

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะของตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินจาก 7 อำเภอในพื้นที่จังหวัดน่าน จำนวน 15 ตัวอย่าง เพื่อแยกหา แอกติโนมัยซีทีส ศึกษาลักษณะเนื้อดิน สี และ วัดหาค่า pH ของตัวอย่างดินที่เก็บได้ pH ของ ตัวอย่างดินอยู่ในช่วงระหว่าง 5.92 – 8.70 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่เก็บ ลักษณะและพีเอช ของตัวอย่างดิน

| ตัวอย่างดิน | แหล่งที่เก็บ | ลักษณะของดิน | ค่า pH |
|-------------|---------------------------|---|--------|
| 1 | ต.โหล่น่าน อ.เวียงสา | ดินร่วน สีน้ำตาล | 6.68 |
| 2 | ป่าชุมชน อ.สันติสุข | ดินเนื้อละเอียด จับเป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาลม่วง | 6.77 |
| 3 | ห้วยหลักลาย อ.สันติสุข | ดินเนื้อละเอียด จับเป็นก้อน สีน้ำตาลม่วงเข้ม | 6.63 |
| 4 | บ้านปางช้าง อ.สันติสุข | ดินเนื้อละเอียด จับเป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาล | 7.57 |
| 5 | ป่าบ้านปางช้าง อ.สันติสุข | ดินเนื้อละเอียด จับเป็นก้อนแข็ง สีน้ำตาลเข้ม | 7.51 |
| 6 | ป่าชุมชน อ.ภูเพียง | ดินร่วนเนื้อละเอียด สีน้ำตาลเหลือง | 6.78 |
| 7 | ต.บ่อเกลือ 1 อ.บ่อเกลือ | ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาลเข้ม | 8.70 |
| 8 | ต.บ่อเกลือ 2 อ.บ่อเกลือ | ดินร่วน สีน้ำตาลแดง | 8.22 |
| 9 | บ้านบ่อ อ.บ่อเกลือ | ดินร่วนปนทราย สีเทา | 8.36 |
| 10 | ต.บ่อเกลือใต้ อ.บ่อเกลือ | ดินร่วน สีน้ำตาล | 5.92 |

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

| ตัวอย่างดิน | แหล่งที่เก็บ | ลักษณะของดิน | ค่า pH |
|-------------|-----------------------|--------------------------|--------|
| 11 | ดอยภูคา อ.ปัว | ดินร่วน สีน้ำตาลเข้ม | 7.31 |
| 12 | ร.ร.แม่จริม อ.แม่จริม | ดินร่วน สีน้ำตาล | 7.05 |
| 13 | บ้านนาคา อ.แม่จริม | ดินลูกรัง สีน้ำตาลเหลือง | 7.26 |
| 14 | ต.หนองแดง อ.แม่จริม | ดินลูกรัง สีน้ำตาลเหลือง | 7.17 |
| 15 | บ้านนาทะนุง อ.นาหมื่น | ดินร่วน สีน้ำตาลดำ | 7.34 |

4.2 การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากดินตัวอย่าง

จากการแยกแอกติโนมัยซีทีสจากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sodium Caseinate Agar พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้จำนวนทั้งสิ้น 61 สายพันธุ์ โดยแต่ละแหล่งได้จำนวนสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสแตกต่างกัน โดยตัวอย่างดินจาก ต.โหล่นาน อ.เวียงสา พบแอกติโนมัยซีทีสมากที่สุด 10 สายพันธุ์ ส่วนตัวอย่างดินที่พบแอกติโนมัยซีทีสน้อยที่สุด ได้แก่ ตัวอย่างดินจากห้วยหลักลาย อ.สันติสุข ตัวอย่างดินจาก ต.บ่อเกลือใต้ อ.บ่อเกลือ และตัวอย่างดินจาก ต.หนองแดง อ.แม่จริม โดยสามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้ 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง

| ลำดับตัวอย่างดิน | สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้ | จำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้ |
|------------------|---|-------------------------|
| 1 | Nan 1.1, Nan 1.2, Nan 1.3, Nan 1.4, Nan 1.5, Nan 1.6, Nan 1.7, Nan 1.8, Nan 1.9, Nan 1.10 | 10 |
| 2 | Nan 2.1, Nan 2.2, Nan 2.3, Nan 2.4, Nan 2.5, Nan 2.6, Nan 2.7 | 7 |
| 3 | Nan 2.8 | 1 |

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

| ลำดับตัวอย่างดิน | สายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้ | จำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้ |
|------------------|--|-------------------------|
| 4 | Nan 2.9, Nan 2.10, Nan 2.11, Nan 2.12, Nan 2.13 | 5 |
| 5 | Nan 2.14, Nan 2.15 | 2 |
| 6 | Nan 3.1, Nan 3.2, Nan 3.3, Nan 3.4 | 4 |
| 7 | Nan 4.1, Nan 4.2, Nan 4.3, Nan 4.4 | 4 |
| 8 | Nan 4.5, Nan 4.6, Nan 4.7, Nan 4.8 | 4 |
| 9 | Nan 4.9, Nan 4.10, Nan 4.11 | 3 |
| 10 | Nan 4.12 | 1 |
| 11 | Nan 5.1, Nan 5.2, Nan 5.3, Nan 5.4, Nan 5.5, Nan 5.6 | 6 |
| 12 | Nan 6.1, Nan 6.2 | 2 |
| 13 | Nan 6.3, Nan 6.4, Nan 6.5, Nan 6.6, Nan 6.7, Nan 6.8, Nan 6.9, Nan 6.10 | 8 |
| 14 | Nan 6.11 | 1 |
| 15 | Nan 7.1, Nan 7.2, Nan 7.3 | 3 |

4.3 การทดสอบความสามารถของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่แยกได้ใน การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

นำแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด 61 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) เป็นเวลา 10 วัน สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ออก และละลายสารสกัดด้วยสารละลาย 25%DMSO ได้สารสกัดทั้งหมด 61 ชนิด นำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well กับจุลินทรีย์ทดสอบ 7 ชนิด พบว่าแอกติโนมัยซีทีสแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ
ของแอกติโนมัยซีทีส

| สายพันธุ์ แอกติโนมัยซีทีส | ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ | | | | | | |
|------------------------------|---|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>B. cereus</i> ATCC 6633 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169 | <i>A. niger</i> ATCC 6275 |
| Nan 1.1 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 1.2 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 1.3 | - | +++ | ++ | +++ | ++ | + | - |
| Nan 1.4 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 1.5 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 1.6 | - | - | + | ++ | - | - | - |
| Nan 1.7 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 1.8 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 1.9 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 1.10 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 2.1 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 2.2 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 2.3 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 2.4 | - | - | + | + | - | - | - |
| Nan 2.5 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 2.6 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 2.7 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 2.8 | - | - | - | ++ | - | - | - |
| Nan 2.9 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 2.10 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 2.11 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 2.12 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 2.13 | - | - | + | ++ | - | - | - |
| Nan 2.14 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 2.15 | - | - | + | - | - | - | - |

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

| สายพันธุ์ แอกติโน มัยซีทีส | ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ | | | | | | |
|----------------------------------|---|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>B. cereus</i> ATCC 6633 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169 | <i>A. niger</i> ATCC 6275 |
| Nan 3.1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 3.2 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 3.3 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 3.4 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 4.1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 4.2 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 4.3 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 4.4 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 4.5 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 4.6 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 4.7 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 4.8 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 4.9 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 4.10 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 4.11 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 4.12 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 5.1 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 5.2 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 5.3 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 5.4 | - | - | + | + | - | - | - |
| Nan 5.5 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 5.6 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 6.1 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 6.2 | - | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + |
| Nan 6.3 | - | - | + | - | - | - | + |
| Nan 6.4 | - | - | - | - | - | - | - |

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

| สายพันธุ์ แอกติโน มัยซีทีส | ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ | | | | | | |
|----------------------------------|---|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>B. cereus</i> ATCC 6633 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | <i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169 | <i>A. niger</i> ATCC 6275 |
| Nan 6.5 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 6.6 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 6.7 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 6.8 | - | - | - | - | - | - | - |
| Nan 6.9 | - | - | +++ | ++ | ++ | - | + |
| Nan 6.10 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 6.11 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 7.1 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 7.2 | - | - | + | - | - | - | - |
| Nan 7.3 | - | - | + | - | - | - | - |

หมายเหตุ +++ = ความกว้างของ Inhibition zone 18.2 มิลลิเมตรขึ้นไป
 ++ = ความกว้างของ Inhibition zone 13.1 – 18.1 มิลลิเมตร
 + = ความกว้างของ Inhibition zone 8.0 – 13.0 มิลลิเมตร
 - = ไม่แสดงการยับยั้ง

4.4 จัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

จากการทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบจากแอกติโนมัยซีทีสจำนวน 61 สายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ยับยั้งแบคทีเรียและรา กลุ่มที่ 2 ยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดียว กลุ่มที่ 3 ยับยั้งราอย่างเดียว และกลุ่มที่ 4 ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ แสดงดังตารางที่ 4.4 โดยจำนวนสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 จำนวนสายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีทีสที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละกลุ่ม

| ขอบเขตการยับยั้งกลุ่ม จุลินทรีย์ทดสอบ | สายพันธุ์แอคติโนมัยซีทีส | รวม | เปอร์เซ็นต์ |
|--|--|-----|-------------|
| ยับยั้งแบคทีเรีย และรา | Nan 1.3, Nan 6.2, Nan 6.3, Nan 6.9, | 4 | 6.56 |
| ยับยั้งแบคทีเรีย อย่างเดียว | Nan 1.1, Nan 1.2, Nan 1.4, Nan 1.6, Nan 1.7, Nan 1.8, Nan 1.10, Nan 2.1, Nan 2.3, Nan 2.4, Nan 2.5, Nan 2.6, Nan 2.7, Nan 2.8, Nan 2.9, Nan 2.11, Nan 2.12, Nan 2.13, Nan 2.15, Nan 4.2, Nan 4.3, Nan 4.4, Nan 4.5, Nan 4.6, Nan 4.7, Nan 4.8, Nan 4.9, Nan 4.11, Nan 4.12, Nan 5.1, Nan 5.3, Nan 5.4, Nan 5.5, Nan 5.6, Nan 6.1, Nan 6.6, Nan 6.7, Nan 6.10, Nan 6.11, Nan 7.1, Nan 7.2, Nan 7.3, | 42 | 68.85 |
| ยับยั้งราอย่างเดียว | - | 0 | 0 |
| ไม่ยับยั้งทั้งแบคทีเรีย และรา | Nan 1.5, Nan 1.9, Nan 2.2, Nan 2.10, Nan 2.14, Nan 3.1, Nan 3.2, Nan 3.3, Nan 3.4, Nan 4.1, Nan 4.10, Nan 5.2, Nan 6.4, Nan 6.5, Nan 6.8 | 15 | 24.59 |

โดยกลุ่มแบคทีเรียได้แก่

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Escherichia coli ATCC 25922

Bacillus cereus ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 25923

กลุ่มราได้แก่

Candida albicans ATCC 10231

Saccharomyces cerevisiae ATCC 5169

Aspergillus niger ATCC 6275

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า จากจำนวนแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้ทั้งหมด 61 สายพันธุ์ มีแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ 75.41 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจำนวนแอกติโนมัยซีทีสที่ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้มีจำนวน 24.59 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างเดียวมีจำนวนมากที่สุด คือ 68.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในจำนวนนี้ ทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้อย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบเพปติโดไกลแคนไว้ เมมเบรนนี้มีไขมันมากถึง 11-12 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นสารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541)

จากผลการทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่ามีเพียงสายพันธุ์เดียวที่มีขอบเขตการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบได้มากที่สุดถึง 6 ชนิด คือ แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ซึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* *S. aureus* *E. coli* *C. albicans* *S. cerevisiae* และออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อนกับ *A. niger* และยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดได้ในระดับสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์นี้ไปทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

4.5 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราทดสอบโดยวิธี Dual Culture

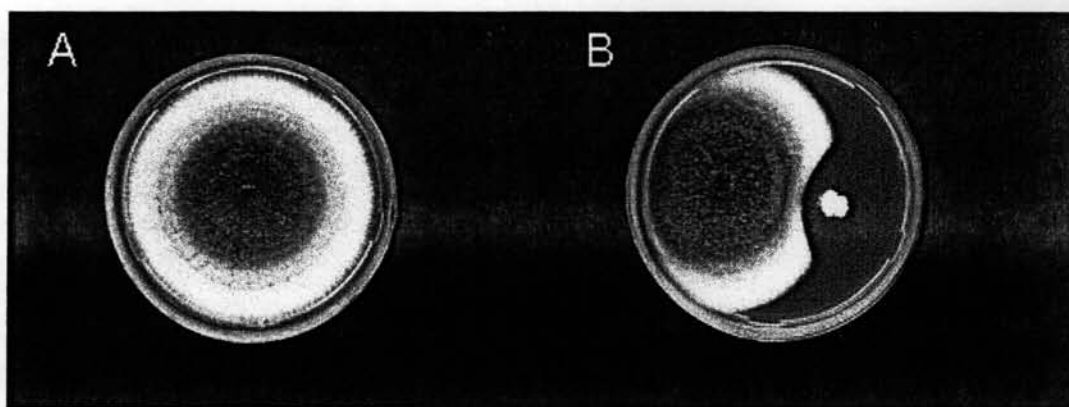
เมื่อนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ซึ่งได้รับการคัดเลือกในขั้นต้นว่ามีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด มาทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้วิธี Dual Culture โดยทำการทดสอบกับราทดสอบสายพันธุ์เดิมคือ *A. niger* และทดสอบกับราที่ก่อให้เกิดโรคพืช ได้แก่ *Alternaria porri* *Collectotrichum capsici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* *Pythium aphanidermatum* และ *Phytophthora parasitica* ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.1-4.7

ตารางที่ 4.5 แสดงระยะทางที่เส้นใยของราทดสอบถูกยับยั้งโดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2 ($\bar{X} \pm SD$)

| ราทดสอบ | $\Delta\gamma$ (มิลลิเมตร) |
|--|-------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 8.67±0.58 |
| <i>Alternaria porri</i> | 10.00±1.00 |
| <i>Collectotrichum capsici</i> | 7.33±0.58 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> | 11.33±0.58 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> | 11.67±0.58 |
| <i>Pythium aphanidermatum</i> | 21.67±0.58 |
| <i>Phytophthora parasitica</i> | 11.67±1.53 |

$\Delta\gamma$ คือ ระยะทางที่เส้นใยของราทดสอบถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีทีส

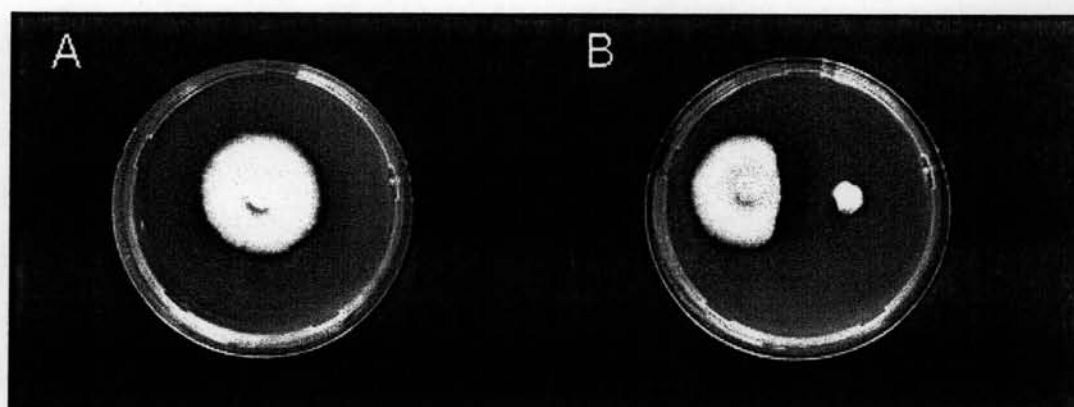
จากตารางที่ 4.5 แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคพืชที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 7 ชนิด โดยให้ผลการยับยั้งสูงสุดต่อ *P. aphanidermatum* ซึ่งลักษณะโคโลนีของราทดสอบสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อถูกยับยั้ง แสดงดังรูปที่ 4.1 - 4.7



รูปที่ 4.1 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* โดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Aspergillus niger* ในชุดควบคุม

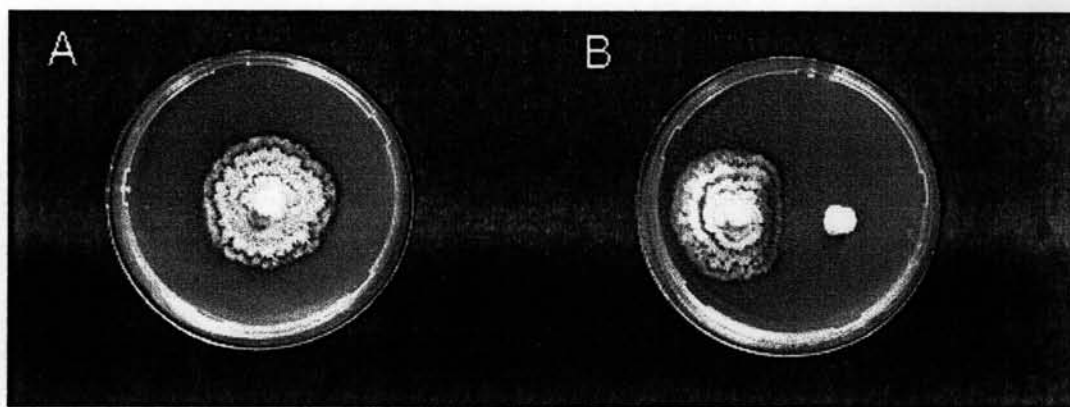
B ลักษณะโคโลนีของ *Aspergillus niger* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2



