สำนักวิจัย
สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม
รับที่ 19 (2)
วันที่ 16 ก.ย. 2545
เวลา 10.00 น.

สำนักวิจัยและบริการวิชาการ

รายงานการวิจัยเรื่อง

การแยกแบRMีเรียในดินที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp.

(The Isolation of Soil Bacteria Producing Antibiotic 'that Inhibit the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Fusarium* sp.)

นฤมล เถื่อนกูล
โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม
พ.ศ. 2545

การแยกแบคทีเรียในดินที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้ง

***Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp.**

(The Isolation of Soil Bacteria Producing Antibiotic that Inhibit the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Fusarium* sp.)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

นฤมล เถื่อนกูล (วท.บ., วท.ม. ชีววิทยา)
โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

พ.ศ. 2545

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการบริหารงานวิจัย ท่านอธิการบดี สถาบันราชภัฏพิบูลสงครามที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงครามที่ได้ให้ความกรุณา อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณคงศักดิ์ ดีธงทอง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยและรูปเล่มงานวิจัย

สุดท้ายขอขอบคุณ บิดา มารดา สามีและบุตรี ที่ให้กำลังใจในการทำงานวิจัยในครั้งนี้มาตลอด

นฤมล เถื่อนกูล

2545

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ชื่อเรื่อง	การแยกแบคทีเรียในดินที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp.
ผู้วิจัย	นางนฤมล เถื่อนกูล
โปรแกรม	ชีววิทยาประยุกต์
คณะ	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สถาบัน	สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม
ปีที่ทำวิจัย	2544
ปีที่พิมพ์	2545

บทคัดย่อ

จากการแยกแบคทีเรียในดินบริเวณสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม ส่วนทะเลแก้วและห้าแยกโคกมะตูม จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 7 แหล่งสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 139 ไอโซเลท นำมาทดสอบการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp. โดยวิธีการแพร่ของสารบนกระดาษแผ่นกลม (paper disc diffusion method) บนอาหารนิวเตรียนท์อาการ์ (nutrient agar) และอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar) ตามลำดับ พบว่ามี 2 ไอโซเลท คือไอโซเลท B1 และ B8 สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสเท่ากับ 18.2 และ 20.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ 10 ไอโซเลทสามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. ได้โดยไอโซเลท A12 สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. ได้ดีที่สุดโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสเท่ากับ 6.3 มิลลิเมตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

Research title The Isolation of Soil Bacteria Producing Antibiotic that Inhibit the Growth of Staphylococcus aureus and *Fusarium* sp.

Author Mrs. Naruemol Thaunkoon.

Program Applied Biology.

Faculty Science and Tecnology.

Institute Rajabhat Institute Pibulsongkram .

Year 2001

Printed 2002

Abstract

Soil bacteria form Rajabhat Institute Pibulsongkram and Kogmatoom Intersection Phitsanulok District were 139 isolated. They were tested the growth inhibition of Staphylococcus aureus and *Fusarium* sp. by paper disc diffusion method on nutrient agar and potato dextrose agar respectively. It was found 2 isolates that isolated B1 and B8 were inhibition of Staphylococcus aureus . The clear zone were 18.2 and 20.4 milimetre respectively. And 10 isolates were inhibition of *Fusarium* sp. that isolated A12. The clear zone was 6.3 milimetre.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญ

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ประวัติยาปฏิชีวนะ	2
2.2 แบคทีเรียและราที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งด้วยสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียในดิน	7
2.3 วิธีการทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียและรา	12
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย	19
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	28
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม	
ประวัติผู้วิจัย	30

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้าที่

2.1 ยาปฏิชีวนะที่ผลิตโดยจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ 4
2.2 ยาปฏิชีวนะต่างๆ ที่ใช้ในอาหารสัตว์ 6
4.1 แสดงรหัส แหล่งที่เก็บและจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้ 19
4.2 เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสเฉลี่ยของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp. 20

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้าที่

2.1 ชนิดของคอนนิเดีย *Fusarium* sp. 10

2.2 อาการของโรคในมะเขือเทศ 11

4.1 ลักษณะแบคทีเรียที่คัดเลือกได้นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวนิวเตรียน์บรอทร์ (nutrient broth :NB) 21

4.2 การทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Staphylococcus aureus* 21

4.3 การทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Fusarium* sp. 22

4.4 ลักษณะแบคทีเรียไอโซเลท B8 บนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียน์เอการ์ (nutrient agar : NA) 23

4.5 ลักษณะแบคทีเรียไอโซเลท B8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า 23

4.6 ลักษณะแบคทีเรี่ยไอโซเลท A12 บนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียน์เอการ์ (nutrient agar : NA) 24

4.7 ลักษณะแบคทีเรียไอโซเลท A12 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า 24

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 1
บทนำ

สารปฏิชีวนะเป็นสารเคมีที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในกระบวนการสร้างและสลายทุติยภูมิ (secondary metabolism) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในดิน ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ต่างๆ ที่เกิดปฏิกริยาชีวเคมีที่ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ทำให้เกิดสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของพืช ส่วนประโยชน์ของสารปฏิชีวนะ ด้านการเกษตร เช่น การใช้สารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ในการยับยั้งโรคพืชและแมลงศัตรูพืช ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจ การใช้สารปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์แทนการใช้สารเคมีที่มีราคาค่อนข้างแพงและยังมีผลต่อสุขภาพผู้บริโภค อีกทั้งทางด้านการแพทย์ยังมีการใช้สารปฏิชีวนะในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคที่เกิดกับมนุษย์โดยผลิตในรูปยารักษาโรค ส่วนจุลินทรีย์ที่ใช้ในศึกษาในครั้งนี้ **คือ** *Staphylococcus aureus* สาเหตุโรคอาหารเป็นพิษ และ *Fusarium* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียในดินที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการควบคุม *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp. และนำสารปฏิชีวนะไปศึกษาชนิดของสารเคมีเพื่อขยายผลในระดับสูงขึ้นได้

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

กรมส่งเสริมการเกษตร และ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 2
ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติยาปฏิชีวนะ (ดุษณี ,2537)

ยาปฏิชีวนะหมายถึงสารประกอบอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ในปริมาณความเข้มข้นต่ำ ในปัจจุบันยาปฏิชีวนะบางชนิดอาจใช้วิธีการสังเคราะห์ เช่น คลอแรมฟินิคอล (chlormphernicol) แต่ก็ยังคงเรียกยาปฏิชีวนะ เพราะถือตามแหล่งกำเหนิดครั้งแรก นอกจากนี้อนุพันธ์ของยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่สกัดโดยวิธีการสังเคราะห์หรือกึ่งสังเคราะห์ก็คงเรียกเป็นยาปฏิชีวนะเช่นกัน (อรุณี.2531; Russel, 1983) ซึ่งยาปฏิชีวนะบางชนิดจะนำมาใช้เป็นยาทำลายจุลินทรีย์เพียงกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเท่านั้น (อรพิน,2526) ในอุตสาหกรรมเภสัชกรรมยาปฏิชีวนะเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษกิจมากที่สุด มีการค้นพบยาปฏิชีวนะมากกว่า 8000 ชนิด แต่มีเพียง 123 ชนิดเท่านั้นที่มีการผลิตโดยกระบวนการหมักและอีก 50 ชนิดมีการผลิตโดยวิธีกึ่งสังเคราะห์ (Crueger and Crueger,1990) ยาปฏิชีวนะได้ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ.1929 โดย อเล็กซานเดอร์เฟรมมิ่ง (Alexander Fleming) เป็นผู้ค้นพบ *Penicillium notatum* สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของของ *Staphylococcus aureus* ได้และให้ชื่อยาปฏิชีวนะว่าเพนนิซิลลิน (pennicillin) ต่อมาในปี ค.ศ. 1940 ก็มีการผลิตเพนนิซิลินบริสุทธิ์ได้เป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาโดย *P. notatum* (Primrose,1987; 1991) ราชนิดนี้เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (obligate aerobe) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้จึงต้องเลี้ยงแบบ surface culture ซึ่งวิธีการนี้ค่อนข้างยุ่งยากและเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในปริมาณมากและใช้กันอยู่ทุกวันนี้ เนื่องจาก *P. notatum* ให้ผลผลิตในการผลิตเพนนิซิลินต่ำ โดยจะได้เพนนิซิลินเพียง 2 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ดังนั้นจึงมีการแยก *Penicillium* สายเชื้อต่าง ๆ เพื่อให้ได้เชื้อที่ให้ผลผลิตสูง โดยพบว่า *P. chrysogenum* เป็นสายเชื้อที่ให้ผลผลิตได้ดีเมื่อมีการปรับปรุงกระบวนการหมักและสายเชื้อที่แยกได้ พบว่าในการผลิตเพนนิซิลินโดย P. *chrysogenum* จะให้ผลผลิตสูงกว่า 20 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

