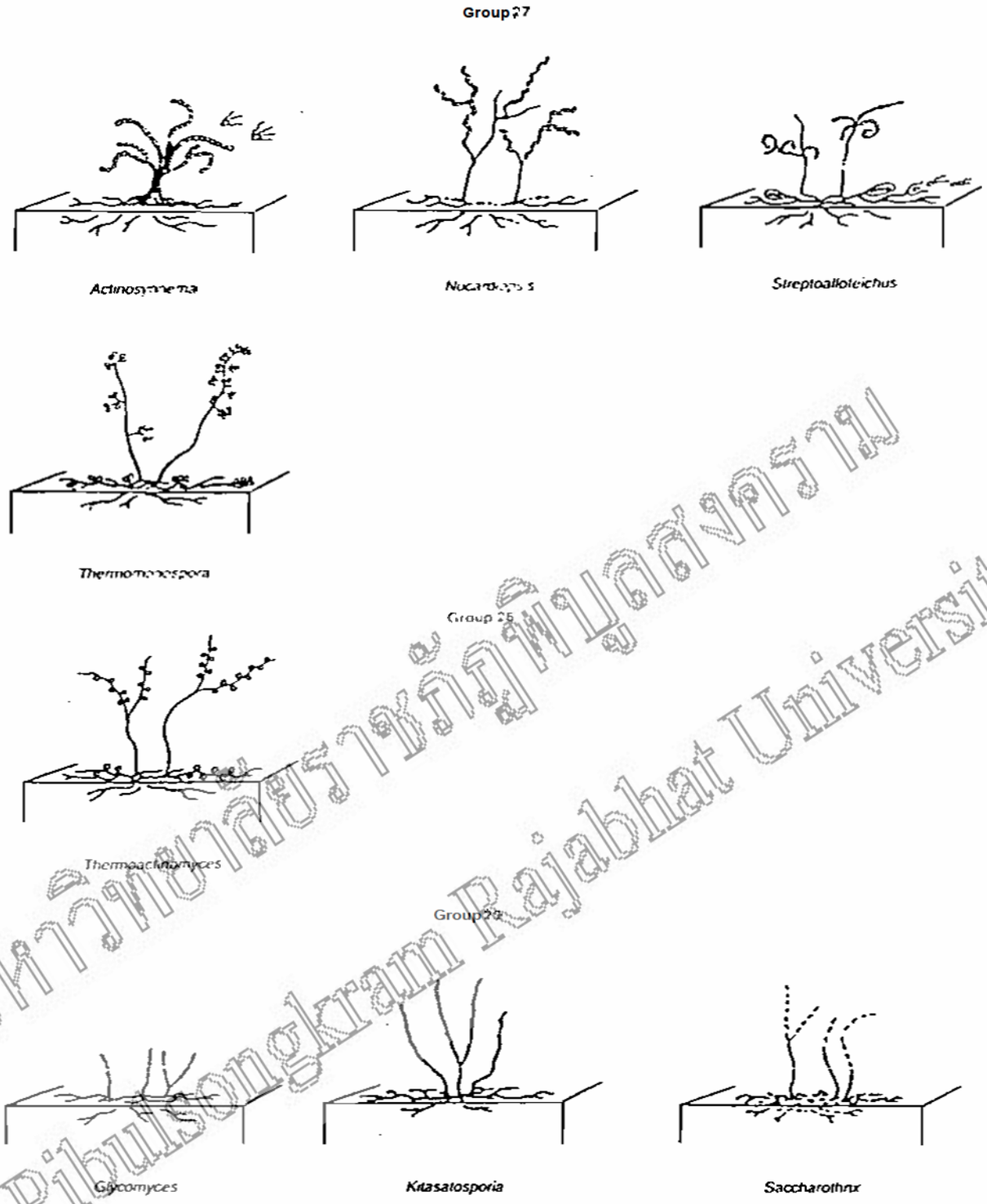
ภาพที่ 10 ลักษณะของแอคติโนมัยซีสกลุ่ม 23 24 และ 25

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ Buriram Rajabhat University



ภาพที่ 11 ลักษณะของแอคติโนมัยซีสกลุ่ม 26

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University



ภาพที่ 12 ลักษณะของแอคติโนมัยซีสกลุ่ม 27 28 และ 29

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ภาคผนวก จ

คุณสมบัติของ *Streptomyces* sp.