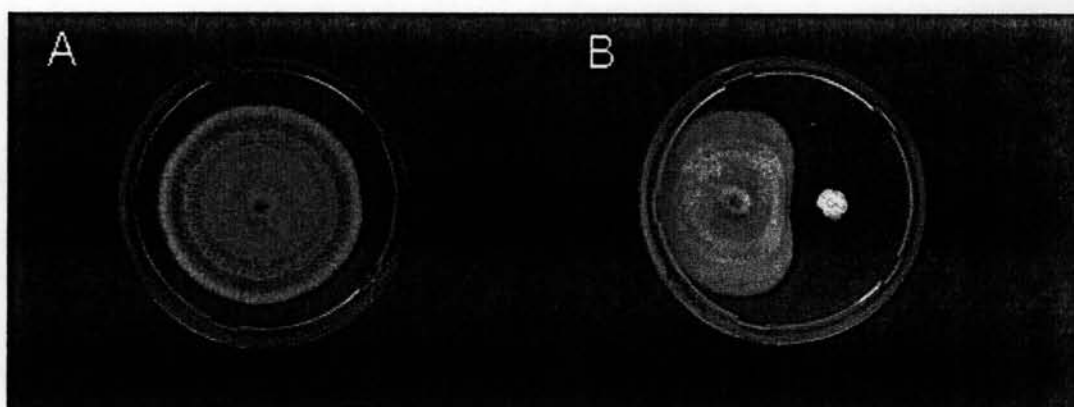
รูปที่ 4.2 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Alternaria porri* โดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Alternaria porri* ในชุดควบคุม

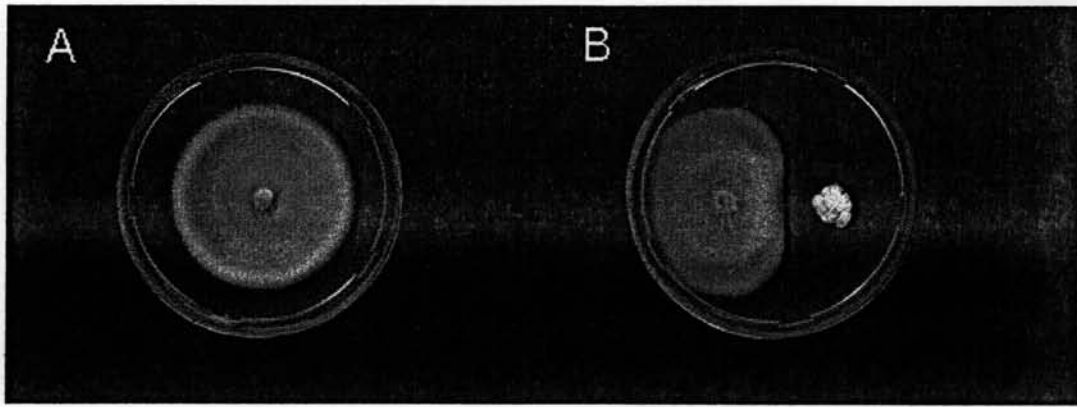
B ลักษณะโคโลนีของ *Alternaria porri* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2



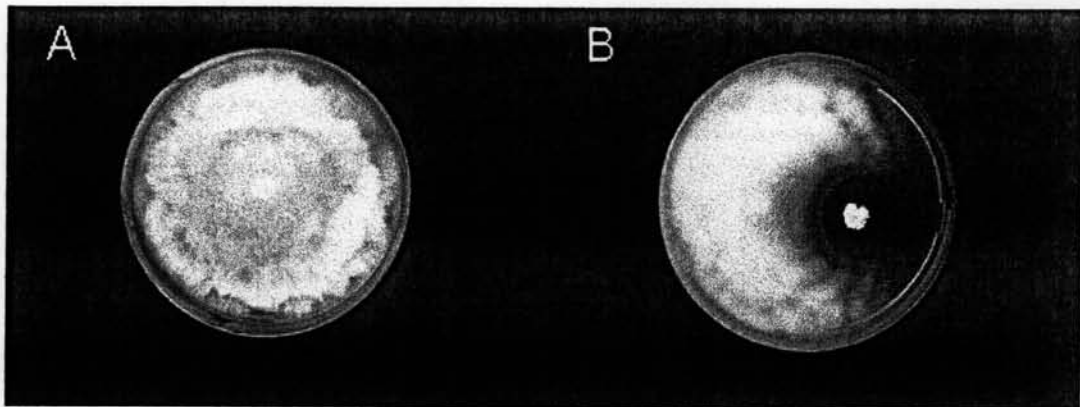
รูปที่ 4.3 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Collectotrichum capsici* โดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2
 A ลักษณะโคโลนีของ *Collectotrichum capsici* ในชุดควบคุม
 B ลักษณะโคโลนีของ *Collectotrichum capsici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2



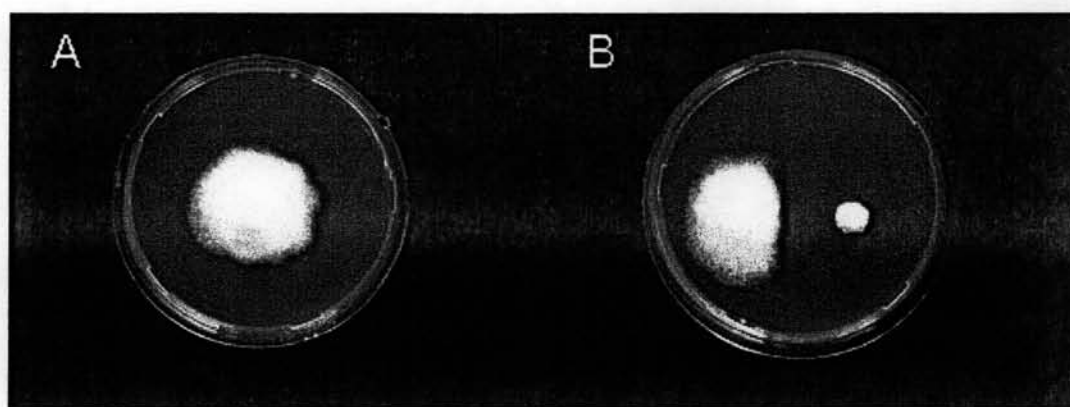
รูปที่ 4.4 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* โดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2
 A ลักษณะโคโลนีของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในชุดควบคุม
 B ลักษณะโคโลนีของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2



รูปที่ 4.5 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* โดย แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2
 A ลักษณะโคโลนีของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ในชุดควบคุม
 B ลักษณะโคโลนีของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* เมื่อเลี้ยงร่วมกับ แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2



รูปที่ 4.6 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Pythium aphanidermatum* โดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2
 A ลักษณะโคโลนีของ *Pythium aphanidermatum* ในชุดควบคุม
 B ลักษณะโคโลนีของ *Pythium aphanidermatum* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2



รูปที่ 4.7 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora parasitica* โดยแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2

A ลักษณะโคโลนีของ *Phytophthora parasitica* ในชุดควบคุม

B ลักษณะโคโลนีของ *Phytophthora parasitica* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ Nan 6.2

จากรูปที่ 4.1-4.7 แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราที่ก่อให้เกิดโรคพืชที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 7 ชนิด สังเกตได้จากลักษณะโคโลนีของราทดสอบที่เกิด ส่วนแอกติโนมัยซีทีสจะเจริญเข้าหาโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส โดยเส้นใยส่วนปลายของโคโลนีจะแผ่ ออกในลักษณะที่ถูกจำกัดพื้นที่ ซึ่งต่างกับโคโลนีของราทดสอบในชุดควบคุมที่เส้นใยส่วนปลายของโคโลนีแผ่ออกอย่างอิสระรอบทิศทาง ซึ่งลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันบริเวณเส้นใยส่วนปลายระหว่างราทดสอบในชุดควบคุมกับราทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สามารถเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังแสดงในรูปที่ 4.8-4.14

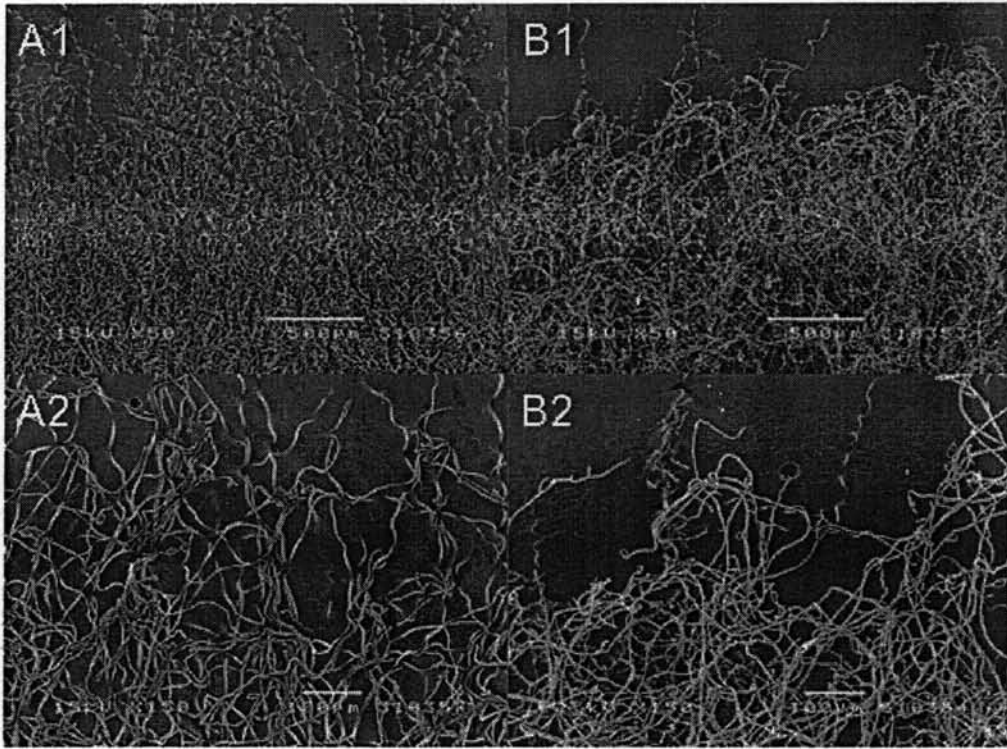


รูปที่ 4.8 ลักษณะเส้นใยของ *Aspergillus niger* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Aspergillus niger* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Aspergillus niger* เมื่อเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.8 เส้นใยของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Nan 6.2 มีการหดตัวหดสั้นและหักงอ ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยสามารถเจริญยืดยาวแผ่ออกไปได้อย่างอิสระ ดังรูป A1 และ A2

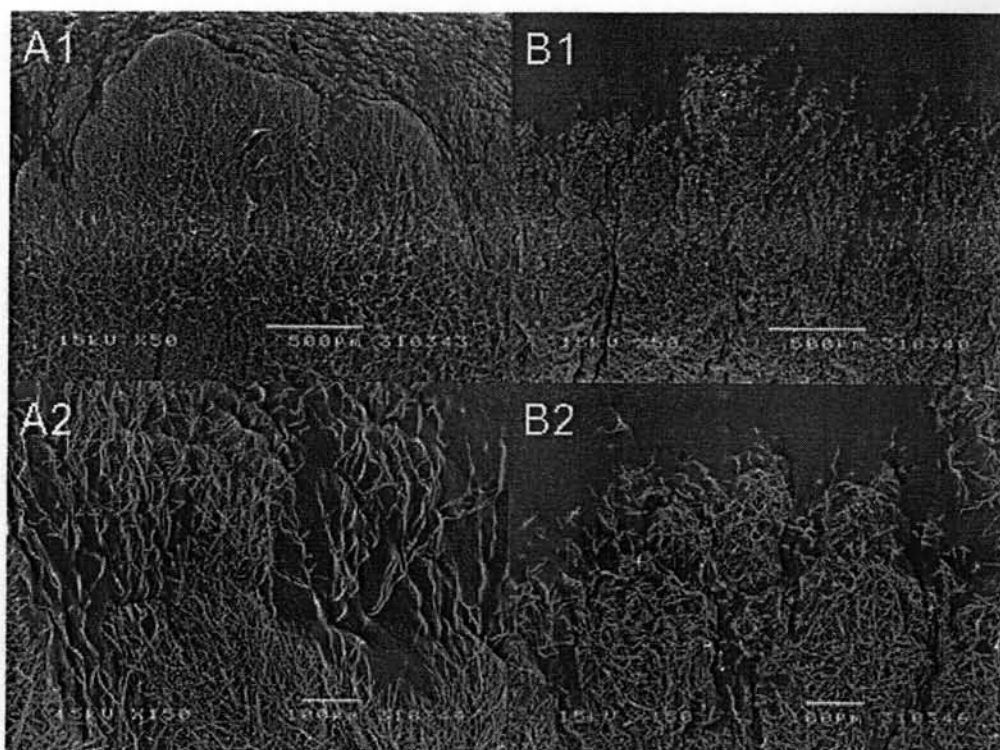


รูปที่ 4.9 ลักษณะเส้นใยของ *Alternaria porri* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Alternaria porri* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Alternaria porri* เมื่อเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.9 เส้นใยของ *A. porri* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Nan 6.2 มีการหดตัวและกระจุกตัวรวมกันอย่างหนาแน่น ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยสามารถเจริญยืดยาวแผ่ออกไปได้อย่างอิสระ และอยู่รวมกันอย่างหลวม ๆ ดังรูป A1 และ A2

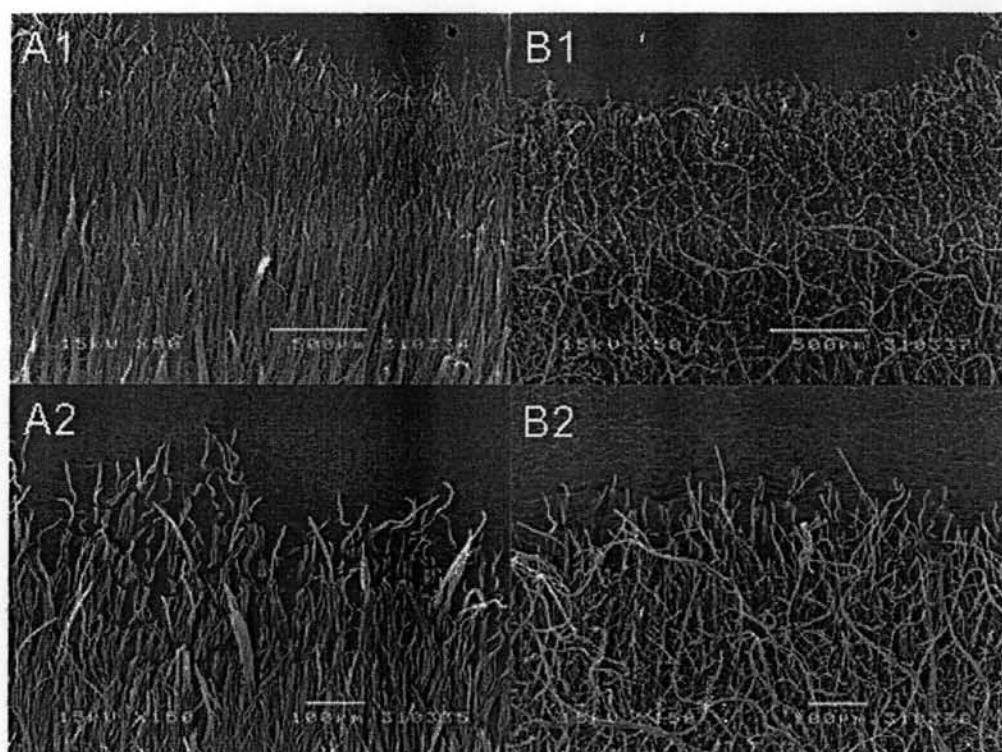


รูปที่ 4.10 ลักษณะเส้นใยของ *Collectotrichum capsici* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Collectotrichum capsici* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Collectotrichum capsici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับ สายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.10 เส้นใยของ *C. capsici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลักษณะหงิกงอ มีการขดตัวและกระจุกตัวรวมกันอย่างหนาแน่น ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยสามารถเจริญยืดยาวแผ่ออกไปได้อย่างอิสระ และอยู่รวมกันอย่างหลวม ๆ ดังรูป A1 และ A2