หลังจากการค้นพบยาปฏิชีวนะเพนนิซิลินแล้ว บริษัทยาต่าง ๆ ก็เริ่ม ให้ความสนใจเกี่ยวกับยาปฏิชีวนะอย่างจริงจัง วักส์แมน (Waksman) และคณะได้คนพบ *Streptomyces griseus* ที่สามารถผลิตยาปฏิชีวนะสเทรปโทมัยซิน (streptomycin) ได้ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์นี้เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อราโดยจะสร้างใยราได้ อยู่ในกลุ่ม actinomycetes ที่อาศัยอยู่ในดิน แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ได้หลายร้อยชนิด โดย actinomycetes เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตยาปฏิชีวนะได้มากที่สุด 2ใน 3 ส่วนของยาปฏิชีวนะที่ค้นพบมาจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ รวมถึงยาปฏิชีวนะ

Pibulsongkram Rajabhat University

ที่สำคัญๆ เช่น อะมิโนกลัยโคซาย (aminogylycosides) แอนทราซัยคลินส์ (anthraclines) คลอแรมฟีนิคอล (chloramphenicol) เบตาแลกแทมส์ (β - lactams) มาโครไลด์ (macrolides) และ เตตราซัยคลินส์ (tetracyclines) (Okami and Hotta ,1988)

แหล่งจุลินทรีย์ที่สำคัญที่ผลิตยาปฏิชีวนะที่มีประโยชน์ส่วนใหญ่ได้แก่ actinomycetes (*Streptomyces*, Nocardia และ *Micromonospora*) และรา (*Penicillium* และ*Cepharsporium*) (ตารางที่ 2.1) ในปัจจุบันจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทะเลลึกก็เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่มีการศึกษาถึงความสามารถในการผลิตยาปฏิชีวนะ พบว่า *Pseudomonas bromoutilis* ที่แยกได้จากน้ำทะเลสามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกพวก Staphylococcus *aureus*, S. *pneumoniae* และ *S. pyogenes* ที่มีความเข้มข้น 00.063 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีผลต่อ Mycobacterium tuberculosis ที่ความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแต่สารนี้ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ (Austin,1988)

ในการแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตยาปฏิชีวนะได้มักแยกจากดินในแหล่งต่าง ๆ โดยอาศัยกรรมวิธีง่าย ๆ โดยนำตัวอย่างดินที่มีจุลินทรีย์อยู่มาละลายน้ำ และนำตัวอย่างดินที่แขวนลอยอยู่ในน้ำมาทำให้เจือจางลงไป นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาถ่ายใส่ในจานเพาะเชื้อ (petri dish)ที่มีอาหารวุ้นประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่ใส่ตัวอย่างแล้วมาบ่มเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเป็นโคโลนี (colony) ที่ผิวหน้าอาหารวุ้น ถ้าโคโลนีของเชื้อใดสามารถผลิตยาปฏิชีวนะได้ ยาปฏิชีวนะจะแพร่กระจายไปในอาหารวุ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อนั้นซึ่งเมื่อสเปรย์แบคทีเรียที่อ่อนแอลงไปบนผิวหน้าของอาหารวุ้นและบ่มเชื้อให้เจริญ บริเวณรอบ ๆ โคโลนีของจุลินทรีย์ที่สร้างยาปฏิชีวนะได้จะเกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนี (clear zone) เนื่องจากไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งวิธีนี้ก็จะสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตยาปฏิชีวนะจากตัวอย่างดินได้

คุณสมบัติของยาปฏิชีวนะที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

1. สามารถทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้หลายชนิด มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้กว้าง (broad spectrum)
2. เชื้อโรคที่ไวต่อยาจะต้องไม่เกิดการดื้อยา
3. เมื่อใช้ยาเป็นระยะเวลานานจะต้องไม่เกิดอาการข้างเคียง (side effect) ต่าง ๆ ที่ไม่พึงปรารถนา เช่น ประสาทสมองถูกทำลาย เกิดอาการแพ้ (allergic) หรือการระคายเคืองต่อระบบไตหรือระบบทางเดินอาหาร
4. จะต้องไม่ทำลายจุลินทรีย์ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกาย (normal flora) เนื่องจากจะทำให้เกิด

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

การเสียสมดุลของธรรมชาติ อันเป็นผลทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้

5. ต้องยังมีฤทธิ์เมื่ออยู่ในพลาสมา (plasma) และของเหลวในร่างกาย
6. ละลายน้ำได้และมีความคงตัว
7. ระดับการฆ่าเชื้อในร่างกายต้องเร็วและคงอยู่เป็นเวลานาน

ตารางที่ 2.1 ยาปฏิชีวนะที่ผลิตโดยจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ (Berdy,1985)

กลุ่มของจุลินทรีย์	จำนวนยาปฏิชีวนะ
แบคทีเรียต่าง ๆ ที่ไม่ใช่ Actinomycetes	950
Actinomycetes	4,600
31	1,600

การใช้ประโยชน์จากยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะนอกจากจะใช้ในการรักษาโรคแล้ว ยาปฏิชีวนะบางชนิดยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ใน ด้านอื่น ๆ ได้ (Crueger and Crueger,1990) เช่น

ก. ใช้ต่อต้านเนื้องอก (antitumor) ยาปฏิชีวนะจะมีประสิทธิภาพในการรักษาเนื้องอกบางชนิด ได้แก่ aclacinomycin (ผลิตจาก Stretomyces galilaeus) actinomycin C1,C2 และD (ผลิตจาก S. antibiotcus) และ adriamycin (ผลิตจาก S. penceticus) เป็นต้น

ข. ใช้ป้องกันโรคพืช **ยาปฏิชีวนะหลายชนิดสามารถนำมาใช้ในการป้องกันโรคพืชต่าง ๆ** ได้ดี กว่าสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นเนื่องจากใช้ปริมาณต่ำ มีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์เลือดอุ่นและแมลงที่มี ประโยชน์ นอกจากนี้ยังถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในดิน ยาปฏิชีวนะตัวแรกที่ใช้กับพืช คือ สเทรปโทร มัยซินที่ใช้ป้องกันโรคพืชที่เกิดจาก Pseudomonas sp. และ Xanthomonas oryzae ในปัจจุบันมี ยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการป้องกันโรคพืช ได้แก่ blasticidin **S** (ผลิตจาก *Streptomyces* griseochromogenes) ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในข้าว มีผลต่อ *Pyricularia* oryzae cycloheximide (ผลิตจาก S. *griseus*) ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในใบพืช และ polyoxin (ผลิตจาก S. cacaoi *var . asoensis*) ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราทั่วๆไป

ค. ใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) ได้แก่ pimaricin ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราที่ใช้กับ ผิวหน้าของอาหาร tylosin (มีผลต่อสปอร์ของ Bacillus) และ nisin (มีผลต่อ Clostridia) ใช้ใน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

อุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง chlortetracyline ใช้รักษาความสดของปลา เนื้อ และ ไก่ โดยนำมาผสมกับน้ำแข็งในปริมาณ 5 พีพีเอ็ม เป็นต้น การใช้ยาปฏิชีวนะเหล่านี้พบว่า pirnaricin และ nisin มีการนำมาใช้ทางการค้ามากกว่ายาปฏิชีวนะอื่น ๆ

ช. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญของสัตว์และใช้เป็นยาสัตว์ การเติมยาปฏิชีวนะลงไปในอาหารสัตว์ในปริมาณ 1 – 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอาหารสัตว์ จะช่วยให้น้ำหนักตัวของสัตว์เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากปริมาณเล็กน้อยของยาปฏิชีวนะที่สัตว์ได้รับเข้าไป จะมีผลทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลำไส้ของสัตว์เปลี่ยนแปลง ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตได้ดี ยาปฏิชีวนะที่มีการใช้ในอาหารสัตว์ในปริมาณมากได้แก่ เพนนิซิลิน เตตราซัยคลิน เออริโทรมัยซิน Pเทรปโทรมัยซิน หรือ เบซินตราซิน(baciracin) ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ในปริมาณมากอาจมีผลทำให้เชื้อโรคมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเหล่านี้สูงขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันยาปฏิชีวนะเหล่านี้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2 สำหรับยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นยาในสัตว์ได้แก่ hygromycin B , thiostrepton , monensin , lasalocide และ salinomycin

นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะยังสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาทางชีวเคมี และชีววิทยาระดับโมเลกุล รวมทั้งการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารเลี้ยงสัตว์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 2.2 ยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ที่ใช้ในอาหารสัตว์ (Crueger and Crueger,1990)

ยาปฏิชีวนะ	จุลินทรีย์ที่ผลิต
Enduracidin	Streptomyces *fungicidicus*
Mikamycin	S. mitakaensis
Siomycin	S. *sioyaensis*
Thiopeptin	S. *tateyamensis*
Thiostrepton	S. *azureus*
Virginiamycin	S. *virginiae*
Macarbomycin	S. phaeochromogenes
Moenomycin	S. bambergiensis
Quebemycin	S. viridans
Tylosin	S. fradiae
Mocimycin	S. *ramocissimus*

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ยาปฏิชีวนะ (antibiotic)

ยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่ผลิตขึ้น โดยจุลินทรีย์มีกลไกการทำลายเชื้อโรคด้วยวิธี ต่าง ๆ คือ

ก. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ เมื่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ถูกทำลายหรือยับยั้งการสร้างหรือการเชื่อมต่อของส่วนประกอบของผนังเซลล์ในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต จะทำให้เกิดความไวต่อแรงดันออสโมติกมีผลทำให้เซลล์ตายได้ ยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อผนังเซลล์ได้แก่ เพนนิซิลลิน และ เซฟาลอสปอรินส์

. ยับยั้งการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ถัดจากผนังเซลล์เข้ามา ทำหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ และยังเป็นที่สาร้าสารประกอบบางอย่างให้แก่ผนังเซลล์ด้วย ซึ่งยาปฏิชีวนะหลายชนิดสามารถทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหน้าที่ไปและเซลล์ตายในที่สุด ยาปฏิชีวนะเหล่านี้ได้แก่ polymyxin B, colisting , nystatin และ amphotericin B

ค. ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก เซลล์จุลินทรีย์ต้องการกรดนิวคลีอิก 2 ชนิดในการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ต่าง ๆ เพื่อการเจริญและแบ่งตัว คือ ดีเอ็นเอ และอาร์เอนเอ และก่อนที่จะมีการสังเคราะห์ดีเอนเอและอาร์เอนเอจะต้องมีการสร้างนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นยาปฏิชีวนะที่ยัดขวางการaร้างดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์จะทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ได้แก่ rifarnpicin, novobiocin และ griseofuivin

ง. ยับยังการสังเคราะห์โปรตีน ยาปฏิชีวนะหลายชนิดสามารถรบกวนกระบวนการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียโดยไม่รบกวนการสร้างโปรตีนในเซลล์มนุษย์ ซึ่งยาปฏิชีวนะบางชนิดมีผลเพียงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก็จะกลับสู่สภาพเดิม ยาปฏิชีวนะที่มีผลเพียงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ chloramphenical, lincommycin และ cindamycin ยาปฏิชีวนะบางชนิดสามารถทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่ผิดไปและกลับสู่สภาพเดิมไม่ได้ ผลคือจุลินทรีย์จะตาย ยาปฏิชีวนะเปล่านี้ได้ rrri ยาในกลุ่มอะมิโนกลัยโคซายด์

ซ. รบกวนกระบวนการสร้างพลังงาน กระบวนการสร้างพลังงานที่สำคัญที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์คือ การสังเคราะห์สาร tetrahydofolic acid [FAH,] ซึ่งเป็นสารจำเป็นของภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตเพื่อใช้เป็นโคแฟกเตอร์(co-factor) ในการเผาผลาญสารพวกที่มีคาร์บอน 1 อะตอมเป็นองค์ประกอบในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด จุลินทรีย์บางชนิดจะได้สารดังกล่าวจากการสลายสารกรดโฟลิก (folic acid) ที่มีอยู่ในอาหาร แต่ในแบคทีเรียทั่ว ๆ ไปจะสังเคราะห์สารนี้คือ sulfonamide trimethoprim

2.2 แบคทีเรียและรา ที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งด้วยสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียในดิน มี 2 ชนิด คือ

(1) *Staphylococcus aureus* (สุมาลี, 2541)

Staphylococcus เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก เจริญเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ หรือเกาะกัน 4 เซลล์ หรือเกาะกลุ่มกันคล้ายพวงองุ่น สปีชีส์ที่สำคัญที่สุดคือ *S. aureus* ซึ่งมักจะสร้างสีเหลืองจนถึงส้มในขณะเจริญ แต่บางครั้งก็เป็นสีขาว สปีชีส์ที่สร้างเอนไซม์โคแอกูเลส (coagulase) และทำให้เม็ดเลือดแดงแตกแบบเบต้า ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค และบางชนิดยังสร้างแอนเทอโรทอกซิล (entertoxin)ซึ่งทำให้อาหารเป็นพิษอีกด้วย

อาหารเป็นพิษเนื่องจาก *Staphylococcus* โรคนี้มักเกิดขึ้นเสมอโดยมีสาเหตุมาจากการย่อยสารพิษ (enterotoxin) ของ *Staphylococcus aureus* ที่เจริญในอาหาร สารพิษนี้ทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้เกิดการอักเสบ เชื้อที่เป็นสาเหตุ มีรูปร่างกลมเกาะกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ การเจริญในอาหารแข็งมักมีสีเหลืองทองแต่บางสายพันธุ์ไม่มีสี *S. aureus* ที่ผลิตสารพิษมักเป็นพวกที่สังเคราะห์เอนไซม์โคแอกูเลส (coagulase) ได้ จัดเป็นพวกฟาคัลเททีฟในอาหารที่มีกลูโคส แต่จะเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสภาวะไร้ออกซิเจน อย่างไรก็ตาม ไม่จะเป็นที่ทุกสายพันธุ์ของ *S. aureus* ที่ผลิตเอนไซม์โคแอกูเลสจะต้องผลิตสารพิษ บางสายพันธุ์สามารถเกลือได้สูง (ร้อยละ 10-20) และยังสามารถทนต่อไนไตรต์ได้ค่อนข้างดี ดังนั้น จึงเจริญได้ในเนื้อเค็มถ้าสิ่งแวดล้อมอื่นเหมาะสม ยังทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูงถึงร้อยละ 50-60 มีความสามารถย่อยโปรตีนได้แต่ไม่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น *S. aureus* สามารถผลิตสารพิษได้ถึง 6 ชนิดด้วยกันซึ่งแยกโดยวิธีทางซีโรโลยี ได้แก่ A , B, C , C_2 ,D และ E แต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษต่างกัน อาหารเป็นพิษส่วนใหญ่มักเกิดจาก type A สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษแตกต่างไปตามชนิดของอาหาร โดยทั่วๆไป ถ้าอาหารเหมาะสมต่อการเจริญจะสามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ พีเอช และ a ที่กว้างขึ้น ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญและการผลิตสารพิษจะอยู่ระหว่าง 4 – 46 °ซ เช่น ในนมข้นมีอุณหภูมิขั้นต่ำ 6.7 °ซ ในสภาวะที่มีออกซิเจนเชื้อจะมีพีเอชต่ำสำหรับกว่าในสภาวะไร้ออกซิเจน ความต้องการ a_w ขั้นต่ำก็เช่นเดียวกัน

Staphylococcus อาจเจริญได้ช้าลงถ้ามีแบคทีเรียชนิดอื่นเจริญร่วมอยู่ด้วย และแบคทีเรียชนิดอื่นอาจทำให้อาหารเสียจนสังเกตได้ก่อนที่ *Staphylococcus* จะมีผลิตสารพิษถึงระดับที่เป็นอันตราย แต่การแข่งขันจะไม่เกิดขึ้นถ้าอาหารนั้นได้รับความร้อนมาก่อน *Staphylococcus* จะถูก