ตารางที่ 6 คุณสมบัติของ Streptomyces sp. (Williams *et.al.*, 1989)

Characters	Characters states
1. Spore chain morphology	Rectiflexibles, Retinaculiaperti. a Spirales
2. Spore surface ornamentation	Smooth, warty, spiny, hairy or rugose
3. Other morphological features	Fragmentation of substrate mycelium, sclerotia formation, sporulation on substrate mycelium.
4. Color of spore mass	Blue, gray, green, red, violet, white or yellow
5. Pigmentation of substrate mycelium (colony reverse)	Yellow-brown (no distinctive pigment), blue, green, red-orange, a violet. PH sensitivity of pigments.
6. Diffusible pigments	Yellow-brown, blue, green, red-orange, or violet. PH sensitivity of pigments.
7. Melanin pigment production	On peptone-yeast extract-iron *agar* and tyrosine agar.
8. Antimicrobial activity	Activity against *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Streptomyces murinus*.
9. Enzyme activity	Lecithinase, lipolyase, and proteolysis (on egg-yolk medium) Hydrolysis of chitin, hippurate, and pectin. Nitrate reduction. Hydrogen sulfide production. β-Lactamase, and β-Lactamase Inhibitor Production.
10. Degradation activity	Adenine, allantoin, arbutin, casein, DNA, elastin, esculin, gelatin. guanine, hypoxanthine, RNA, starch, testosterone, Tween 80, L-tyrosine urea, xanthine, and xylan.
11. Resistance to antibiotics (μg/ml)	Chephaloridine (100), dimethylchlorotetracycline (500), gentamicin (100), lincomycin (100), neomycin (50), oleandomycin (100). penicillinG (10 i.u.), rifampicin (50), Streptomycin (100), tobramycin (50), and vancomycin (50)
12. Growth temperature and pH	4°, 10°, 37°, and 45°C, pH 4.3
13. Growth in presence of inhibitory Compound (%w/v)	Crystal violet (0.0001), phenol (0.1), phenylethanol (0.1.0.3). potassium tellurite (0.001.0.01). sodium azide (0.01, 0.02), sodium Chloride (4, 7, 10, 13), and thallous acetate 10.001, 0.01)
14. Use of nitrogen sources (0.1% w/v)	DL-α-amino-n-butyric acid, L-arginine, L-crysteine, L-histidine L-hydroxyproline, L-methionine, potassium nitrate, L-phenylalanine L-serine, L-theronine, and L-valine
15. Use of carbon sources (1.0%w/v)	Adonitol, L-arabinose, cellobiose, dextran, D-fructose, D-mannose, D-melezitose, D-melibiose, raffinose, L-rhamnose, salicin, sucrose, trehalose, xylitol, and xylose. Sodium acetate, sodium citrate, sodium malonate, sodium propionate, and sodium pyruvate (these 5 compound were used at 0.1% w/v)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ประวัติผู้วิจัย

1. ประวัติส่วนตัว ชื่อ นางชนิกานต์ นามสกุล คุ้มนก

Mrs. Chanikarn Koomnok

เกิดวันที่ 3 เมษายน 2507 อายุปัจจุบัน 37 ปี

เชื้อชาติ ไทย สัญชาติ ไทย

2. ประวัติการทำงาน

ปี พ.ศ. 2529-2535 ผู้ช่วยวิจัย

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปี พ.ศ. 2535-2539 ธุรกิจส่วนตัว

ร้าน NL คอมพิวเตอร์ บริการถ่ายเอกสารและคอมพิวเตอร์

อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

ปี พ.ศ. 2539-2540 นักเกษตร ศูนย์บริหารศัตรูพืชโดยชีววิธี

กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ปี พ.ศ. 2540-ปัจจุบัน รับราชการ อาจารย์ 1 ระดับ 5 โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

3. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. 2529 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สาขาปฐพีศาสตร์และอนุรักษ์ศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปี พ.ศ. 2539 จบการศึกษาระดับปริญญาโท

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปี พ.ศ. 2543 กำลังศึกษาต่อระดับปริญญาเอก สาขาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

4. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

<u>งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว</u>

1) เรื่อง คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการระหว่างการเจริญเติบโตของเห็ดหอม (*Lentinus edodes* Berk.Sing.)

ปี พ.ศ. 2533

สถานภาพในการทำวิจัย ผู้ร่วมวิจัย

2) เรื่อง สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาแมนโนซิเดสจากเชื้อราไอโซเลต AD-3S บนอาหารแข็ง

ปี พ.ศ. 2539

สถานภาพการทำวิจัย ผู้ทำวิทยานิพนธ์

3) เรื่อง การศึกษาคุณภาพน้ำทางด้านแบคทีเรียของน้ำดื่มจากร้านอาหารในเขตอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างเดือนตุลาคมถึงธันวาคม 2541

ปี พ.ศ. 2541

สถานภาพการทำวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย

4) เรื่อง การคัดเลือกเชื้อรางอุณหภูมิสูงที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ปี พ.ศ. 2543

สถานภาพการทำวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย

<u>งานวิจัยที่กำลังทำ</u>

1) เรื่อง แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ครึ่งในโตรเจนในข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวพันธุ์ป่าในประเทศไทย

ปี พ.ศ. 2543

วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอก

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University