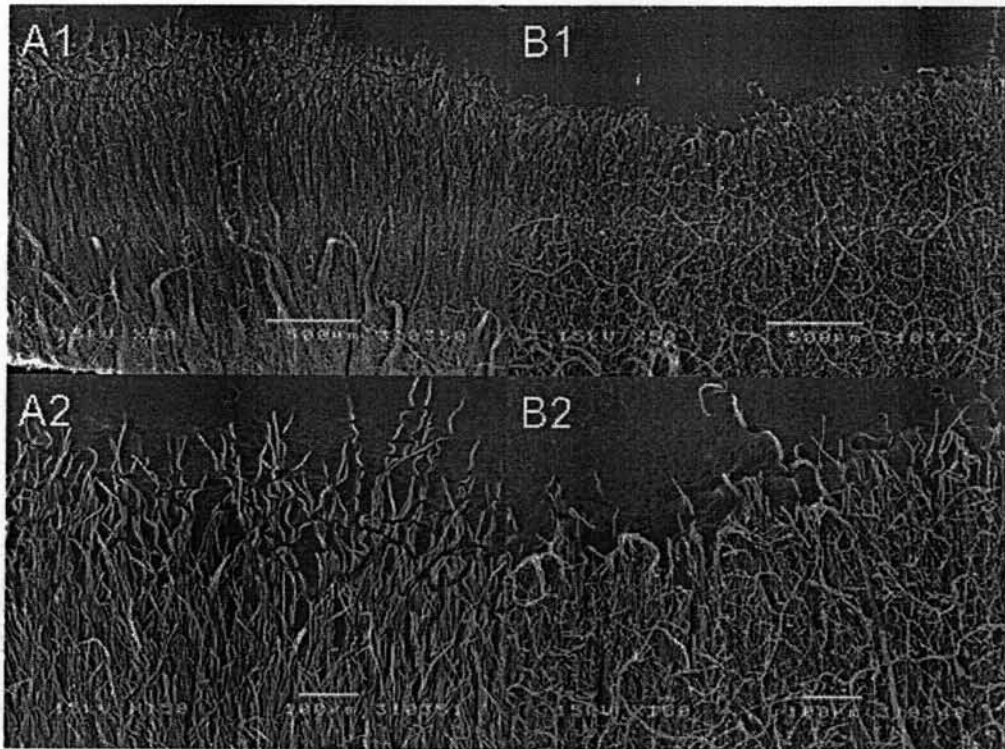


รูปที่ 4.11 ลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

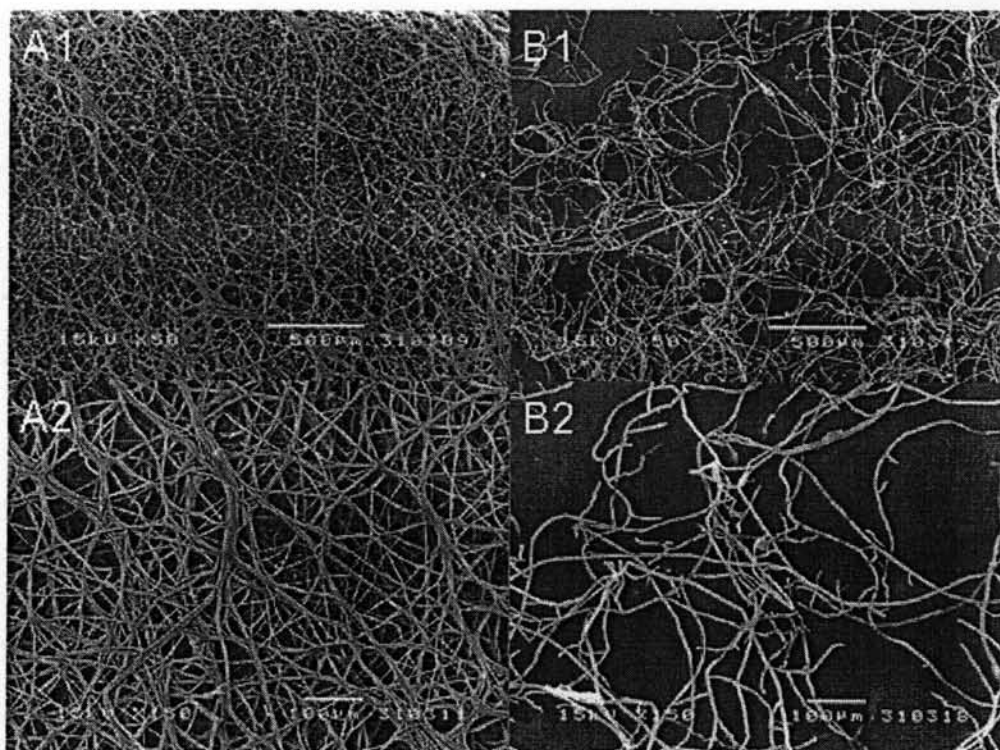
จากรูปที่ 4.11 เส้นใยของ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลักษณะหงิกงอ มีการขดตัวหดสั้น และกระจุกตัวอยู่รวมกันอย่างไม่เป็นระเบียบ เห็นได้อย่างชัดเจน ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยเจริญแผ่ออกอย่างเป็นระเบียบ เส้นใยบริเวณส่วนปลายเจริญยืดยาวแผ่ออกไปได้อย่างอิสระ ดังรูป A1 และ A2



รูปที่ 4.12 ลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

- รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)
- รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* เมื่อเลี้ยงร่วมกับสายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.12 เส้นใยของ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลักษณะหงิกงอ มีการหดตัวหดสั้นเข้ามารวมกันอย่างหนาแน่นและไม่เป็นระเบียบ เห็นได้อย่างชัดเจน ดังรูป B1 และ B2 แตกต่างกับลักษณะในชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยเจริญแผ่ออกอย่างเป็นระเบียบ เส้นใยบริเวณส่วนปลายเจริญยืดยาวออกไปได้อย่างอิสระ ดังรูป A1 และ A2



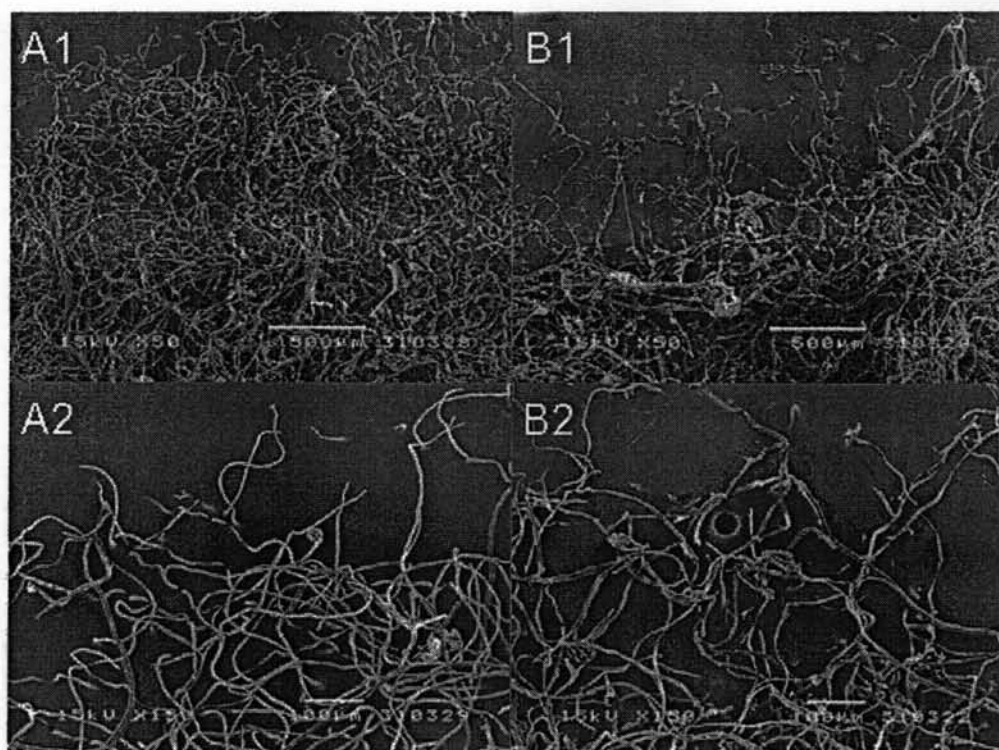
รูปที่ 4.13 ลักษณะเส้นใยของ *Pythium aphanidermatum* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Pythium aphanidermatum* ในชุดควบคุม
กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Pythium*
aphanidermatum เมื่อเลี้ยงร่วมกับ สายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1)
150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.13 เส้นใยของ *P. aphanidermatum* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Nan 6.2 เจริญแบบกระจายตัวอย่างหลวม ๆ ดังรูป B1 และ B2 ในขณะที่เส้นใยในชุดควบคุมเจริญประสานกันอย่างหนาแน่น ดังรูป A1 และ A2



รูปที่ 4.14 ลักษณะเส้นใยของ *Phytophthora parasitica* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

-รูป A1 และ A2 แสดงลักษณะเส้นใยของ *Phytophthora parasitica* ในชุดควบคุม กำลังขยาย 50X (รูป A1) 150X (รูป A2)

-รูป B1 และ B2 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณที่ถูกยับยั้งของ *Phytophthora parasitica* เมื่อเลี้ยงร่วมกับ สายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 50X (รูป B1) 150X (รูป B2)

จากรูปที่ 4.14 เส้นใยของ *P. parasitica* เมื่อเลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลักษณะหึงงอและเจริญแบบกระจายตัวอย่างหลวม ๆ ดังรูป B1 และ B2 ในขณะที่เส้นใยในชุดควบคุมเจริญได้ดีและหนาแน่นกว่า ดังรูป A1 และ A2

จากรูปที่ 4.8-4.14 จะเห็นได้ว่าลักษณะเส้นใยส่วนปลายของโคโลนีราทดสอบเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เปรียบเทียบระหว่างราทดสอบในชุดควบคุมกับราทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแอคติโนมัยซีทีสายพันธุ์ Nan 6.2 มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราทดสอบในแต่ละชนิดมีลักษณะที่เกิดขึ้นหลายลักษณะ เช่น มีการเจริญในลักษณะที่เส้นใยแผ่ออกไม่เต็มที่ (รูปที่ 4.11 และ 4.12) การเจริญของ

เส้นใยน้อยประสานกันกันอย่างหลวม ๆ (รูปที่ 4.13) เส้นใยมีลักษณะหึ่งงอเป็นกระจุกรวมกัน เนื่องจากถูกจำกัดพื้นที่ในการเจริญ (รูปที่ 4.9 และ 4.10) ทั้งนี้เนื่องจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งราทดสอบแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งออกมา ทำให้ราทดสอบไม่สามารถเจริญในบริเวณนี้ได้

จากผลการทดสอบข้างต้นเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่มีขอบเขตการยับยั้งกว้างที่สุด คือสามารถยับยั้งจำนวนสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทดสอบได้มากที่สุด และให้การยับยั้งในระดับสูง สามารถคัดเลือกได้แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมขั้นต้นในการผลิตสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกนี้

4.6 การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงและสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

เมื่อทำการเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด คือ ISP2 SCB SCYB NB MEB และ SSB ครบ 10 วันแล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปกรองเอาเส้นใยออกทั้ง 3 ชุด จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยชุดแรกสกัดโดย เอทิลแอลกอฮอล์ ชุดที่ 2 สกัดโดย เมทานอล และชุดที่ 3 สกัดโดย เฮกเซน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ชุด ไปทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ โดยใช้ถ้วยสแตนเลสเป็นภาชนะใส่สารสกัดทดสอบ ได้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.6 - 4.7

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจาก
น้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ชนิดต่าง ๆ
มาสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์

| จุลินทรีย์ทดสอบ | บริเวณยับยั้งด้วยสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ (มิลลิเมตร) | | | | | |
|-----------------------------------|---|-----|------|-----|---------|---------|
| | ISP2 | SCB | SCYB | NB | MEB | SSB |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 13.67 a | 11.33 b |
| <i>B. cereus</i> ATCC 6633 | 0 b | 0 b | 0 b | 0 b | 11.33 a | 11.33 a |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 11.67 b | 13.67 a |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 10.33 b | 14.00 a |
| <i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169 | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 16.33 b | 22.00 a |
| <i>A. niger</i> ATCC 6275 | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 12.67 b | 17.67 a |

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลขในแนวนอน เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติแบบมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ISP2 (Yeast-malt extract broth) SCB (Sodium caseinate broth) SCYB (Sodium caseinate yeast extract broth) NB (Nutrient broth) MEB (Malt extract broth) SSB (Soluble starch broth)

จากตารางที่ 4.6 เมื่อนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one way anova พบว่า เมื่อพิจารณาข้อมูลในแนวนอนสามารถแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหารแต่ละชนิด พบว่า ในอาหาร SSB มีกลุ่มค่าเฉลี่ยของการยับยั้งที่สูงที่สุด อยู่มากที่สุด ดังนั้น

เมื่อต้องการสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ อาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงมากที่สุดคือ SSB

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจาก น้ำเลี้ยงเชื้อของอาหารเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ชนิดต่าง ๆ มาสกัดด้วยเมทานอล

| จุลินทรีย์ทดสอบ | บริเวณยับยั้งด้วยสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ (มิลลิเมตร) | | | | | |
|-----------------------------------|---|---------|------|-----|---------|---------|
| | ISP2 | SCB | SCYB | NB | MEB | SSB |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 0 c | 0 c | 0 c | 0 c | 10.67 b | 13.00 a |
| <i>B. cereus</i> ATCC 6633 | 10.67 c | 0 d | 0 d | 0 d | 12.33 b | 17.00 a |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 10.00 b | 0 c | 0 c | 0 c | 10.00 b | 21.67 |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | 14.67 a | 0 c | 0 c | 0 c | 12.67 a | 10.33 b |
| <i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169 | 14.67 c | 0 d | 0 d | 0 d | 16.67 b | 25.00 a |
| <i>A. niger</i> ATCC 6275 | 16.33 b | 10.00 d | 0 e | 0 e | 13.67 c | 18.33 a |

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลขในแนวนอน เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติแบบมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ISP2 (Yeast-malt extract broth) SCB (Sodium caseinate broth) SCYB (Sodium caseinate yeast extract broth) NB (Nutrient broth) MEB (Malt extract broth) SSB (Soluble starch broth)

จากตารางที่ 4.7 เมื่อนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one way anova พบว่า เมื่อพิจารณาข้อมูลในแนวนอนสามารถแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหารแต่ละชนิด พบว่า ในอาหาร SSB มีกลุ่มค่าเฉลี่ยของการยับยั้งที่สูงที่สุด อยู่มากที่สุด โดยให้ค่าการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสูงที่สุดถึง 5 ชนิด ดังนั้นเมื่อต้องการสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ด้วยเมทานอล อาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงมากที่สุดคือ SSB

ส่วนการใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน ในการสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 6 ชนิด ไม่ปรากฏผลยับยั้งในจุลินทรีย์ทดสอบทุกสายพันธุ์

จากผลการคัดเลือก SSB เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ Nan 6.2 โดยให้ขอบเขตและค่าการยับยั้งสูงสุด ทั้งที่ใช้เอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลเป็นตัวทำละลาย และเมื่อใช้วิธีทางสถิติวิเคราะห์ผลเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการใช้สกัดสารปฏิชีวนะจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์และสารสกัดจากเมทานอลเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหาร SSB (Soluble starch broth)

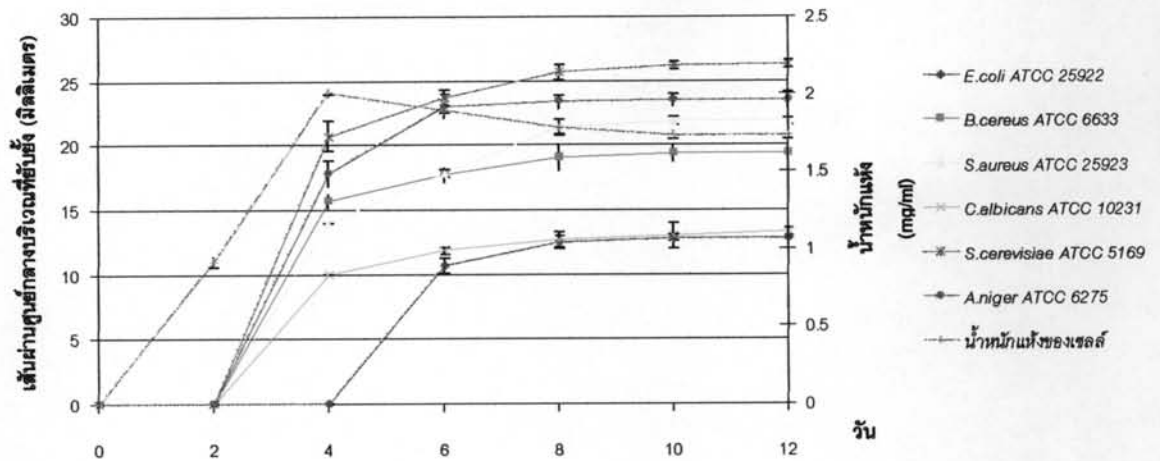
| จุลินทรีย์ทดสอบ | บริเวณยับยั้งด้วยสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (มิลลิเมตร) | |
|--------------------------------|---|-------------------|
| | สารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์ | สารสกัดจากเมทานอล |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 | 0 g | 0 g |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 11.33 ef | 13.00 de |
| <i>B. cereus</i> ATCC 6633 | 11.33 ef | 17.00 c |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 13.67 d | 21.67 b |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | 14.00 d | 10.33 f |
| <i>S. cerevisiae</i> ATCC 5169 | 22.00 b | 25.00 a |
| <i>A. niger</i> ATCC 6275 | 17.67 c | 18.33 c |

หมายเหตุ ตัวอักษรที่กำกับด้านขวาของตัวเลข เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ ทั้งทางแนวตั้งและแนวนอน ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติแบบมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 4.8 เมื่อนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี one way anova พบว่า เมื่อพิจารณาข้อมูลทั้งหมดสามารถแบ่งกลุ่มค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งได้แตกต่างกัน โดยเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งเมื่อเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหาร SSB (Soluble starch broth) พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ Nan 6.2 คือ เมทานอล เนื่องจากมีกลุ่มของค่าเฉลี่ยการยับยั้งในระดับสูงมากที่สุด กล่าวคือ สารสกัดจากเมทานอลออกฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิดได้ในระดับสูงสุด เมื่อเทียบกับสารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์ และเฮกเซน โดยสามารถยับยั้ง แบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* และ *S. aureus*), แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*), ยีสต์ (*S. cerevisiae* และ *C. albican*) และ รา (*A. niger*) ในขณะที่เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลายสารสกัดออกฤทธิ์ยับยั้งในระดับสูงรองลงมา ส่วนเฮกเซนไม่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ออกมาได้เลย

4.7 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

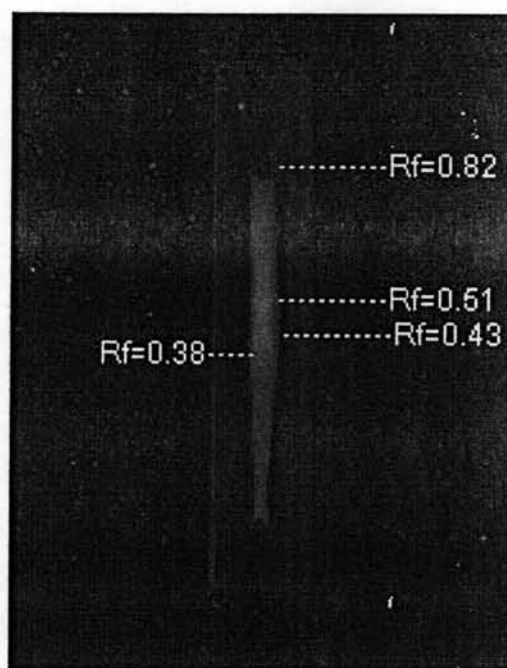
จากการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ในอาหารเหลว Soluble Starch Broth (SSB) โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 2 4 6 8 10 และ 12 ตามลำดับ นำน้ำเลี้ยงเชื้อมารองแยกเส้นใย และหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดด้วยเมทานอลแล้วนำมาทดสอบ พบว่าสารสกัดที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด คือ *B. cereus* *S. aureus* *E. coli* *S. cerevisiae* *C. albican* และ *A. niger* ซึ่งปริมาณสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างออกมาขึ้นอยู่กับเวลาในการเลี้ยงเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 จากกราฟพบว่าการเจริญของเชื้อ 4 วันแรกเป็นระยะ log phase จากนั้น เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากวันที่ 4 เป็นต้นไป การสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรียทดสอบส่วนใหญ่ สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 4 สำหรับสารยับยั้ง *E. coli* เริ่มสร้างหลังวันที่ 4 เป็นต้นไป และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงประมาณวันที่ 10 ซึ่งมีปริมาณสูงสุดและจะคงที่เรื่อยไป ดังนั้นในการเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะควรใช้เวลาอย่างน้อย 10 วัน