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ Rajabhat University

ทำลายที่ความร้อน 66" ซ นาน 12 นาที หรือ 60° ซ นาน 83 นาที การทนความร้อนของแบคทีเรียจะแตกต่างไปตามชนิดกันไปตามชนิดของอาหารและสายพันธุ์ ในคัสตาร์ด แบคทีเรียจะมีค่าD_{60} °ซ เท่ากับ 7.8 นาที และรังสีแกรมมาเพียง 0.47 เมกกะแรด ก็สามารถทำลาย *Staphylococcus* ในอาหารชิ้นได้มาก แหล่งที่มาของ *Staphylococcus* ในอาหารมักมาจากมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมักมีเชื้ออยู่ที่จมูก ผิวหนัง และ แผลต่าง ๆ ในโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะมีเชื้ออยู่ในน้ำนม *Staphylococcus* ในอากาศก็อาจเป็นสาเหตุได้แต่โอกาสน้อยกว่า

สารพิษของ *Staphylococcus* นั้น เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 26,000 – 30.000 ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดียวจับกันเป็นห่วงนี้ของสารพิษที่เรียกว่า cystine loop ด้วยแรงยึดได ซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโน เนื่องจากชนิดของสารพิษ type A และ D ทำให้เกิดโรคมากที่สุด การผลิตสารพิษจะเกิดตามหลังการเจริญ ของเชื้อไม่มากนัก ดังนั้น สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารพิษก็จะเป็นสภาพที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญการผลิตสารพิษจะทำได้ที่อุณหภูมิ 15.6 – 46.1 °ซ แต่ดีที่สุดจะอยู่ที่ 40 °ซ ซึ่งใช้เวลาในการผลิตเพียง 4 – 6 ชั่วโมงเท่านั้น ถ้าอุณหภูมิต่ำก็ต้องใช้เวลานานขึ้น สารพิษ *Staphylococcus* สามารถทนความร้อนได้ดี โดยทั่ว ๆ ไปความร้อนที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรซ์ (72 °ซ นาน 15 วินาที) และ UHT (143.3 °ซ นาน 9 วินาที) ไม่สามารถทำลายสารพิษได้ และสารพิษ type B ทนความร้อนได้มากที่สุด อาหารประเภทแป้งและโปรตีน มักจะส่งเสริมให้ *Staphylococcus* สร้างสารพิษมากกว่าอาหารชนิดอื่น

อาการของโรค ในแต่ละคนจะแตกต่างกัน บางคนมีอาการมาก บางคนมีอาการน้อยหรือไม่มีอาการเลยขึ้นอยู่กับความต้านทานของแต่ละคน ระยะฟักตัวของโรคใช้เวลา 2 – 4 ชั่วโมง ซึ่งความแตกต่างจากอาหารเป็นพิษหรือโรคติดเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่มีระยะฟักตัวนานกว่านี้ อาการขั้นแรกที่พบเสมอคือผู้ป่วยจะมีน้ำลายออกมากผิดปรกติ คลื่นไส้ อาเจียน เป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเสีย บางรายที่มีอาการมากอาจพบเลือดและมูกในอุจจาระด้วย บางรายปวดศีรษะกล้ามเนื้อเป็นตะคริว เหงื่อออก หนาวสั่น อ่อนเพลีย ชีพจรอ่อน และช็อค มักพบว่ามีไข้ต่ำ ๆ มากกว่าไข้สูง อาการจะคงอยู่ 1 – 2 วันก็หายโดยไม่ต้องรักษา อัตราการตายต่ำมาก ในรายที่มีอาการมากอาจต้องให้น้ำเกลือ

สภาพแวดล้อมที่สำคัญในการทำให้เกิดโรค ได้แก่

1. อาหารนั้นจะต้องมี *Staphylococcus* ชนิดที่ให้สารพิษอยู่
2. อาหารชนิดนั้นจะต้องเหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างสารพิษ
3. อุณหภูมิต้องเหมาะสมต่อการเจริญและมีระยะเวลานานพิษต่อการผลิตสารพิษ
4. อาหารที่มีสารพิษนั้นถูกบริโภค

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

การป้องกันโรค อาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Staphylococcus* ป้องกันได้โดย

1. ป้องกันการปนเปื้อนของอาหารกับ *Staphylococcus*
2. ป้องกันการเจริญของ *Staphylococcus*
3. ทำลาย *Staphylococcus* ในอาหาร

(2) Fusarium sp.

Fusarium จัดอยู่ใน Hyphomycetes เดิมจัดอยู่ใน Deuteromycetes ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) จัดอยู่ใน Hypocreales (Ascomycetes) ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสปีชีส์หนึ่งของจีนัส *Gibberella* มีบางสปีชีส์จัดอยู่ในสปีชีส์หนึ่งของจีนัส *Nectria* (http:/sis.agr.gc.ca/brd/fusarium/)

ลักษณะก่อโรคในมะเขือเทศ (สมศิริ ,2529)

มะเขือเทศเป็นผักวงศ์ Solanaceae ปลูกเพื่อรับประทานหรือนำไปแปรรูป เจริญเติบโตทางลำต้น ปลูกในสภาวะอากาศที่เหมาะสม ฝนและความชุ่มชื้นเป็นอุปสรรคในการผลิตมะเขือเทศ ทำให้เกิดโรคระบาด โดยเฉพาะโรคเหี่ยวที่เกิดจากรา โดยจะเข้าทำลายระบบท่อน้ำท่ออาหาร ทำ ให้พืชแสดงอาการเหี่ยว ซึ่งราเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ คือ *Fusarium sp.*

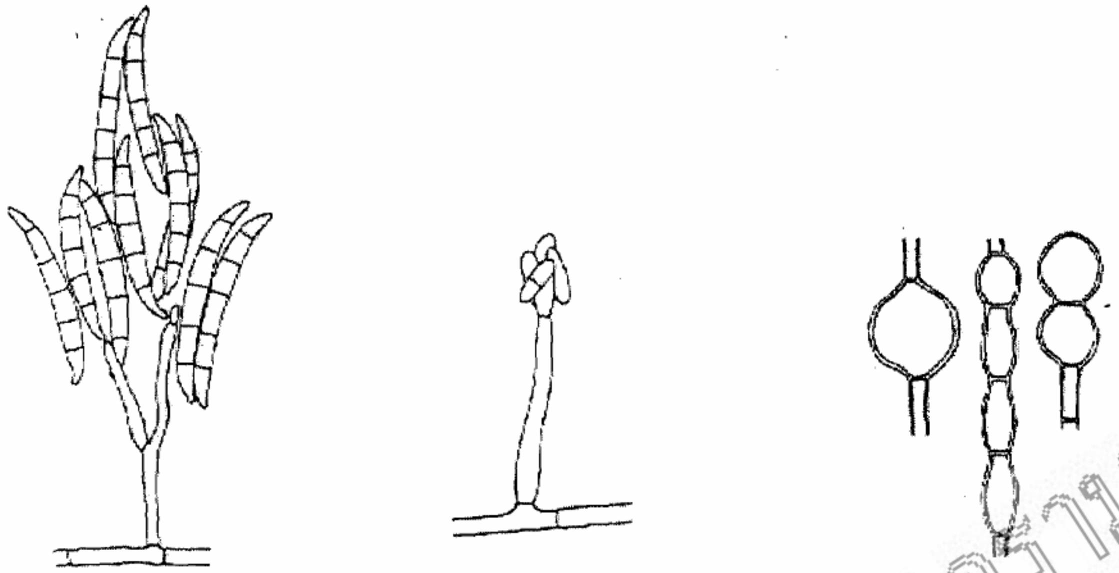
โรคเหี่ยวของมะเขือเทศเกิดจาก *Fusarium sp.* พบทั่วไปในเขตร้อนและหนาวอันเป็นโรคที่เกิดความเสียหายมากที่สุดโรคหนึ่งในมะเขือเทศ โดยทำให้พืชแคระแกรนเหี่ยวและตายในที่สุด ราเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose ager ขณะที่ยังอ่อน เส้นใยมีสีขาว มีผนังกั้นขวางเมื่อเส้นใยแก่ จะเปลี่ยนเป็นสีครีมและสีเหลืองอ่อน ถ้าอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมจะมีสีชมพูหรือสีม่วง ราามีสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) 3 แบบ คือ

1. สปอร์ขนาดใหญ่ (macroconidium) เป็นคอนนิเดียม รูปร่างคล้ายเกลียว มี 2 – 4 ผนังกั้น(septa) ไม่มีสี (ภาพที่ 2.1 ก)

2. สปอร์ขนาดเล็ก (microconidium) เป็นคอนนิเดียม รูปร่างคล้ายไข่ มี 0 – 1 ผนังกั้น (septa) ไม่มีสี (ภาพที่ 2.1 ข)

3. สปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (chlamydospore) มี 1 – 2 เซลล์ มีผนังหนา อาจสร้างขึ้นที่ปลายเส้นใยและสร้างขึ้นภายในเส้นใย (ภาพที่ 2.1 ค)

Pibulsongkram Rajabhat University มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม



ภาพที่ 2.1 ชนิดของคอนนิเดีย *Fusarium* sp.

ก. macroconidium ข. Microconidium ค. chlamydospore

ที่มา : http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/Malloch/Molds/Fusarium.html

ลักษณะอาการของโรค

มะเขือเทศในระยะกล้าจะแสดงอาการของโรคตามลำดับดังนี้

1. เส้นใยของใบล่างไม่มีสีเขียว
2. ก้านใบลู่ลงทำให้ใบห้อยลง
3. มีอาการเหี่ยวทั้งต้นและตายในที่สุด

ส่วนต้นแก่โดยเฉพาะในระยะที่ให้ผล อาการที่ปรากฏในไร่มีตามลำดับดังนี้

1. เส้นในไม่มีสีเขียว
2. ใบล่างจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง
3. อาการในข้อ 1 และ 2 จะเกิดเพียงด้านเดียวของต้น
4. ลำต้นแคระแกรน
5. ลำต้นและใบแห้ง ร่วง และตายในที่สุด
6. บริเวณท่อน้ำท่ออาหาร(vascular system) เป็นวงสีน้ำตาล
7. ผลมะเขือเทศที่เกิดขึ้นอาจจะเน่าหรือร่วงหล่นไปก่อนแก่

อาการของโรคแสดงได้ดังภาพที่ 2.2

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

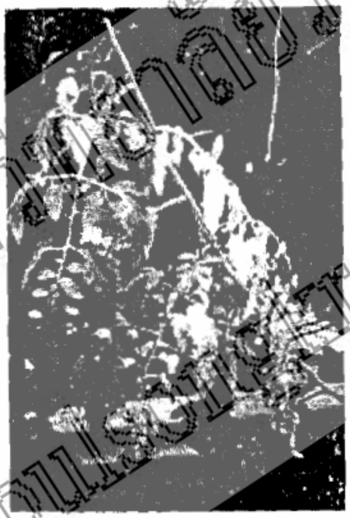
วงจรของโรค

1. รานี้อยู่ข้ามฤดูในรูปของเส้นใยและสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spores) ทั้ง 3 แบบอยู่ในดินหรือเมล็ด

2. การเข้าทำลายระยะแรก (primary infection) เส้นใยหรือสปอร์ ของราที่งอกออกมาเป็นเจิร์มทิวป์ (germ tube) และ จะเข้าทำลายพืชทางรากขนอ่อน โดยตรงและทางแผลหรือรอยแตกที่เกิดจากรากแขนง เมื่อราเข้าไปในพืชแล้วก็ยะเจริญอยู่ในระบบท่อน้ำอาหารซึ่งเส้นใยและสปอร์จะไปกีดขวางการเคลื่อนย้ายของน้ำทำให้พืชเกิดอาการเหี่ยวจะพบสปอร์ของราจำนวนมากบนใบหรือลำต้นของพืชทีตายแล้ว

3. การเข้าทำลายระยะที่สอง (secondary infection) สปอร์ชนิดมาโครคอนนิเดียม (macroconidium) bra: ไมโครคอนนิเดียม (microconidium) จะงอกออกมาเป็น เจิร์มทิวป์ (germ tube) เข้าทำลายพืชตลาดฤดูปลูกโดยติดไปกับน้ำ ลม เครื่องมือ กล้ามะเขือเทศที่เป็นโรคอยู่ก่อนและต้นที่ติดมากับกล้าที่เป็นโรค

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การเกิดโรคเชื้อจะทำลายพืชได้ดีในสภาพดินที่มีความชื้นปานกลาง อาการโรคจะรุนแรง ถ้าอุณหภูมิอยู่ระหว่าง **27** – 32 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 20 หรือสูง **nai 34** องศาเซลเซียส อาการของโรคไม่ปรากฏ (ศุภลักษณ์, 2536)



ก

ข

ภาพที่ 2.2 อาการของโรคในมะเขือเทศ

ก. เส้นใยของใบล่างไม่มีสีเขียว ก้านใบลู่ลงทำให้ใบห้อยลงจะเกิดเพียงด้านเดียวของต้น

ข. ลำต้นแคระแกรนลำต้นและใบแห้ง ร่วง และตายในที่สุด

ที่มา : http:/ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3122.html

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

2.3 วิธีการทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะ ในการยับยั้งแบคทีเรียและรา

การทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียและรา สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

1. การทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียและรา โดยตรง

เป็นการเพาะแบคทีเรียบนอาหารแข็ง แล้วเพาะแบคทีเรียและราที่ต้องการยับยั้งลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันโดยให้ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร ถ้าแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและรา จะเกิดบริเวณใสขึ้นรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะ

2. การทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งแบคทีเรียและรา ด้วยน้ำเลี้ยงหรือสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย มี 2 วิธี คือ

2.1 วิธีการแพร่ของสารปฏิชีวนะ (diffusion method)

เป็นการเติมน้ำเลี้ยงหรือสารสกัดลงบนอาหารวุ้นที่ปลูกเชื้อ ทดสอบความเข้มข้นของสารจะลดลงตามระยะทางที่แพร่ออกไปจนถึงจุด หนึ่ง ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้จึงเห็นเป็นบริเวณยับยั้ง วิธีนี้แยกออกเป็น 2 วิธี

(1) เติมสารลงไปในถ้วยหรือหลุมที่เจาะไว้

(2) paper disc method แทนการใส่สารลงไปวิธีนี้ทำโดยชุบสารละลายด้วยแผ่นกระดาษ นำไปทำให้แห้งแล้ววางลงบนอาหารวุ้น

2.2 วิธีการเจือจางสารปฏิชีวนะ (dilution method)

เป็นการเจือจางน้ำเลี้ยงหรือสารปฏิชีวนะลงในอาหารเหลวแล้วใส่จุลินทรีย์ทดสอบลงไป

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (ยุทธการ,2534)

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย ว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใดได้บ้าง เพื่อคัดเลือกความต้องการว่าต้องการความจำเพาะสูง คือ ยับยั้งได้เฉพาะเชื้อเป้าหมายเชื้อเดียวเท่านั้น หรือต้องการ broad spectrum คือ ยับยั้ง แบคทีเรียหรือฟังไจ วิธีการทดสอบจะใช้หลักการเดียวกันกับการคัดเลือกที่กล่าวมา โดยการเตรียมเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียให้มีจำนวยเหมาะสม จะใช้วิธีเทียบความขุ่นของสารละลายแบคทีเรียกับ McFarland No 0.5 หรือจะเป็นการวัดค่า Spectrophotometer เพื่อให้ปริมาณแบคทีเรียที่เป็นเชื้อทดสอบมีความเหมาะสมกับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ธนิตา ชาติวุฒิ (2543) แยกแบคทีเรียในดินที่สร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเติบโตของ *Fusarium* sp. และ *Klebsiella pneumoniae* โดยวิธี การแพร่ของสารปฏิชีวนะ (diffusion method) พบว่า *Streptomyces* sp. สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. และ *Klebsiella pneumoniae* ได้ และความเจือจางต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง *Klebsiella pneumoniae* ได้คือที่ ¼

ฟ้ารุ่ง คงก้อน (2543) ศึกษาการยับยั้งการเติบโตของ *Aspergillus niger* และการควบคุมการเกิดโรคผลเน่าในกล้วยหอม โดยยีสต์ *Pichia, Saccharomyces cerevisiae, S. ellipsoides* แบคทีเรียจากดินรหัส FA1, *Bacillus subtilis, B. cereus* และ *Pseudomonas* พบว่าแบคทีเรียจากดินรหัส FA1 สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Aspergillus niger* และการควบคุมการเกิดโรคผลเน่าในกล้วยหอม