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 (ค่าเฉลี่ย \pm SD)

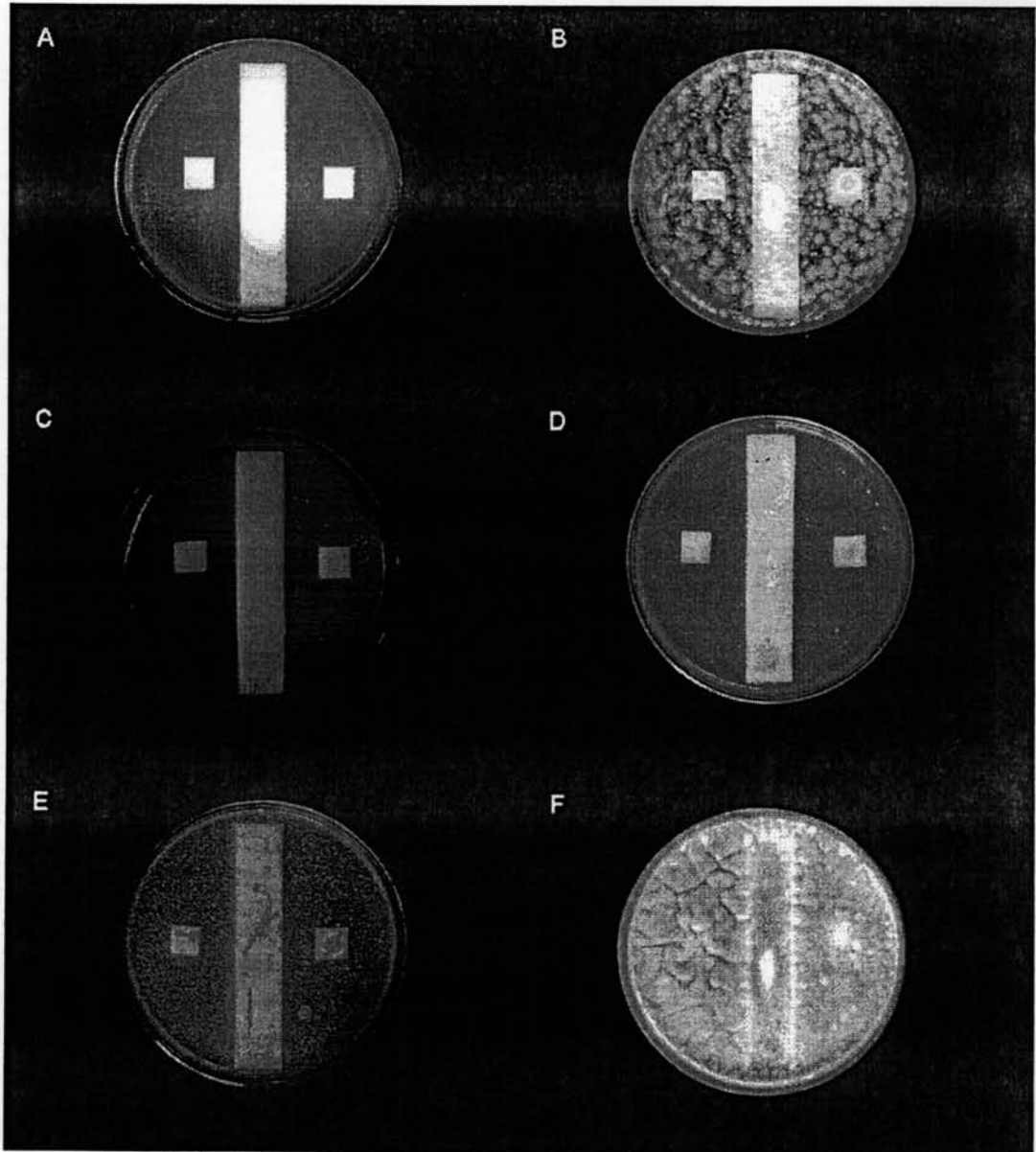
4.8 การแยกสารปฏิชีวนะเบื้องต้นด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ทำการแยกสารสกัดโดยใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น Silica gel60 F₂₅₄ โดยนำสารสกัดที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ SSB ที่เพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 เป็นเวลา 10 วัน ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่น TLC แล้วนำไป develop ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลในอัตราส่วน 3:2 โดยสารสกัดจากสายพันธุ์ Nan 6.2 ปรากฏตำแหน่งของสารออกมา 4 ตำแหน่งเมื่อตรวจสอบด้วยรังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร มีค่า Rf เท่ากับ 0.38 0.43 0.51 และ 0.82 ดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 แสดงการแยกสารสกัดจากสายพันธุ์ Nan 6.2 โดยใช้แผ่น TLC
ตรวจสอบภายใต้รังสี ยูวี ที่ความยาว คลื่น 365 นาโนเมตร

เมื่อนำแผ่น TLC ที่แยกสารได้นี้ไปทดสอบหาตำแหน่งของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่าบริเวณของ Rf 3 ตำแหน่ง เท่านั้น คือ 0.38 0.43 และ 0.51 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยยับยั้ง *B. cereus* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *C. albicans* ATCC 10231 *S. cerevisiae* ATCC 5169 และ *A. niger* ATCC 6275 ดังแสดงในรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากสายพันธุ์ Nan 6.2 ที่แยกได้ชั้นต้น

ด้วยแผ่น TLC

- A ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *E. coli* ATCC 25922
- B ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *B. cereus* ATCC 6633
- C ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *S. aureus* ATCC 25923
- D ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *C. albicans* ATCC 10231
- E ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *S. cerevisiae* ATCC 5169
- F ผลการยับยั้งเมื่อทดสอบกับ *A. niger* ATCC 6275

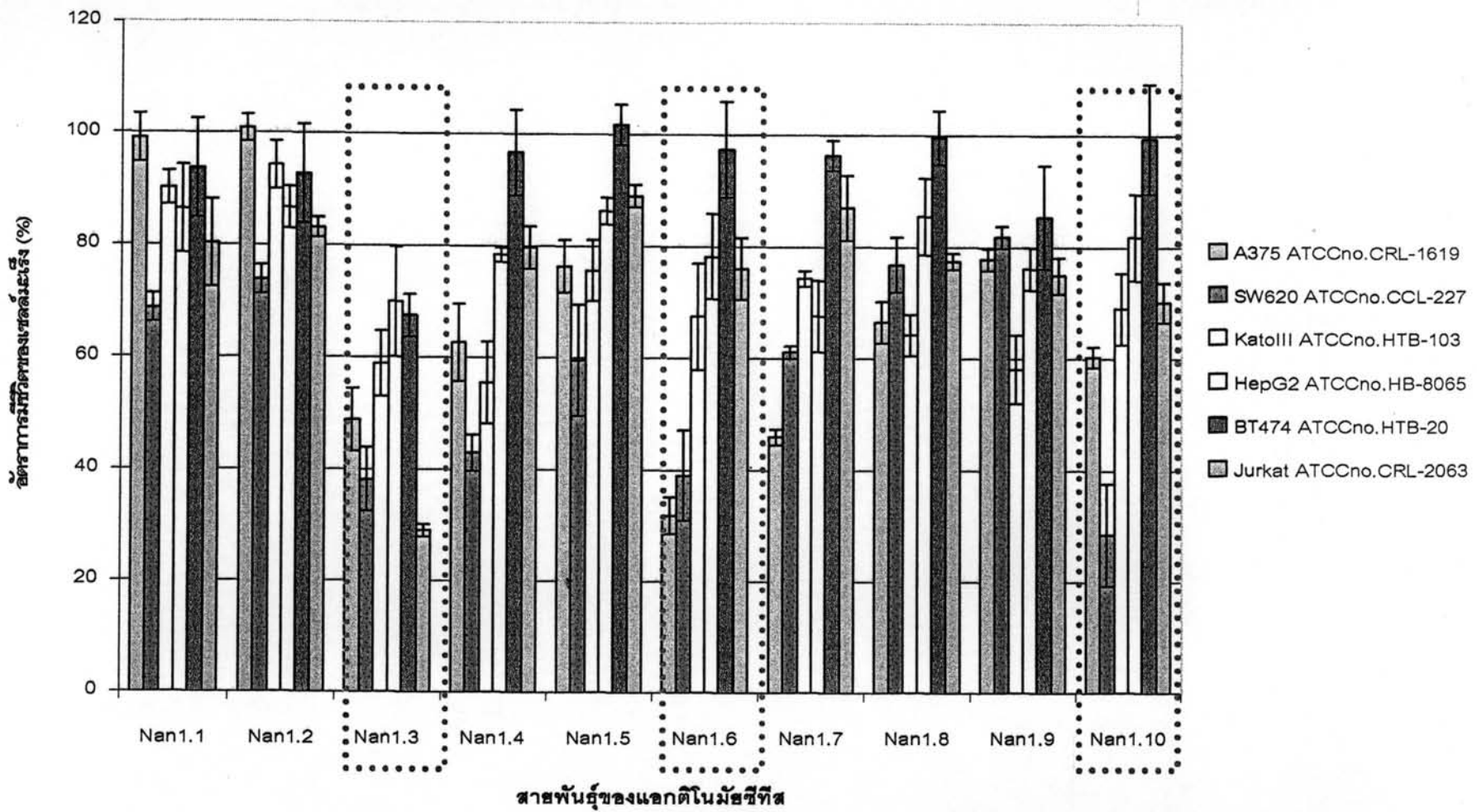
โดยแผ่น TLC ชั้นเล็ก ทางซ้ายและขวา เป็นชุดควบคุมผลลบ (แผ่น TLC ที่ไม่ได้หยดสารสกัด) และชุดควบคุมผลบวก (แผ่น TLC หยดสารสกัดแต่ไม่ผ่านการชะด้วยตัวทำละลาย) ตามลำดับ

4.9 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัซซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

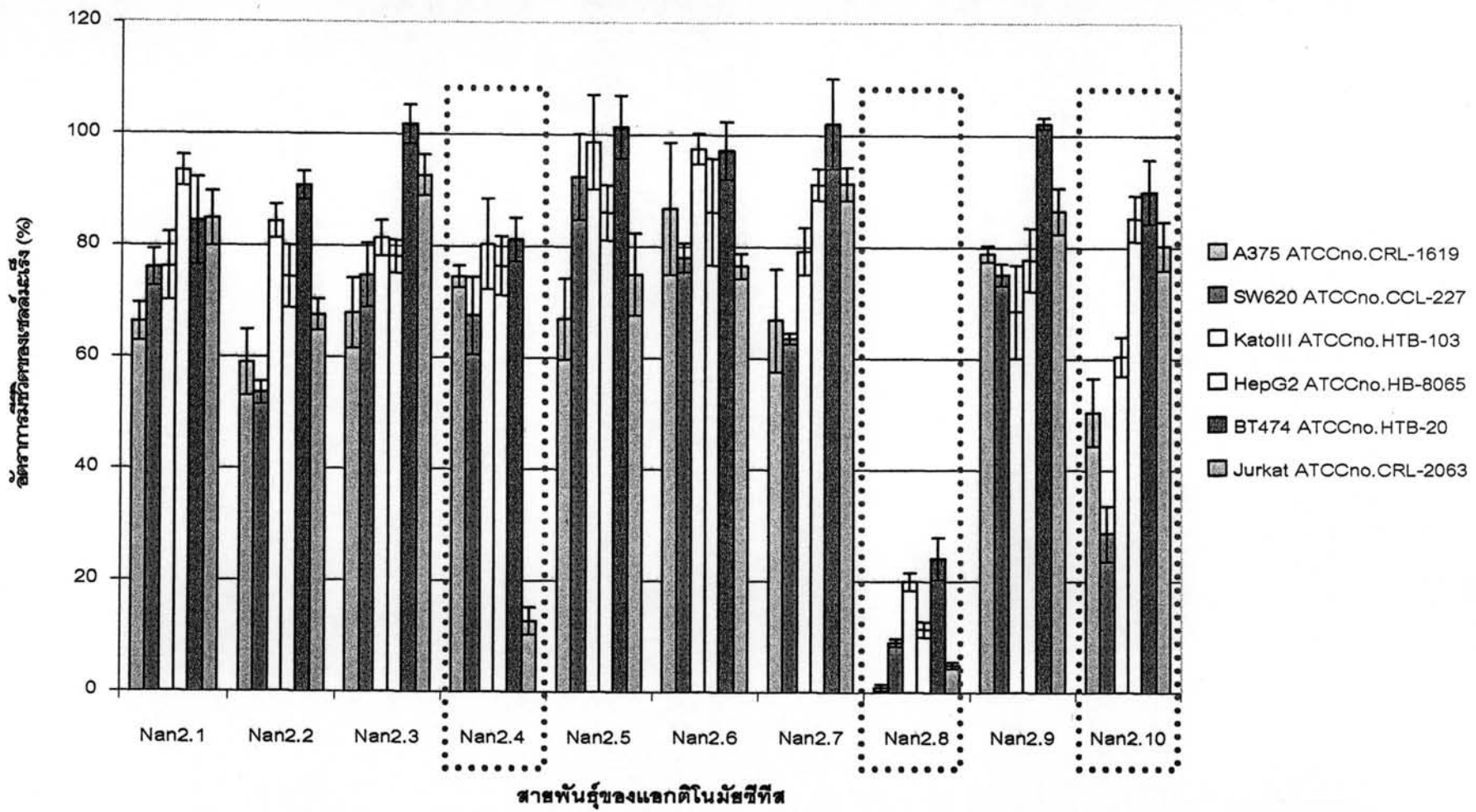
นำแอกติโนมัซซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด 61 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเหลว Malt Extract Broth (MEB) เป็นเวลา 10 วัน สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ระเหยเอทิลแอลกอฮอล์ออก และละลายสารสกัดด้วยสารละลาย 25%DMSO ได้สารสกัดทั้งหมด 61 ชนิด นำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT กับเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ (Human tumour cell lines) 6 ชนิด ดังนี้

| | | |
|---------|-----------------------------------|-----------------|
| A375 | (Human malignant melanoma) | ATCCno.CRL-1619 |
| SW620 | (Human colorectal adenocarcinoma) | ATCCno.CCL-227 |
| KatoIII | (Human gastric carcinoma) | ATCCno.HTB-103 |
| HepG2 | (Human hepatocellular carcinoma) | ATCCno.HB-8065 |
| BT474 | (Human ductal carcinoma) | ATCCno.HTB-20 |
| Jurkat | (Human acute T cell leukemia) | ATCCno.CRL-2063 |

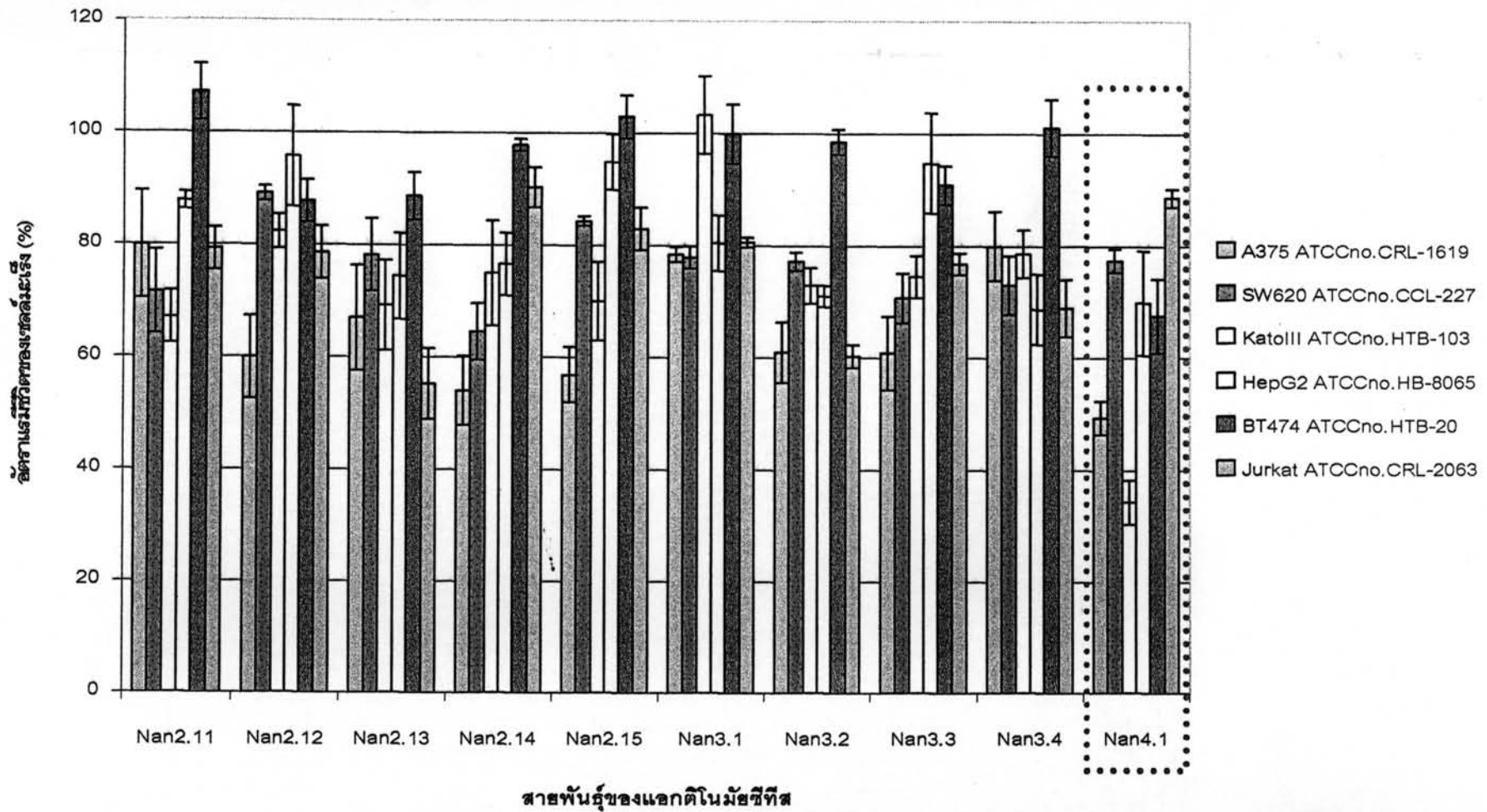
พบว่าแอกติโนมัซซีทีสแต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.18



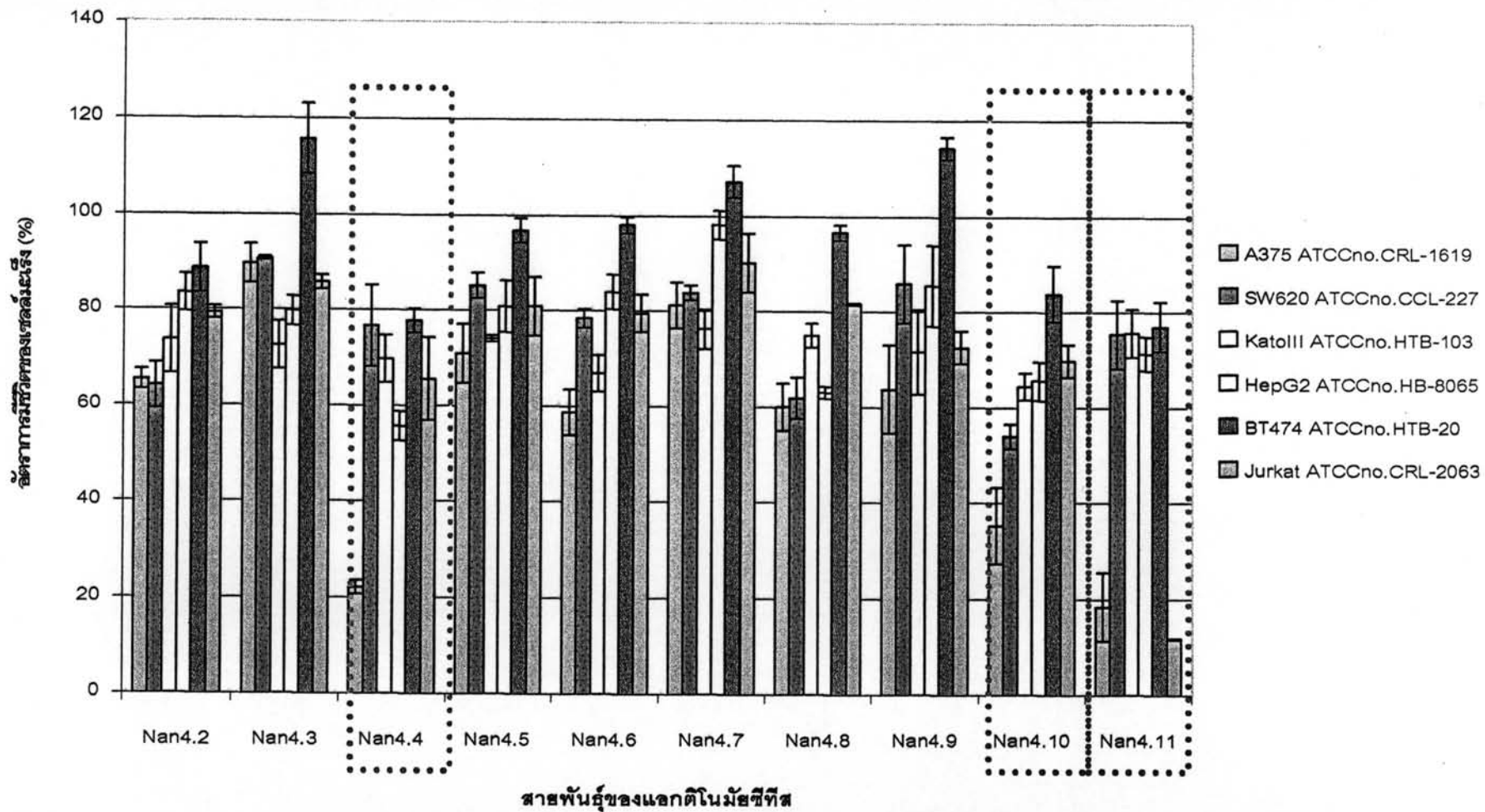
รูปที่ 4.18 แผนภูมิแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากแอกติโนมัซซีทีสสายพันธุ์ต่าง ๆ



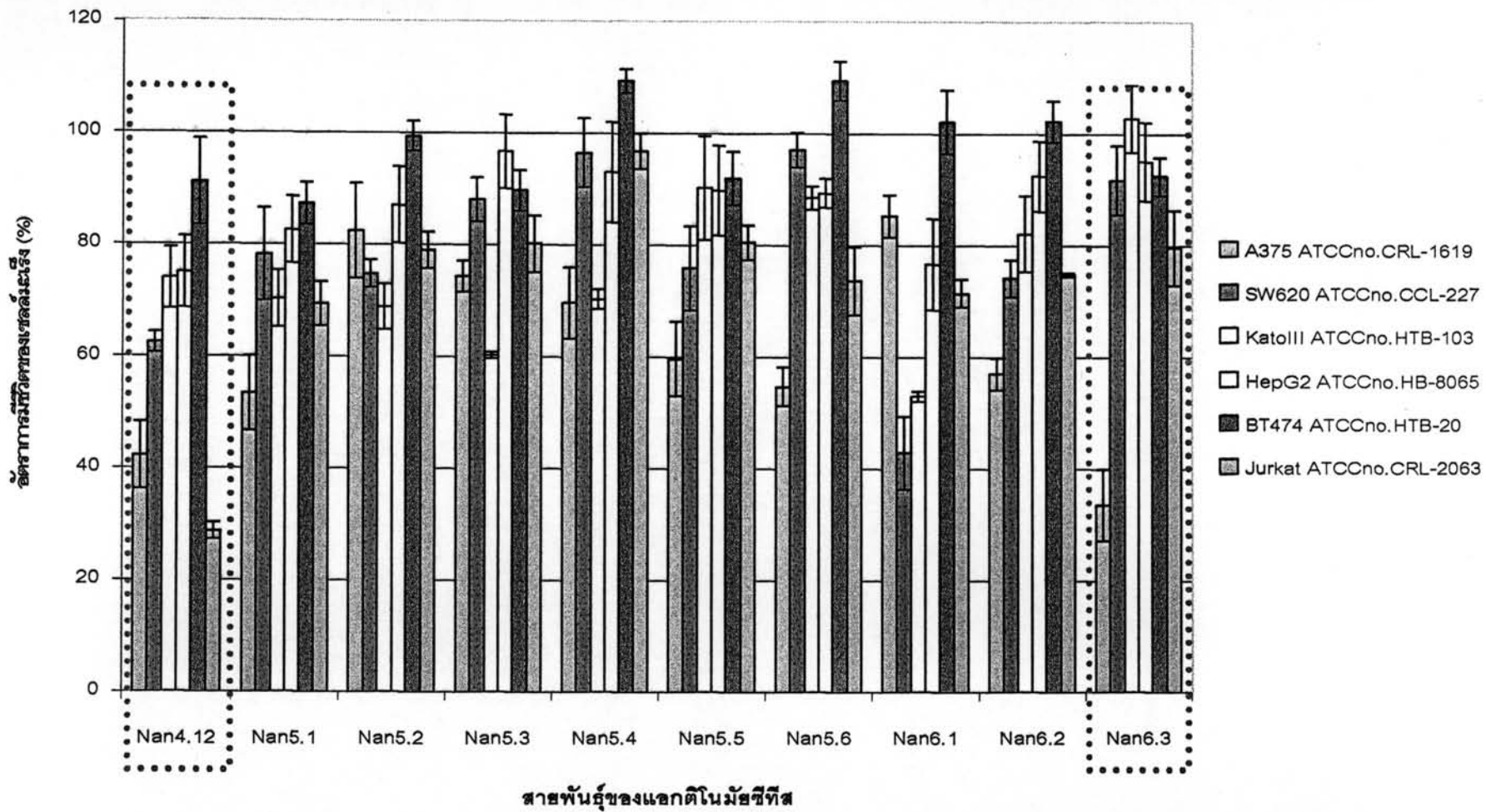
รูปที่ 4.18 (ต่อ)



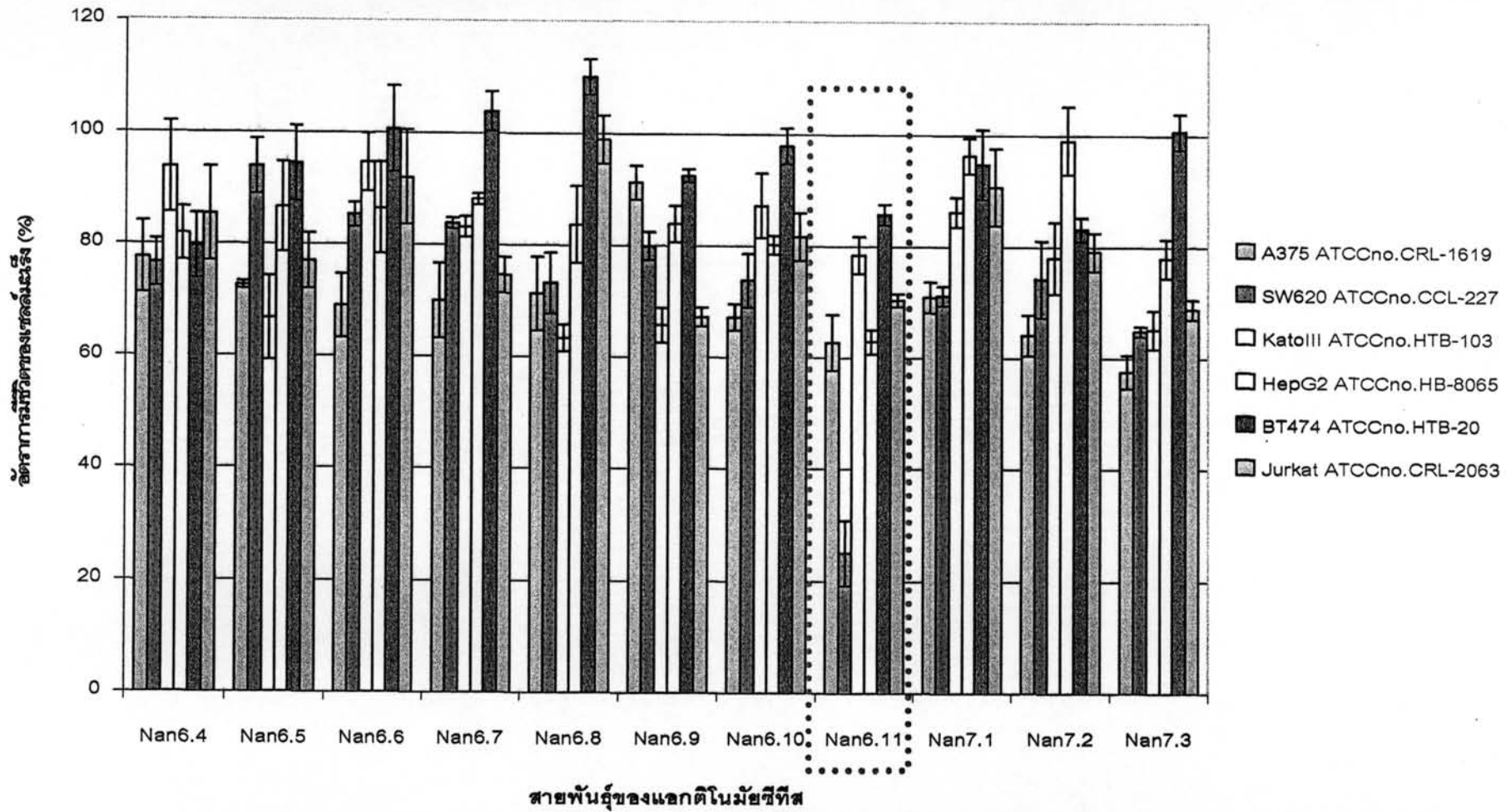
รูปที่ 4.18 (ต่อ)



รูปที่ 4.18 (ต่อ)



รูปที่ 4.18 (ต่อ)



รูปที่ 4.18 (ต่อ)

4.10 การจัดกลุ่มความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

จากการทดสอบการสร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ของแอกติโนมัยซีทีทั้งหมด 61 สายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยซีทีตามความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก คือ สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่สอง คือ สายพันธุ์ที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงการจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีที่นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

| ขอบเขตความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบ | สายพันธุ์แอกติโนมัยซีที | รวม | % |
|---|--|-----|-------|
| ทำให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ | Nan 1.3, Nan 1.6, Nan 1.10, Nan 2.4, Nan 2.8, Nan 2.10, Nan 4.1, Nan 4.4 Nan 4.10 Nan 4.11, Nan 4.12, Nan 6.3, Nan 6.11 | 13 | 21.31 |
| ทำให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการมีชีวิตมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ | Nan 1.1, Nan 1.2, Nan 1.4, Nan 1.5, Nan 1.7, Nan 1.8, Nan 1.9, Nan 2.1, Nan 2.2, Nan 2.3, Nan 2.5, Nan 2.6, Nan 2.7, Nan 2.9, Nan 2.11, Nan 2.12, Nan 2.13, Nan 2.14, Nan 2.15, Nan 3.1, Nan 3.2, Nan 3.3, Nan 3.4, Nan 4.2 Nan 4.3, Nan 4.5, Nan 4.6, Nan 4.7, Nan 4.8, Nan 4.9, Nan 5.1, Nan 5.2, Nan 5.3, Nan 5.4, Nan 5.5, Nan 5.6, Nan 6.1, Nan 6.2, Nan 6.4, Nan 6.5, Nan 6.6, Nan 6.7, Nan 6.8, Nan 6.9, Nan 6.10, Nan 7.1, Nan 7.2, Nan 7.3 | 48 | 78.69 |

จากตารางที่ 4.9 กลุ่มที่ทำให้เซลล์มะเร็งมีอัตราการมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนทั้งหมด 13 สายพันธุ์ คิดเป็น 21.31 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้ ซึ่งในการทดลองนี้สนใจสายพันธุ์ในกลุ่มแรก เนื่องจากเป็นกลุ่มที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในระดับสูง นำแอนติโมัยซีทีสกลุ่มแรกนี้มาจัดกลุ่มโดยแบ่งตามการออกฤทธิ์ต่อชนิดของเซลล์มะเร็ง ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 สรุปจำนวนสายพันธุ์ของแอนติโมัยซีทีสกลุ่มที่สร้างสารที่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งมนุษย์ โดยทำให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อป้อนสารสกัดกับเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตามชนิดของเซลล์มะเร็ง (ค่าเฉลี่ย \pm SD)

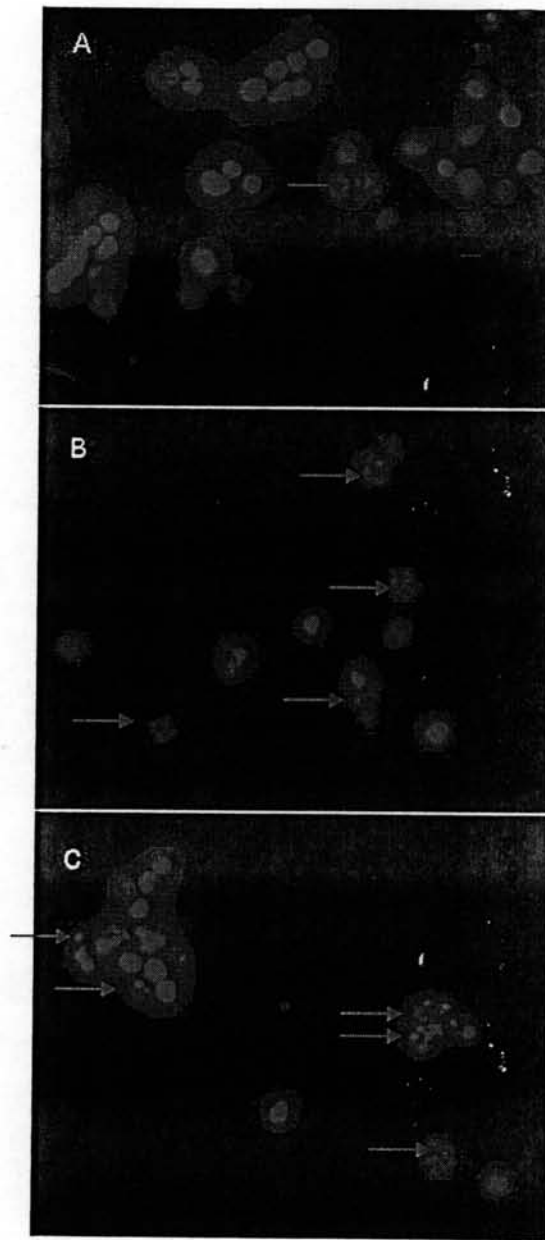
| สายพันธุ์แอนติโมัยซีทีส | อัตราการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งมนุษย์ (เปอร์เซ็นต์) | | | | | |
|-------------------------|---|---------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| | A375 Malignant | SW620 Colorectal | KatoIII Gastric | HepG2 Liver | BT474 Breast | Jurkat T cell |
| Nan 1.3 | > 40 | 38.21 \pm 5.70 | > 40 | > 40 | > 40 | 28.98 \pm 1.80 |
| Nan 1.6 | 31.85 \pm 3.32 | 39.03 \pm 8.06 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| Nan 1.10 | > 40 | 28.43 \pm 9.18 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| Nan 2.4 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | 12.77 \pm 2.44 |
| Nan 2.8 | 0.99 \pm 0.55 | 9.01 \pm 0.66 | 19.87 \pm 1.56 | 11.38 \pm 1.40 | 24.05 \pm 3.75 | 4.95 \pm 0.54 |
| Nan 2.10 | > 40 | 28.49 \pm 5.00 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| Nan 4.1 | > 40 | > 40 | 34.28 \pm 3.95 | > 40 | > 40 | > 40 |
| Nan 4.4 | 22.16 \pm 1.41 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| Nan 4.10 | 35.28 \pm 7.93 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| Nan 4.11 | 18.49 \pm 7.14 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | 11.85 \pm 0.10 |
| Nan 4.12 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | 28.69 \pm 1.49 |
| Nan 6.3 | 33.53 \pm 6.43 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |
| Nan 6.11 | > 40 | 25.04 \pm 5.75 | > 40 | > 40 | > 40 | > 40 |