วันเพ็ญ ศรีชาติ (2543) ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดต่อการเติบโตและการลดปริมาณการสร้างสปอร์ของ *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคใบจุดดำลำไย พบว่าแบคทีเรียที่มีผลในการยับยั้งการเติบโตและการลดปริมาณการสร้างสปอร์ของ *Colletotrichum* sp.ได้ดีคือ *Trichoderma* sp., *T. harzianum, Gliocladium virens* และแบคทีเรียไอโซเลท ABSO 42 ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus subtilis*

วรรณวิไล (2536) อ้างโดยวันเพ็ญ (2543) คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่มของ *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp.และ *Pseudomonas fluorescens* ที่แยกได้จากดิน 7 แหล่ง ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของ *Sclerotium rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ พบว่า *T. aureoviride* และ *T. harzianum* มีผลใรการยับยั้งการเติบโตของเส้นใย

รจนา ทองโพธิ์เลน (254.3) พบแอคติโนมัยซีสจำนวน 27 ไอโซเลทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* แต่ไอโซเลท R7-17 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดีที่สุดเมื่อนำไอโซเลท R7-17 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็น Streptomyces sp. โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ S. aureus ที่ความเจือจาง 1/128 dilution unit/ml

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

กณิฐา สังคะหะ จิระเดช แจ่มสว่าง และนภดล เกตุประสาท (2535) คัดเลือกจุลินทรีย์แอนทาโกนีสต์จากดินในการยับยั้งการเติบโตของ *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคโคนเน่าของกระหล่ำปลี บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (*PDA*) พบว่า *Bacillus* sp. *1* สายพันธุ์ *Pseudomonas* spp. *7* สายพันธุ์ และ*Penicillium* sp. *1* สายพันธุ์ ที่สร้างโซนใส ส่วนในกลุ่ม *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium* spp. สามารถเจริญทับโคโลนีของ *Pythium aphanidermatum* ได้ 51 สายพันธุ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ

(1) compound microscope

(2) incubator

(3) autoclave

(4) hot air oven

(5) microwave oven

(6) refrigerator

(7) centrifuge

(8) hot plate

(9) water bath

(10) larminar air flow

3.2 วัสดุ

(1) beaker

(2) flask

(3) test tube

(4) petri – dish

(5) pipette

(6) needle and loop

(7) cylinder

(8) forcep

(9) spreader

(10) slide and cover glass

(11) whatrnan no. 3

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

(1) nutrient agar

(2) nutrient broth

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

(3) potato dextrose agar

(4) potato dextrose broth

3.4 แบคทีเรียและราบริสุทธิ์

(1) *Staphylococcus aureus*

(2) *Fusarium* sp.

ได้จากโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม

3.5 วิธีดำเนินการ

(1) เก็บตัวอย่างดินบริเวณสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม ส่วนทะเลแก้ว และห้าแยกโคกมะตูม โดยให้รหัสแหล่งที่เก็บดังนี้

รหัส	แหล่งที่เก็บ
A	หลังตึกวิทยาศาสตร์
B	ห้าแยกโคกมะตูม
C	หลังตึกวิทยสโมสร
D	เรือนเพาะชำ คณะเกษตรฯ
E	สวนมะม่วง
F	หน้าตึกวิทยาศาสตร์
G	ดินบริเวณจอมปลวก

(2) ขั้นตอนการคัดเลือกแบคทีเรียจากดิน

(2.1) นำตัวอย่างดิน 1.0 กรัม มาเจือจางในน้ำกลั่น 9.0 มล. และเจือจางลงต่อไปเป็น 10^{-2} – 10^{-6}

(2.2) เลือกความเจือจางที่ 10^{-4} – 10^{-6} มาทำการเกลี่ย(spread) บนอาหาร NA agar บ่มที่ 35 – 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชม.

(2.3) คัดเลือกแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะ ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคขีด (streak) เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วเก็บในอาหาร NA slant บ่มที่ 35 – 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชม.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

(2.4) นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 1 ลูป มาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 25 มล. บ่มบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 48 ชม. (ถ้าเป็น Actiomycetes ใช้เวลา 7 วัน) นำมาเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 5.000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่ใส (supernatant) ไว้ในหลอดทดลอง (microcentrifuge tube) ที่ปราศจากเชื้อ

(3) ขั้นตอนการเตรียมเชื้อทดสอบ

(3.1) การเตรียม *Staphylococcus aureus*

ถ่ายแบคทีเรียจำนวน 1 ลูปจากอาหารแข็ง NA slant ลงใน NB ปริมาตร 25 มล. บ่มบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชม.

(3.2) การเตรียม *Fusarium* sp.

เลี้ยงราบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ เป็นเวลา 48 ชม.

(4) ขั้นตอนการทดสอบผลของสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Staphylococcus aureus*

(4.1) นำเชื้อทดสอบจากข้อ 3.1 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.08 – 0.1

(4.2) นำเชื้อทดสอบที่ได้จากข้อ 4.1 ปริมาตร 0.1 มล. มาทำการ spread plate บนอาหาร NA plate

(4.3) นำกระดาษกลมที่ปราศจากเชื้อมาชุบสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ2.4 แล้วนำมาวางบนเชื้อทดสอบ (หนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อวางกระดาษกลมที่ชุบสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรีย 4 แผ่น และ อาหารเหลว NB 1 แผ่น)

(5) ขั้นตอนการทดสอบผลของสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Fusarium* sp.

(5.1) นำเชื้อทดสอบจากข้อ 3.2 ใช้ cork borrer ขนาด 0.5 ซม. ตัดเส้นใยราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 1 ชิ้นวางบริเวณตรงกลางอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม.

(5.2) นำกระดาษกลมที่ปราศจากเชื้อมาชุบสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 2.4 มาวางใกล้ๆกับปลายของเส้นใยรา (หนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อวางกระดาษกลมที่ชุบสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรีย 4 แผ่น และ อาหารเหลว NB 1 แผ่น)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

(6) การตรวจผล วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) จากสูตร

$$\text{เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส} = \frac{A+B}{2}$$

A คือ เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสระนาบที่ 1

B คือ เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสระนาบที่ 2

(7) อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการเก็บดินบริเวณสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม ส่วนทะเลแก้ว และห้าแยกโคกมะตูม

นำดินที่เก็บได้มาแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียน์เอการ์ (nutrient agar) ได้แบคทีเรียทั้งหมด 139 ไอโซเลท ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงรหัส แหล่งที่เก็บ และจำนวนไอโซเลทของแบคทีเรียที่แยกได้

รหัส	แหล่งที่เก็บ	จำนวนไอโซเลท
A	หลังตึกวิทยาศาสตร์	41
B	ห้าแยกโคกมะตูม	33
C	หลังตึกวิทยสโมสร	2
D	เรือนเพาะชำ คณะเกษตรฯ	7
E	สวนมะม่วง	18
F	หน้าตึกวิทยาศาสตร์	20
G	ดินบริเวณจอมปลวก	18
	รวม	139

4.2 ผลการทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp.

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทดสอบการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp. ด้วยวิธีการแพร่ของสารบนกระดาษแผ่นกลม (paper disc diffusion method) โดยมานำมาเลี้ยงในอาหารเหลวนิวเตรียน์บรอทร์ (nutrient broth :NB) (ภาพที่ 4.1) นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge เพื่อให้ได้ส่วนของน้ำเลี้ยง (supernatant) ใช้กระดาษแผ่นกลม (paper disc) ชุบน้ำเลี้ยง (supernatant) นำมาวางทับลง *Staphylococcus aureus* ที่เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียน์เอการ์ พบว่า แบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes 2 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* คือ B1 และ B8 โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสเฉลี่ยเท่ากับ 18.2 และ 20.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2) และ ใช้กระดาษแผ่นกลม (paper disc)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

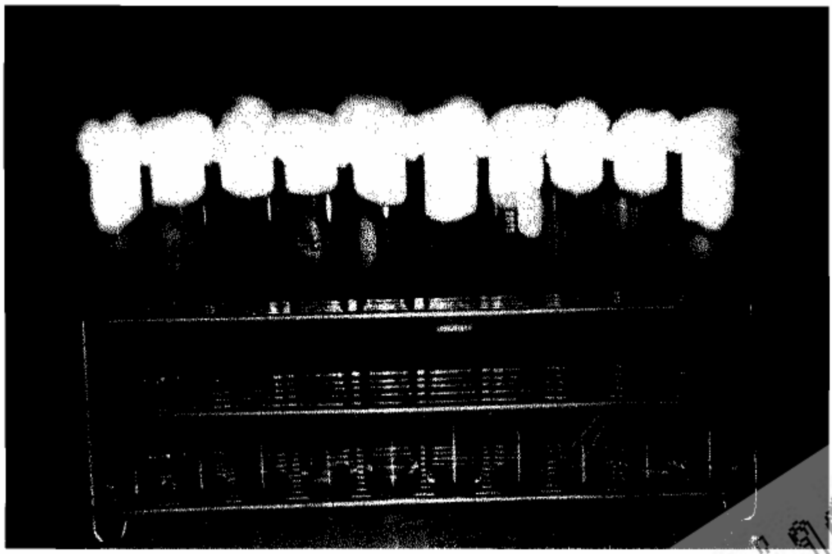
ชุบน้ำเลี้ยง (supernatant) นำมาวางบริเวณปลายเส้นใยรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (potato dextrose agar) พบว่า มี 10 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *Fusarium* s p โดยมีไอโซเลท A12 ที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสเฉลี่ยเท่ากับ 6.3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.3) ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสเฉลี่ยของแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp.