จากตารางที่ 4.10 สารสกัดจากแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan2.8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ทั้ง 6 ชนิด นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้มากกว่าชนิดเดียว เช่น สายพันธุ์ Nan4.11 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ 2 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งผิวหนัง (Malignant : A375) และ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (T cell : Jurkat) เป็นต้น

แต่คุณสมบัติของการเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ตีนั้น ควรที่จะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แบบจำเพาะ จากตารางที่ 4.10 มีสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งชนิดเดียวถึง 9 สายพันธุ์ คิดเป็น 14.75 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้ทั้งหมด โดยสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แบบจำเพาะและออกฤทธิ์ยับยั้งได้ในระดับสูงสุด คือ สายพันธุ์ Nan 2.4 โดยทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 12.77 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคัดเลือกแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์นี้ เพื่อนำไปศึกษาต่อถึงการชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis ต่อไป

4.11 การศึกษาผลของสารสกัดจากแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ โดยวิธีย้อมด้วย DNA dye Hoechst 33342

เพื่อศึกษาว่าสารสกัดจากแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ทำลายเซลล์มะเร็งโดยกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิสหรือไม่ จึงทำการศึกษาผลของสารสกัดต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat ATCCno.CRL-2063) พบว่าสารสกัดจากแอกติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิส โดยมีเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิส 72.29 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลดังรูปที่ 4.19 และ 4.20

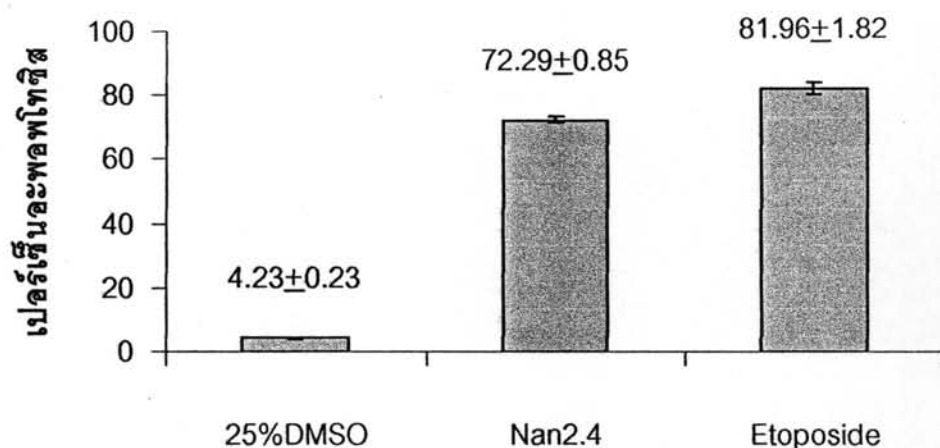


รูปที่ 4.19 ผลของสารสกัดจากแอนติโนมัยซีที่สลายพันธุ์ Nan 2.4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ Jurkat ATCCno.CRL-2063 เมื่อบ่มสารสกัดกับเซลล์มะเร็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 200 เท่า

A. เติมสารละลาย 25%DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นชุดเซลล์ผลลบควบคุม

B. เติมสารสกัดจากแอนติโนมัยซีที่สลายพันธุ์ Nan 2.4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

C. เติม Etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นชุดเซลล์ผลบวกควบคุม [เครื่องหมายลูกศรชี้ (—→) คือเซลล์ที่มีการตายแบบอะพอพโทซิส]



รูปที่ 4.20 กราฟแสดงผลของสารสกัดจากแอนติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง Jurkat เปรียบเทียบกับ สาร Etoposide เป็นชุดควบคุมบวก และสารละลาย 25%DMSO เป็นชุดควบคุมลบ (ค่าเฉลี่ย \pm SD)

จากรูปที่ 4.19 สารสกัดจากแอนติโนมายซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิส สังเกตได้จากนิวเคลียสภายในเซลล์แยกออกเป็นสวน ๆ ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์มะเร็งได้รับการกระตุ้นจากสารสกัดที่ทดสอบแล้วเซลล์เกิดการหดตัวจนนิวเคลียสแตก หากเพิ่มระยะเวลาการทดสอบนานขึ้น เซลล์จะเข้าสู่ระยะอะพอพโทซิสช่วงปลาย (late apoptosis) ซึ่งหลังจากนั้นเซลล์จะเกิดการสลายตัว (lysis)

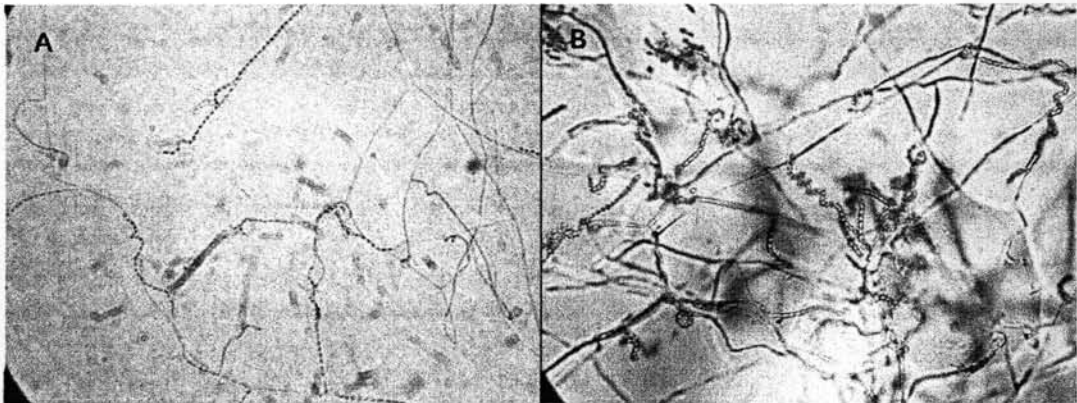
จากผลการทดลองข้างต้นสามารถคัดเลือกแอนติโนมายซีทีสได้ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Nan 2.4 ซึ่งแสดงผลการยับยั้งสูงสุดและจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat ATCCno.CRL-2063) และสายพันธุ์ Nan 6.2 ซึ่งมีขอบเขตการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบได้มากที่สุดและยังออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดได้ในระดับสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ นำแอนติโนมายซีทีสทั้งสองสายพันธุ์นี้ไปศึกษาต่อถึงลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และสัณฐานวิทยา เพื่อการจัดจำแนกต่อไป

4.12 การจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

ศึกษาตามวิธีรายงานโดย Williams และคณะ Bergey's Manual of systematic Bacteriology Volume 9 (Williams และคณะ, 1994) โดยทำการจำแนกด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

4.12.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope), กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาทำ slide culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 พบว่าสายพันธุ์ Nan 2.4 มีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศที่มีลักษณะค่อนข้างเป็นเส้นตรงยาวปลายโค้งงอ มีการสร้างสายสปอร์บนเส้นใย สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สายสปอร์มีลักษณะยาวและปลายสายสปอร์มีลักษณะเป็นวงเปิด โดยเริ่มขาดเป็นเกลียวหนึ่งถึงสองชั้น ส่วนสายพันธุ์ Nan 6.2 มีการสร้างสายสปอร์ยาวมีลักษณะขดม้วนเป็นเกลียวอย่างชัดเจน ดังรูปที่ 4.21



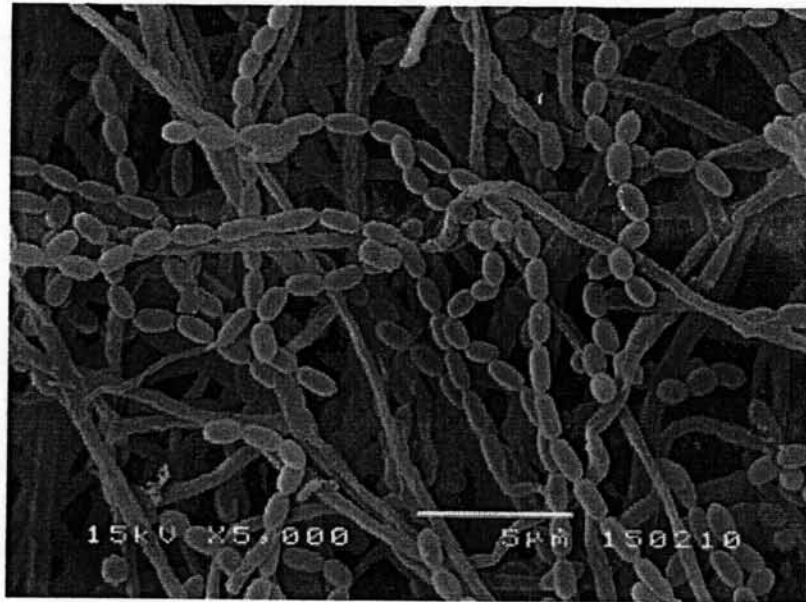
รูปที่ 4.21 ภาพเส้นใยและสายสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

จากกล้องจุลทรรศน์

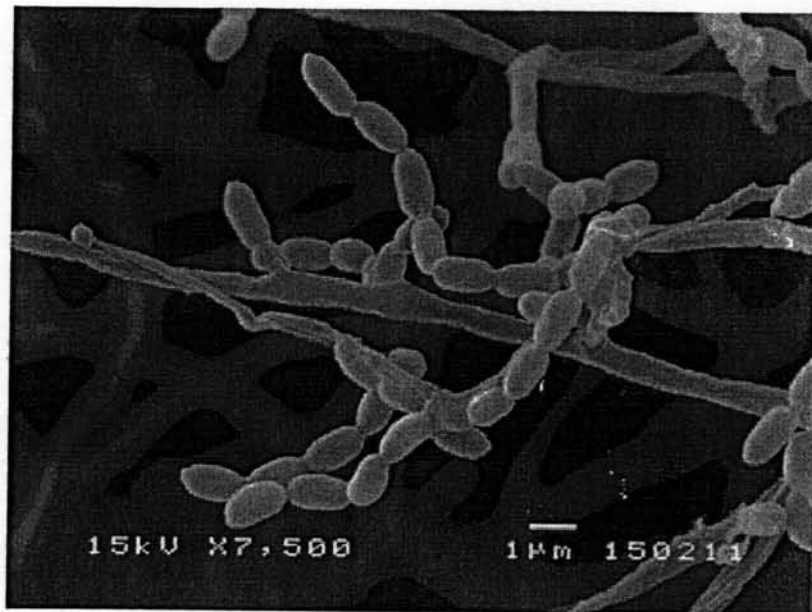
รูป A เส้นใยและสายสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 อายุ 4 วัน เส้นใยไม่หนาแน่น สายสปอร์ส่วนปลายเริ่มขาดเป็นเกลียว กำลังขยาย 100 X

รูป B เส้นใยและสายสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 อายุ 4 วัน เส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นหนา สายสปอร์มีการขดม้วนเป็นเกลียว กำลังขยาย 100 X

ทำการศึกษาลักษณะเส้นใย สปอร์และสายสปอร์เพิ่มเติมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.22 - 4.26



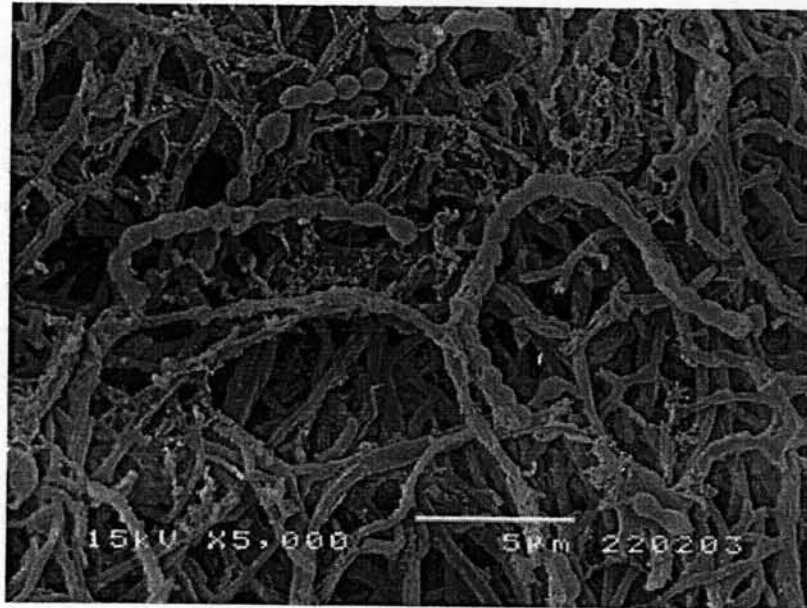
รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใยของ แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 4 วัน กำลังขยาย 5,000 X



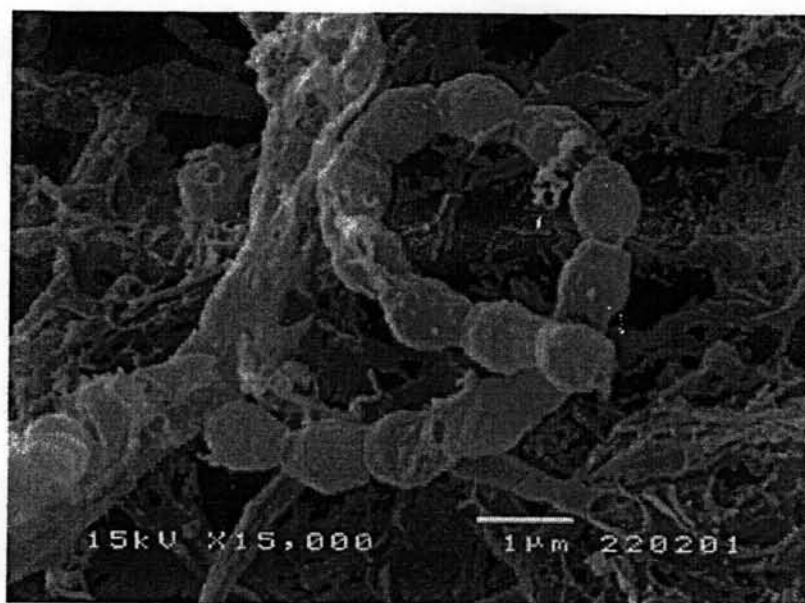
รูปที่ 4.23 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใยของ แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน กำลังขยาย 7,500 X

จากรูปที่ 4.22 และ 4.23 ลักษณะสปอร์และสายสปอร์เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าสายสปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 มีลักษณะค่อนข้างตรงยาว สปอร์มีลักษณะเป็นวงรียาว เรียงต่อกันเป็นสายยาว สปอร์มีผิวเรียบ

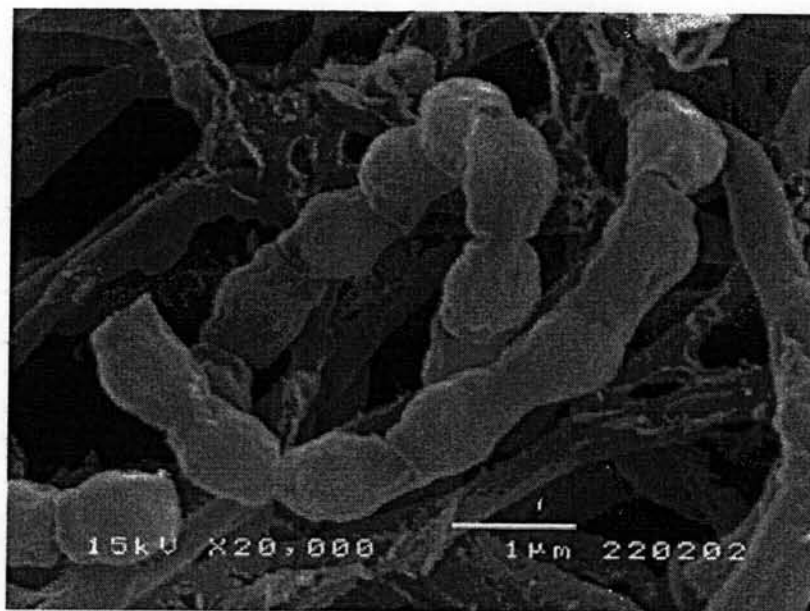
ส่วนในสายพันธุ์ Nan 6.2 พบว่ามีการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศหนาแน่น เส้นใยมีการแตกแขนงจำนวนมาก สายสปอร์เป็นสายยาวและขดม้วนเป็นเกลียวเมื่อเจริญเต็มที่ สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ สปอร์มีรูปร่างรี ผิวสปอร์เป็นริ้วลาย แสดงดังรูปที่ 4.24 - 4.26



รูปที่ 4.24 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสปอร์และเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2 อายุ 5 วัน กำลังขยาย 5,000 X



รูปที่ 4.25 ภาพถ่ายกำลังสูงจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงสายสไปรซิดเป็นเกลียวของแอกติโนมายซีที่สลายพันธุ์ Nan 6.2 ที่เจริญเต็มที่ อายุ 6 วัน กำลังขยาย 15,000 X



รูปที่ 4.26 ภาพถ่ายกำลังสูงจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะพื้นผิวสไปรซิดของแอกติโนมายซีที่สลายพันธุ์ Nan 6.2 กำลังขยาย 20,000 X

ภาพถ่ายโครงสร้างของแอกติโนมัยซีทีสที่ได้คัดเลือกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* และสกุลที่เกี่ยวข้อง เพราะพบการสร้างเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศจำนวนมาก ลักษณะสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว เมื่อสายสปอร์แก่จะแตกออกจากเส้นใยหลักเป็นสายสปอร์เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่มของสายสปอร์ สายพันธุ์ Nan 2.4 สายสปอร์มีลักษณะค่อนข้างตรง ส่วนปลายโค้งงอหรือม้วนเป็นเกลียว สายสปอร์ยาวมากโดยแตกออกจากส่วนปลายของเส้นใยหลัก สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ ผิวสปอร์เรียบ สปอร์รูปร่างรียาว ส่วนสายพันธุ์ Nan 6.2 สปอร์รูปวงรี สายสปอร์มีลักษณะม้วนเป็นเกลียว เมื่อเจริญเต็มที่เกลียวจะมีลักษณะม้วนเป็นวงหลายชั้น เป็นแบบขดเป็นเกลียว (spiral) สปอร์เคลื่อนที่ไม่ได้ ผิวสปอร์เป็นริ้วลายไม่เรียบ ซึ่งลักษณะต่างๆ ดังกล่าวเป็นลักษณะโครงสร้างที่พบเด่นชัดใน สกุล *Streptomyces* การศึกษาทางสรีระวิทยาเพิ่มเติมและการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA จะทำให้ทราบถึงสกุล และสปีชีส์ที่แน่นอนของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ต่อไป

4.12.2 การศึกษาการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project (ISP) media

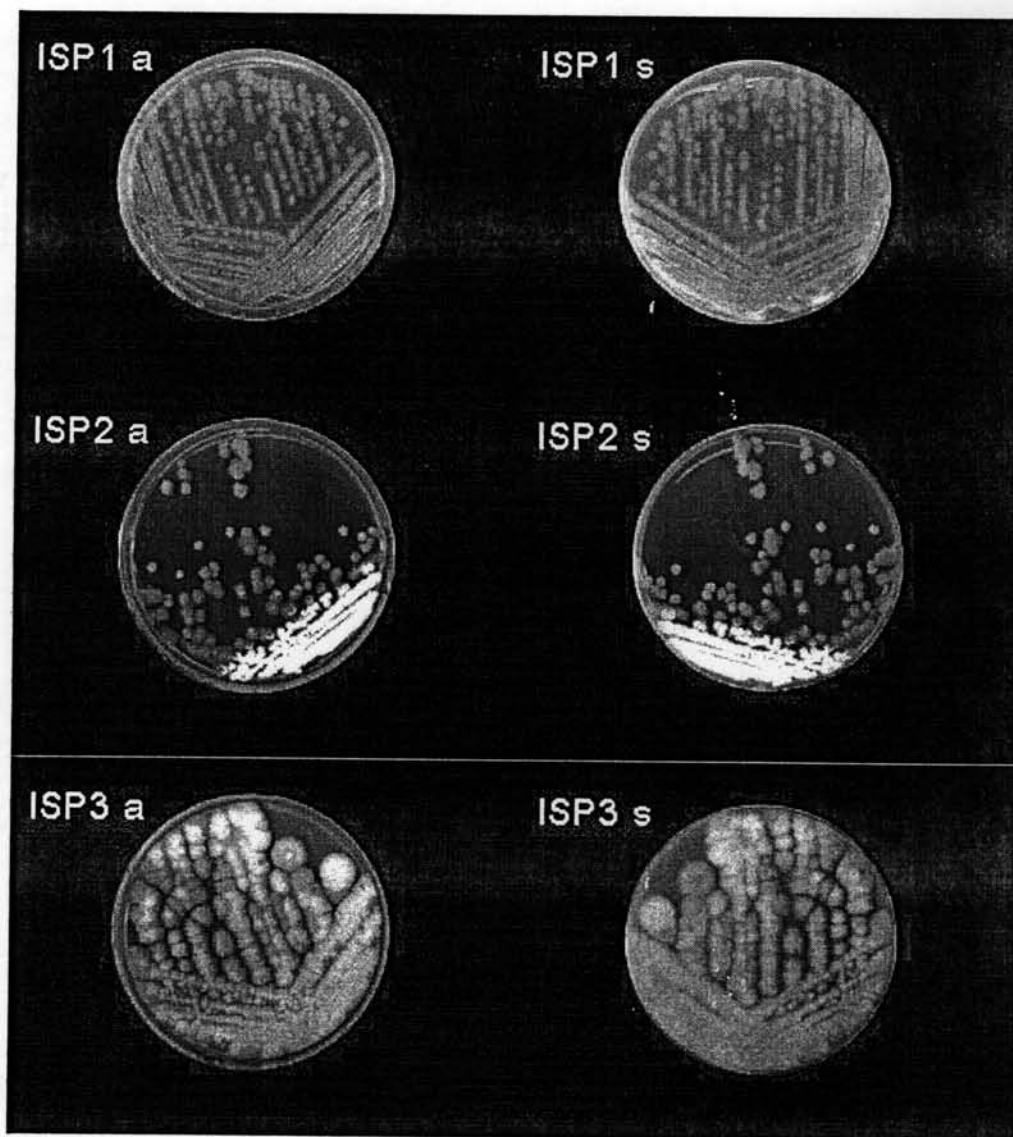
จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 6 ชนิด คือ

| | | |
|------|------|---------------------------------|
| ISP1 | TYEA | Tryptone-yeast extract agar |
| ISP2 | YMEA | Yeast-malt extract agar |
| ISP3 | OA | Oat meal agar |
| ISP4 | ISSA | Inorganic salts starch agar |
| ISP5 | GAA | Glycerol asparagines agar |
| ISP6 | PYEA | Peptone-yeast extract iron agar |

ลักษณะการเจริญ ลักษณะของเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหาร สปอร์ และรงควัตถุที่ละลายน้ำ แสดงในตารางที่ 4.11 และ รูปที่ 4.27 – 4.28

ตารางที่ 4.11 แสดงการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ

| อาหาร | ลักษณะ | | | | |
|---|----------|------------------------|------------------------|-----------------|---------------------|
| | การเจริญ | ปริมาณและสีเส้นใยอาหาร | ปริมาณและสีเส้นใยอากาศ | จำนวนและสีสปอร์ | รงควัตถุที่ละลายน้ำ |
| แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 | | | | | |
| ISP1 (Tryptone-yeast extract agar) | ปานกลาง | ปานกลาง, สีเหลือง | น้อย, สีน้ำตาล | น้อย, สีขาว | ไม่สร้าง |
| ISP2 (Yeast-malt extract agar) | ปานกลาง | ปานกลาง, สีเหลือง | ปานกลาง, สีขาว | มาก, สีขาว | ไม่สร้าง |
| ISP3 (Oat meal agar) | มาก | มาก, สีเหลือง | มาก, สีขาว | มาก, สีขาวเทา | ไม่สร้าง |
| ISP4 (Inorganic salts starch agar) | ปานกลาง | ปานกลาง, สีเหลือง | ปานกลาง, สีขาว | ปานกลาง, สีขาว | ไม่สร้าง |
| ISP5 (Glycerol asparagines agar) | ปานกลาง | ปานกลาง, สีเหลือง | ไม่สร้าง | ไม่สร้าง | ไม่สร้าง |
| ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar) | ปานกลาง | น้อย | น้อย | ไม่สร้าง | ไม่สร้าง |
| แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 | | | | | |
| ISP1 (Tryptone-yeast extract agar) | มาก | มาก, สีครีมเหลือง | มาก, สีขาว | มาก, สีเทาขาว | ไม่สร้าง |
| ISP2 (Yeast-malt extract agar) | มาก | มาก, สีเหลือง | มาก, สีครีม | มาก, สีเทา | ไม่สร้าง |
| ISP3 (Oat meal agar) | มาก | มาก, สีเทา | มาก, สีเทา | มาก, สีเทาดำ | ไม่สร้าง |
| ISP4 (Inorganic salts starch agar) | มาก | มาก, สีครีมเหลือง | มาก, สีขาว | มาก, สีขาว | ไม่สร้าง |
| ISP5 (Glycerol asparagines agar) | ปานกลาง | ปานกลาง, สีครีมเหลือง | ปานกลาง, สีครีม | ปานกลาง, สีขาว | ไม่สร้าง |
| ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar) | ปานกลาง | ปานกลาง, สีเหลือง | ปานกลาง, สีขาว | น้อย, สีขาว | ไม่สร้าง |

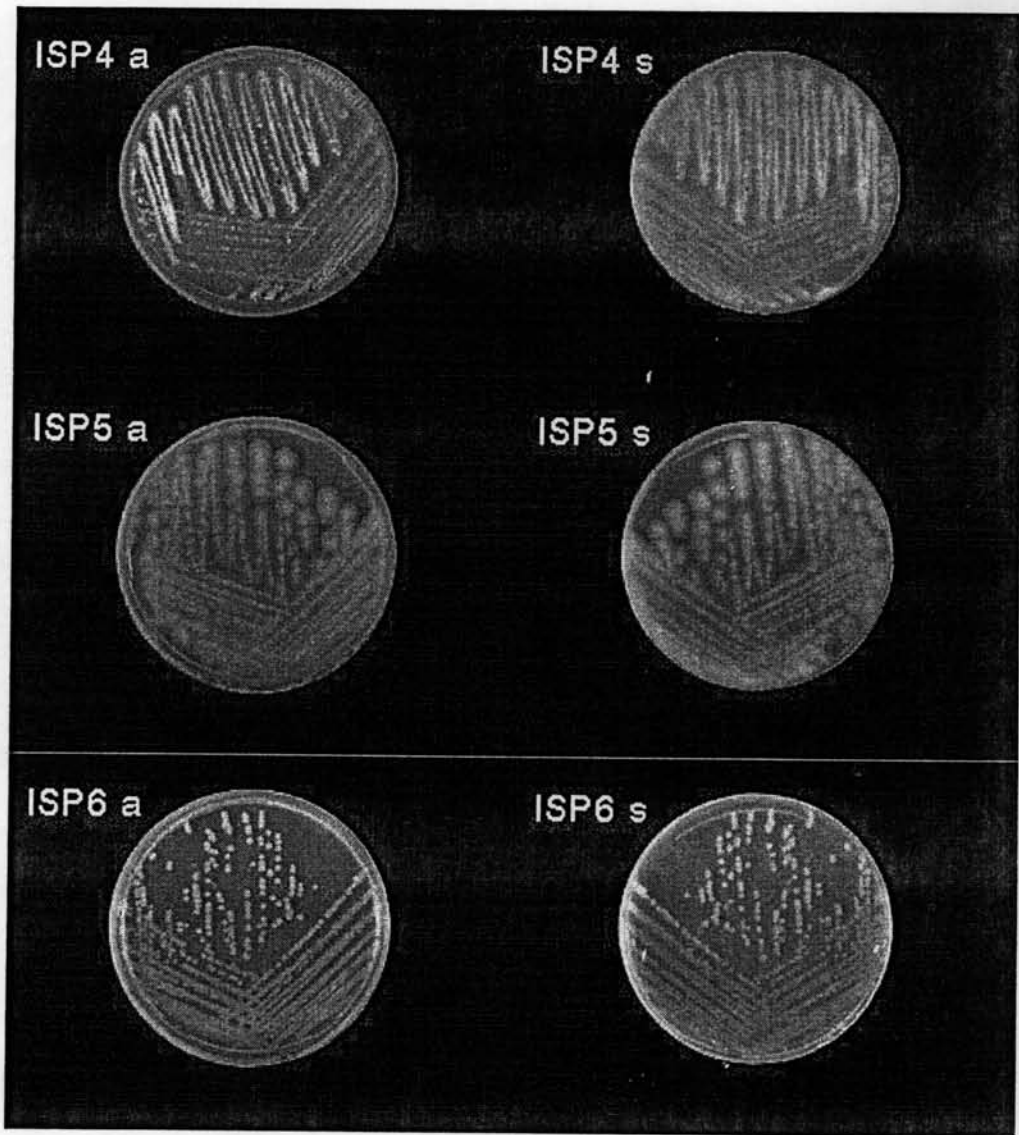


รูปที่ 4.27 ลักษณะโคโลนีของแอสเพอริลลัส นิดูแลนซ์ Nan 2.4 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ

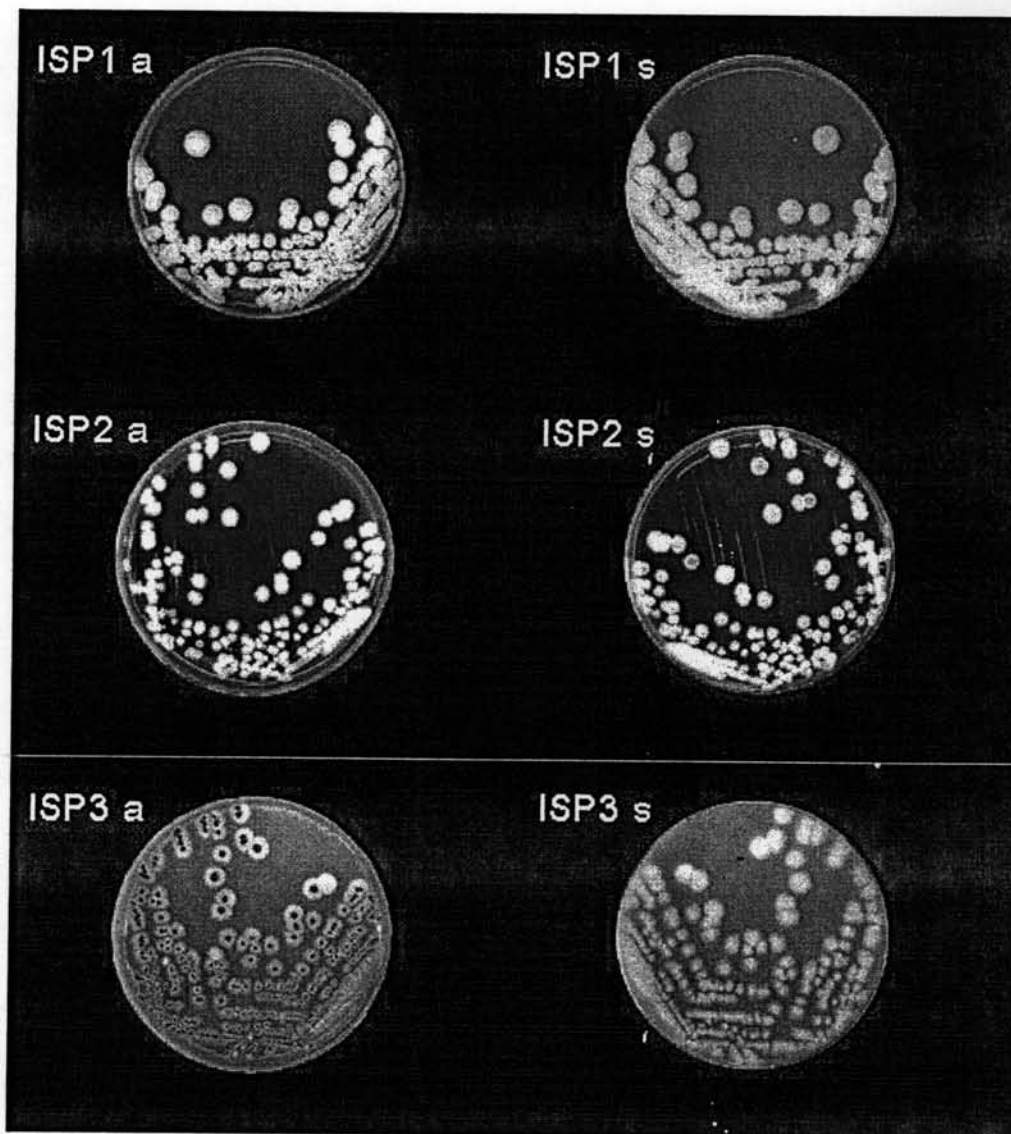
a ลักษณะเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

s ลักษณะเส้นใยอาหาร (substrate mycelium)

หมายเหตุ ISP ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ISP1 (Tryptone-yeast extract agar), ISP2 (Yeast-malt extract agar), ISP3 (Oat meal agar), ISP4 (Inorganic salts starch agar), ISP5 (Glycerol asparagines agar) และ ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar)



รูปที่ 4.27 (ต่อ)