รหัส	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสเฉลี่ย (ม.ม.)	
	Staphylococcus aureus (9 วัน)	*Fusarium* sp. (7 วัน)
B1	18.2	-
B8	20.4	-
A7	-	4.2
A12	-	6.3
A13	-	4.6
A14	-	4.8
A32	-	5.2
A33	-	4.1
F1	-	3.5
F7	-	3.2
F11	-	2.1
F16	-	1.2

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

สำนักวิทยบริการสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม



ภาพที่ 4.1 ลักษณะแบคทีเรียที่คัดเลือกได้นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวนิวเตรียนท์บรอทร์ (nutrient broth :NB)

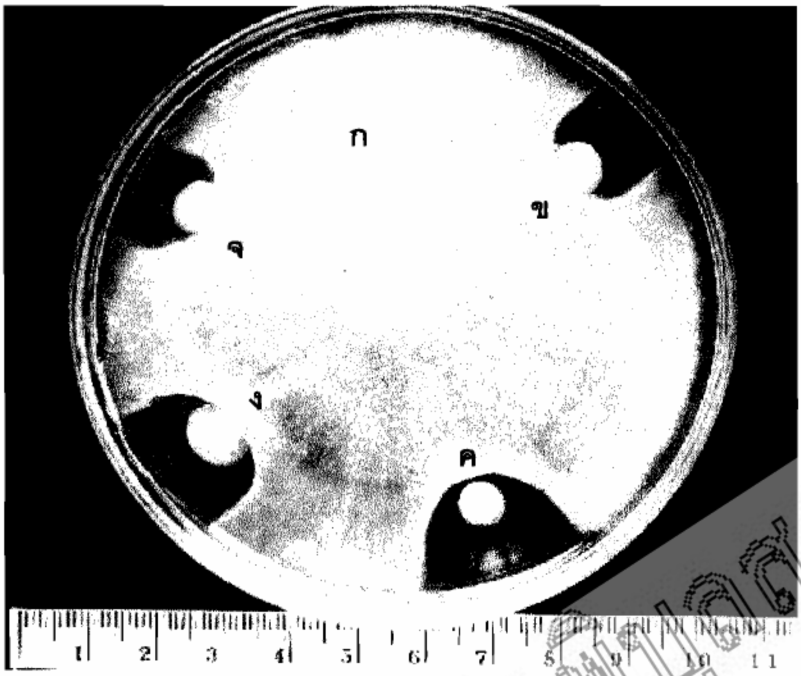
ภาพที่ 4.2 การทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Staphylococcus* **aureus**

ก-ข แบคทีเรียที่ไม่สามารถยับยั้ง ***Staphylococcus aureus***

ค-ง แบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง ***Staphylococcus aureus***

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

146152

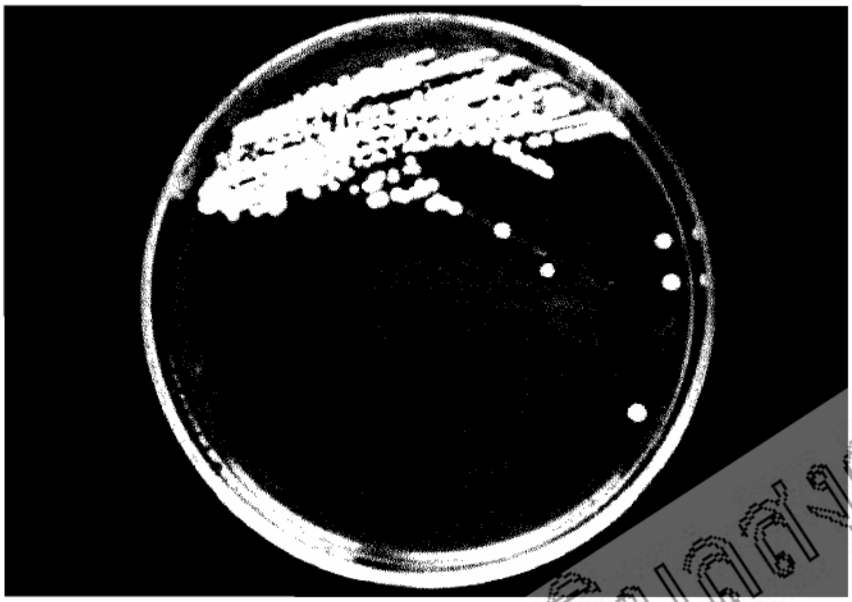


ภาพที่ 4.3 การทดสอบแบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Fusarium* sp.

ก แบคทีเรียที่ไม่สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp.

ข-จ แบคทีเรียที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้ง *Fusarium* sp.

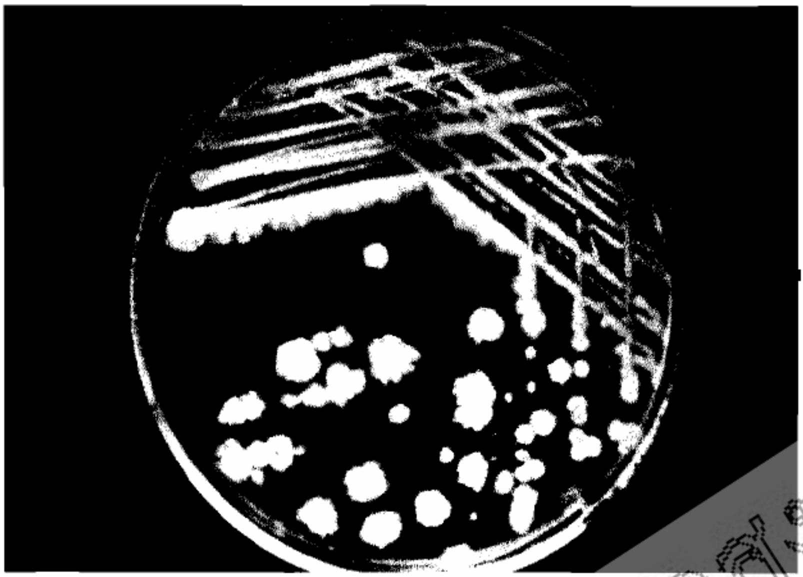
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



ภาพที่ 4.4 ลักษณะแบคทีเรียไอโซเลท B8 บนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียน์เอการ์
(nutrient agar :NA)

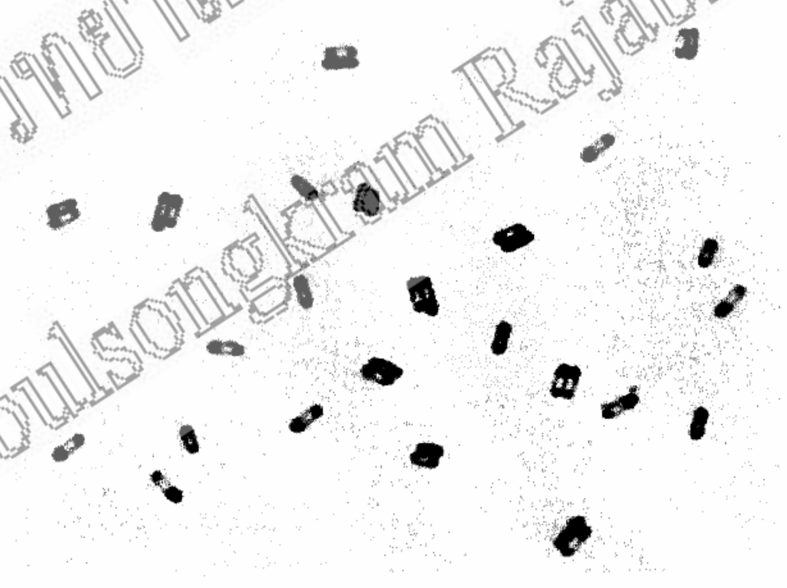
niwd 4.5 **ลักษณะแบคทีเรียไอโซเลท B8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า**

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University



ภาพที่ 4.6 ลักษณะแบคทีเรียไอโซเลท A12 บนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์เอการ์ (nutrient agar :NA)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University



niwd 4.7 ลักษณะแบคทีเรียไอโซเลท A12 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดิน 7 แหล่ง นำมาแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียน์เอการ์ (nutrient agar : NA) ได้ทั้งหมด 139 ไอโซเลท ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้พบว่ามีกลุ่มของ Actinomycetes รวมอยู่ด้วย นำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาทดสอบการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Fusarium* sp. ด้วยวิธีการแพร่ของสารบนกระดาษแผ่นกลม (paper disc diffusion method) โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวนิวเตรียน์บรอทร์ (nutrient broth : NB) นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge เพื่อให้ได้ส่วนของน้ำเลี้ยง (supernatant) ใช้กระดาษแผ่นกลม(paper disc) ชุบน้ำเลี้ยง (supernatant) นำมาวางทับลง *Staphylococcus aureus* ที่เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียน์เอการ์ พบว่า แบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ 2 ไอโซเลท คือ B1 และ B8 วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสได้เท่ากับ 18.2 และ 20.4 มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งพบว่าช่วงเวลาแรกของการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียไม่มีผลในการยับยั้ง เมื่อทิ้งไว้ 7-9 วัน แบคทีเรียเริ่มมีการสร้างบริเวณใสขึ้น ซึ่งจะสร้างได้กว้างที่สุดเมื่อวันที่ 9 ซึ่งอาจอภิปรายได้ว่าช่วงการสร้างสารอินทรีย์ของแบคทีเรียต้องใช้เวลาประมาณ 9 วัน ซึ่งสารอินทรีย์นี้อาจเป็นสารที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายทุติยภูมิ (secondary metabolite) การสร้างสารนี้จะต้องใช้เวลาในช่วงปลายระยะลอคเฟส (log -phase) ซึ่งต้องใช้เวลานานพอสมควร อาจจะต้องมีการศึกษากราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้

ส่วนการยับยั้ง *Fusarium* sp. ใช้กระดาษแผ่นกลม(paper disc) ชุบน้ำเลี้ยง(supernatant) นำมาวางปลายเส้นใยรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (potato dextrose agar) พบว่ามีแบคทีเรีย 16 ไอโซเลทสามารถยับยั้งได้โดยมีไอโซเลท A12 สามารถยับยั้งได้สูงสุดคือ เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสเท่ากับ 6.3 มิลลิเมตร ผลของการยับยั้งมีลักษณะเช่นเดียวกับกรณีการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* แต่ใช้เวลาน้อยกว่าคือประมาณวันที่ 7 แบคทีเรียมีการสร้างบริเวณใสได้กว้างที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารอินทรีย์ที่ผลิตมาจากแบคทีเรีย และพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes ไม่สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. ได้

จากการศึกษาแบคทีเรียไอโซเลท B1,B8 และ A12 พบว่า ไอโซเลท B1,B8 โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียน์เอการ์ (nutrient agar : NA) มีลักษณะเป็นปุยสั้นๆ คล้ายเส้นใยรา แต่เมื่อนำไปย้อมสีแกรม พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นท่อนต่อกันเป็นเส้นสาย น่าจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Actinomycetes ส่วนไอโซเลท A12 นำไปย้อมสีแกรม พบว่า เป็นแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

แกรมบวก มีลักษณะเป็นท่อนสร้างสปอร์บริเวณกลางเซลล์ แต่ไม่ได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochem test)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรจะมีการหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารปฏิชีวนะของ ไอโซเลท B8 และ A12 เช่น ความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ระยะเวลา
2. การตรวจผลการสร้างบริเวณใสของแอคติโนมัยซีสต์ ควรตรวจผล 7-10 วัน เพราะระยะเวลาในการสร้างสารปฏิชีวนะนานกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

เอกสารอ้างอิง

กณิฐา สังคะหะ จิระเดช แจ่มสว่างและนพดล เกตุประสาท,2535. **โครงการวิจัยท-ช.**

จิระเดช แจ่มสว่าง,2534. **การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.** สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์,2537. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธนิตา ชาติวุฒิ,2543. การแยกแบคทีเรียในดินที่สร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเติบโตของ *Fusarium sp.* และ *Klebsiella pneumoniae*. **ปัญหาพิเศษ.** วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ.

ฟ้ารุ่ง คงก้อน,2543. การศึกษาการยับยั้งการเติบโตของ *Aspergillus niger* โดยยีสต์ *Pichia, Saccharomyces cerevisiae, S. ellipsoides,* แบคทีเรียจากดินรหัส FA1, *Bacillus subtilis,* B. *cereus, B. coagulans, B. cereus* และ *Pseudomonas sp.* **ปัญหาพิเศษ**. วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ โปรแกรมวิชาชีววิทยา - ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม.

ยุทธการ ธะนันโต,2534. การผลิตสารปฏิชีวนะจาก Actinomyces บางชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides.* **วิทยานิพนธ์**. วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รจนา ทองโพธิ์เลน,2543. การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีสจากดินที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* **ปัญหาพิเศษ**. วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม.

วันเพ็ญ ศรีชาติ,2543. ผลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *Colletotrichum sp.* สาเหตุของโรคใบจุดดำของลำไย. **ปัญหาพิเศษ.** วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม.

สมศิริ แสงโชติ,2536. **โรคพืชเบื้องต้น.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

สุภลักษณ์ ฮอกะวัด,2536. **โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ**. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุมาลี เหลืองสกุล,2541. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพ.

http://www.ces.uga.edu/Agriculture/plantpath/plantdis/fungi/Fusarium.html

http:/sis.agr.gc.ca/brd/fusarium/

http:/ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3122.html

http:/www.agric.gov.ab.ca/pests/diseases/63010130.html

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
Pibulsongkram Rajabhat University

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. nutrient agar

peptone	5.0 g
beef extract	3.0 g
agar	15.0 g
distilled water	1.0 l

pH 6.8

นำวุ้นไปต้มให้ละลาย ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอสูงที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. nutrient broth

peptone	5.0 g
beef extract	3.0 g
distilled water	1.0 l

pH 6.8

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอสูงที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

3. potato dextrose agar

potato	200.0 g
dextrose	20.0 g
agar	15.0 g
distilled water	1.0 l

pH 4.5

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

นำมันฝรั่งมาหั่นเป็นลูกเต๋านำไปต้มแล้วกรองเอาแต่น้ำ นำวุ้นไปต้มให้ละลาย ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอสูงที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

4. potato dextrose broth

potato	200.0 g
dextrose	20.0 g
distilled water	1.0 l
pH 4.5	

นำมันฝรั่งมาหั่นเป็นลูกเต๋านำไปต้มแล้วกรองเอาแต่น้ำ ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอสูงที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University

ที่ทำงาน โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
...ราชภัฏพิบูลสงคราม โทรศัพท์ 055-230595 โทรสาร 055-230595

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ สกุล นางนฤมล เถื่อนกูล

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ 1 ระดับ 5

ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา 2535 ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีการศึกษา 2537 ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2537-2538 นักวิจัย ทำวิจัยเรื่อง การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ. 2538-2541 นักวิจัย ทำวิจัยเรื่องการควบคุมแมลงและโรคพืชด้วยวิธีชีววิธี บริษัทเคการเกษตร จังหวัดลำปาง

ที่ทำงาน โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม โทรศัพท์ 055-230595 โทรสาร 055-230595

ที่อยู่ 28/32 ถนนเทพารักษ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-282578 , 09-7078101

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม Pibulsongkram Rajabhat University