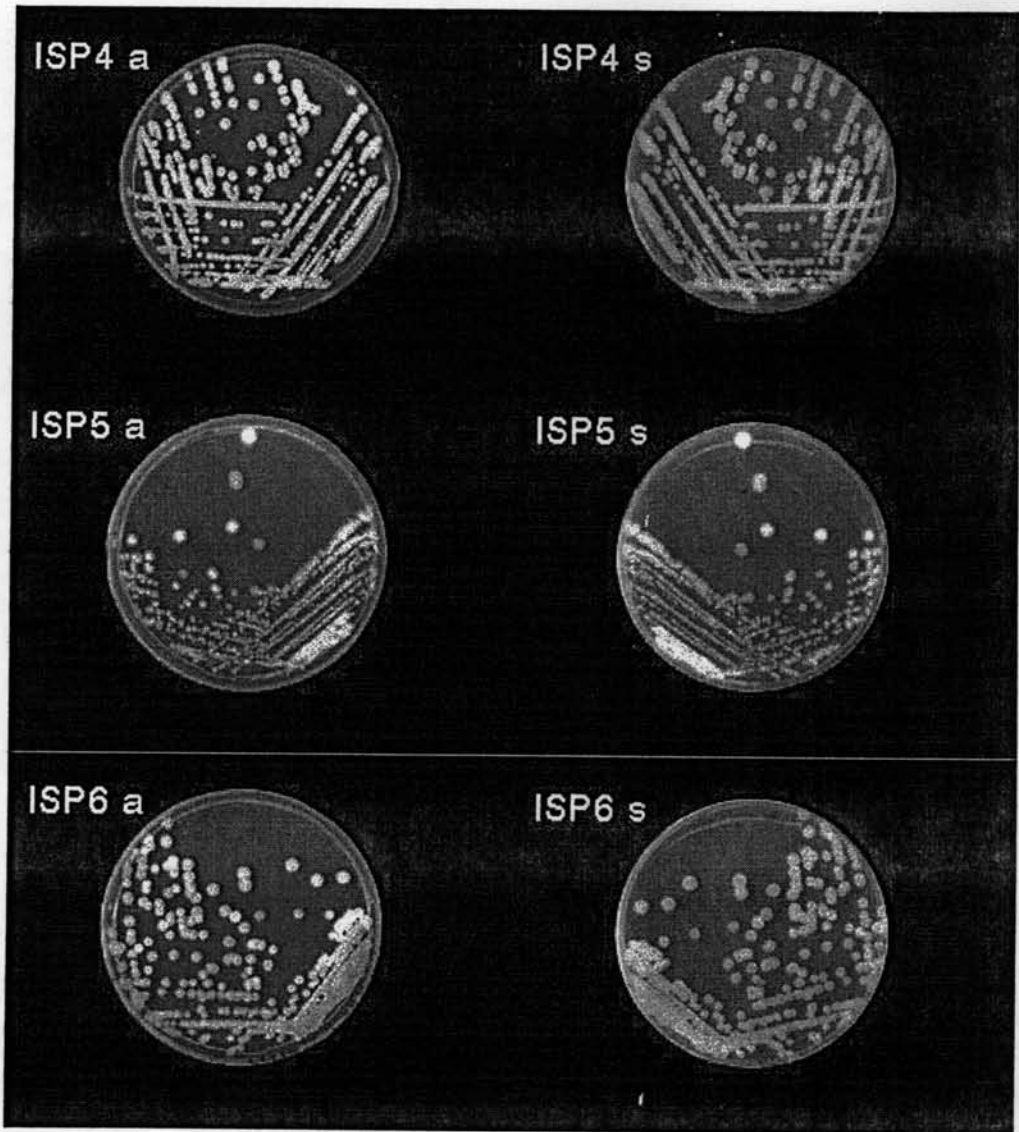


รูปที่ 4.28 ลักษณะโคโลนีของแอสเพอริลลัสฟูมิกัสสายพันธุ์ Nan 6.2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP ชนิดต่าง ๆ

a ลักษณะเส้นใยอากาศ (aerial mycelium)

s ลักษณะเส้นใยอาหาร (substrate mycelium)

หมายเหตุ ISP ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ISP1 (Tryptone-yeast extract agar), ISP2 (Yeast-malt extract agar), ISP3 (Oat meal agar), ISP4 (Inorganic salts starch agar), ISP5 (Glycerol asparagines agar) และ ISP6 (Peptone-yeast extract iron agar)



รูปที่ 4.28 (ต่อ)

4.12.3 การศึกษาการสร้างรงควัตถุเมลานิน

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเยือก Peptone Yeast Extract Iron Agar และอาหารวุ้นเยือก Tyrosine Agar สามารถตรวจสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน จากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร Peptone Yeast Extract Iron Agar ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งในสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 แต่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเจริญบนอาหาร Tyrosine agar ในสายพันธุ์ Nan 2.4 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีดำบริเวณที่โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสเจริญอยู่

4.12.4 การรีดิวส์ในเตรท

จากการแทง (stab) แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate Agar สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อหยดด้วยสารละลาย A และ B แสดงว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์สามารถรีดิวส์ในเตรทได้

4.12.5 การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

จากการขีด (streak) แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนผิวหน้าอาหารวุ้นเยือก Peptone Yeast Extract Iron Agar ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อของทั้งสองสายพันธุ์ แต่สีของอาหารวุ้นเยือก TSI เปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม แสดงว่ามีการสร้างกรด แต่ไม่มีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ คุณสมบัติทางชีวเคมีแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงความสามารถในการสร้างรงควัตถุเมลานิน, การรีดิวส์ในเตรท และการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

| การทดสอบ | ผลการทดสอบของแอกติโนมัยซีทีส | |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------|
| | สายพันธุ์ Nan 2.4 | สายพันธุ์ Nan 6.2 |
| การสร้างรงควัตถุเมลานิน | + | - |
| การรีดิวส์ในเตรท | + | + |
| การสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ | - | - |

หมายเหตุ + : ผลการทดสอบเป็นบวก - : ผลการทดสอบเป็นลบ

4.12.6 การศึกษาสมบัติการย่อยสลาย

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar ที่เติมสารที่ต้องการตรวจสอบการย่อยสลายสารแต่ละชนิดลงไป ผลแสดงดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงความสามารถในการย่อยสลายสารทดสอบของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

| สารทดสอบ | ผลการย่อยสลายสารโดยแอกติโนมัยซีทีส | |
|----------|------------------------------------|-------------------|
| | สายพันธุ์ Nan 2.4 | สายพันธุ์ Nan 6.2 |
| Adenine | + | + |
| Tyrosine | + | + |
| Xylan | + | + |
| Xanthine | + | + |
| Casein | + | + |
| Gelatin | + | + |
| Starch | + | + |

หมายเหตุ + : ย่อย - : ไม่ย่อย

4.12.7 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4 10 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส และตรวจสอบการเจริญ ได้ผลการเจริญแสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | สายพันธุ์ Nan 2.4 | สายพันธุ์ Nan 6.2 |
|-------------------------|-------------------|-------------------|
| 4 | - | - |
| 10 | - | - |
| 37 | + | + |
| 45 | - | + |
| 55 | - | - |

หมายเหตุ + : เจริญ - : ไม่เจริญ

4.12.8 การตรวจสอบการเจริญที่พีเอชต่าง ๆ

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4 4.5 5 5.5 6 8 8.5 และ 9 ผลการเจริญแสดงดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 แสดงความสามารถในการเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ที่พีเอชต่าง ๆ

| สายพันธุ์ \ พีเอช | 4 | 4.5 | 5 | 5.5 | 6 | 8 | 8.5 | 9 |
|-------------------|---|-----|---|-----|---|---|-----|---|
| Nan 2.4 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Nan 6.2 | + | + | + | + | + | + | + | + |

หมายเหตุ + : เจริญ - : ไม่เจริญ

4.12.9 การตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่เติมแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้ไนโตรเจน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมคืออาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมบวกคืออาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่เติมแอสปาราจีน ผลแสดงดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์
Nan 2.4 และ Nan 6.2

| แหล่งไนโตรเจน | การเจริญของแอกติโนมัยซีทีส | |
|----------------------|----------------------------|-------------------|
| | สายพันธุ์ Nan 2.4 | สายพันธุ์ Nan 6.2 |
| <i>L</i> -arginine | + | + |
| <i>L</i> -histidine | + | + |
| <i>L</i> -methionine | + | + |
| Potassium nitrate | - | + |
| <i>L</i> -theonine | + | + |
| <i>L</i> -valine | + | + |
| <i>L</i> -alanine | - | + |
| <i>L</i> -glutamine | + | + |

หมายเหตุ + : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก
- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ
(ชุดควบคุมบวกเติม *L*- asparagines เป็นแหล่งไนโตรเจน)
(ชุดควบคุมลบไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)

4.12.10 การตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอน

จากการนำแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่เติมแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดลงไปเพื่อตรวจสอบการใช้คาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน และชุดควบคุมบวก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่เติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลแสดงดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 แสดงความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์

Nan 2.4 และ Nan 6.2

| แหล่งคาร์บอน | การเจริญของแอกติโนมัยซีทีส | |
|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| | สายพันธุ์ Nan 2.4 | สายพันธุ์ Nan 6.2 |
| <i>L</i> -arabinose | - | + |
| Dextran | + | + |
| <i>D</i> -fructose | - | + |
| <i>D</i> -galactose | + | + |
| <i>meso</i> -inositol | + | + |
| <i>D</i> -lactose | + | + |
| <i>D</i> -manital | + | + |
| <i>D</i> -manose | + | + |
| <i>L</i> -rhamnose | + | + |
| Sucrose | + | + |
| Threhalose | + | + |
| Xylose | - | + |
| Sodium acetate | - | - |
| Sodium citrate | - | - |

หมายเหตุ + : เจริญมากกว่าชุดควบคุมลบหรือเท่ากับชุดควบคุมบวก

- : เจริญเท่ากับหรือน้อยกว่าชุดควบคุมลบ

(ชุดควบคุมบวกเติมกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน)

(ชุดควบคุมลบไม่เติมแหล่งคาร์บอน)

4.13 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยวิเคราะห์ ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

จากการจำแนกสกุลของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan2.4 และ Nan6.2 ตามหลักการ จำแนกอ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 9..(Williams และคณะ, 1994) พบว่าแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan2.4 และ Nan6.2 จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* จากผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ที่แน่ชัดได้

เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ในระดับชีวโมเลกุลของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 กับแอกติโนมัยซีทีสที่มีอยู่ใน GenBank จึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA โดยให้ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.29 และ รูปที่ 4.30 ตามลำดับ

```
5'CGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAA
CACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTC
TAATACCGGATACGAGCCTCCAAGGCATCTTGGAGGTTGGAAAGCTCCGG
CGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCT
CACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC
GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGG
TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
CGGCTTGTCACGTGCGATTGTGAAAGCCCAGGCTTAACCTCGGGTCTGCA
GTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGG
ATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC
AGGATTAGATATCCTGGTAGTCCACGTCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGT
TGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCCCG
CTTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTCCCCCCT
TGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGC
ATGCCCTTCGGGGTGGTGGGACTCACAGGAGACCGCCGGG3'
```

รูปที่ 4.29 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์

Nan 2.4 จำนวน 1,083 เบส

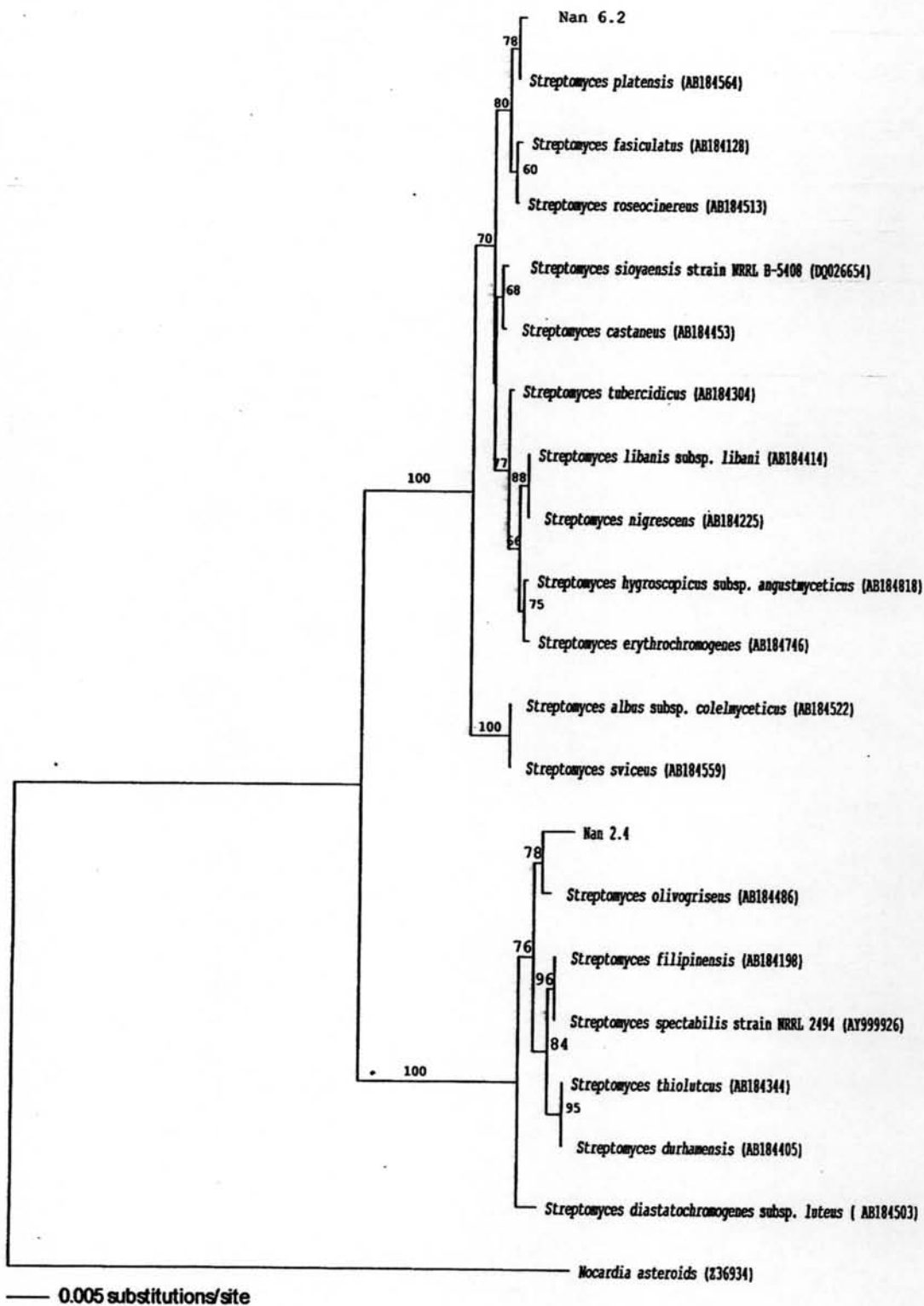
5'CGAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGG
TCTAATACCGGATATGACGCGCGACCGCATGGTCTGTGCGTGGAAAGCTC
CGGCGGTGAAGGATGAGCCC GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATG
GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGA
CGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
AGGCGGCTTGTGCGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCT
GCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGG
CGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
AACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTCCG
TGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCC
CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCCTGGAGACAGGGTCCCC
CTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAG
CATGCCTTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTC
GGA3'

รูปที่ 4.30 แสดงลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์

Nan 6.2 จำนวน 1,097 เบส

จากการนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่บันทึกและรวบรวมไว้ใน GenBank DNA database พบว่าลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 คล้ายกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ *Streptomyces* มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ ที่ระดับความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ Nan 6.2 มีลำดับเบส 16S rRNA คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของ *Streptomyces* มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ที่ระดับความเหมือนที่ 99 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงนำเอาข้อมูลลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่ได้มาทำการศึกษาความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสที่ได้จาก GenBank กับแอกติโนมัยซีทีสที่ได้ศึกษาครั้งนี้โดยการทำ Phylogenetic tree ให้ผลแสดงดังรูปที่ 4.31

NJ



รูปที่ 4.31 Phylogenetic tree แสดงการจัดความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีทีสที่ได้จาก GenBank กับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap ที่ 100 ซ้ำ

จากรูปที่ 4.31 การทำ phylogenetic tree สามารถจัดแยกดีเอ็นเอที่มีทั้งสองสายพันธุ์ เข้ากับกลุ่มของ *Streptomyces* ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดได้ โดยแยกดีเอ็นเอที่มีสายพันธุ์ Nan 2.4 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces olivogriseus* มากที่สุด และแยกดีเอ็นเอที่มีสายพันธุ์ Nan 6.2 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces platensis* มากที่สุด เมื่อนำข้อมูลทาง สันฐานวิทยา และสรีรวิทยามาพิจารณาร่วมกันกับข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์ในการจำแนกระดับ สายพันธุ์ของแยกดีเอ็นเอที่มีสายพันธุ์ การเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ดังกล่าวระหว่างแยกดีเอ็นเอที่มีสายพันธุ์ Nan 6.2 กับ *Streptomyces platensis* แสดงในตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 แสดงลักษณะทางสันฐานวิทยา และสรีรวิทยาของแยกดีเอ็นเอที่มีสายพันธุ์ Nan 6.2 เปรียบเทียบกับ *Streptomyces platensis*

| ลักษณะทางสันฐานวิทยาและสรีรวิทยา | สายพันธุ์แยกดีเอ็นเอที่มีสายพันธุ์ | |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| | Nan 6.2 | <i>Streptomyces platensis</i> |
| สีของสายใยอาหาร | ครีม, เหลือง | เหลือง, เทา |
| สีของสายใยอากาศ | ขาว | ขาว, เหลือง, เทา |
| รูปร่างสปอร์ | รูปวงรี | รูปวงรี (elliptical) |
| ลักษณะผิวสปอร์ | เป็นริ้วลายไม่เรียบ | ไม่เรียบ (ridge) |
| ลักษณะสายสปอร์ | เกลียว | เกลียว |
| การสร้างรงควัตถุเมลานิน | - | - |
| การสร้างรงควัตถุ | - | - |
| <u>การย่อยสลาย</u> | | |
| ไทโรซีน | + | + |
| แซนทีน | + | + |
| แป้ง | + | + |
| <u>การใช้แหล่งคาร์บอน</u> | | |
| L-อะราบิโนส | + | + |
| L-แรมโนส | + | - |
| D-ฟรุกโตส | + | + |
| D-กาแลคโตส | + | + |
| ซูโครส | + | + |
| ไซโลส | + | + |
| เดกซ์แทรน | + | + |

ตารางที่ 4.18 (ต่อ)

| ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา | สายพันธุ์เอกติโนมัยซีทีส | |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| | Nan 6.2 | <i>Streptomyces platensis</i> |
| D-แมนนิทอล | + | + |
| Na acetate | - | - |
| Na citrate | - | + |
| <u>ลักษณะบนอาหาร ISP</u> | | |
| ISP1 | สีขาว | สีขาว |
| ISP2 | สีครีม | สีเหลือง,เทาครีม |
| ISP3 | สีเทา | สีเทาขาว |
| ISP4 | สีขาว | สีเหลืองเทา |
| ISP5 | สีครีม | สีขาวเหลือง |
| ISP6 | สีขาว | สีขาว |

หมายเหตุ + : ผลทดสอบบวก - : ผลทดสอบลบ

ที่มา : United States Patent (DeBoer และคณะ, 1975)

ส่วนข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะต่าง ๆ ของ *Streptomyces olivogriseus* ยังมีรายงานออกมาน้อยมาก มีเพียงการอ้างอิงในสิทธิบัตรถึงความสามารถในการสร้างสาร SS-70A และ B แต่ไม่มีการตีพิมพ์รายงานออกมา และยังไม่เคยมีรายงานถึงความสามารถในการสร้างยับยั้งเซลล์มะเร็งออกมาอีกด้วย