



## รายงานฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

การค้นหาแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อก่อโรค  
ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

Discovery of endophytic actinobacteria producing antibiotic agents against  
pathogenic microorganisms causing diabetes mellitus patient's infection

นางสาวภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
(เงินอุดหนุนรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562  
มหาวิทยาลัยบูรพา

## รายงานฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

การค้นหาแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อก่อโรค  
ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

Discovery of endophytic actinobacteria producing antibiotic agents against  
pathogenic microorganisms causing diabetes mellitus patient's infection

นางสาวภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 46.2/2562

โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับเงินอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้

## บทคัดย่อ

แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 59 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae จัดอยู่ในสกุล *Actinomycetospora*, *Amycolatopsis*, *Marmoricola*, *Micromonospora*, *Nocardia* และ *Streptomyces* จากการวิเคราะห์ลำดับเบสและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA พบว่า มีแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลท ที่น่าจะเป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Nocardia* ได้แก่ ไอโซเลท R6R-6, R7R-8, R15R-2 และ R16R-3 การคัดกรองหาแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานพบว่า *Streptomyces* sp. R3R-6 ซึ่งแยกได้จากรากของมะกรูดเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 สารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. R3R-6 คือ actinomycin D สารมีประสิทธิภาพสูงในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกเทียบเท่ายาปฏิชีวนะ chloramphenicol ดังนั้นแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae จึงเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Streptomyces* sp. R3R-6 พบว่า ระยะเวลาและปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ คือ 7 วัน และร้อยละ 1 โดยปริมาตร ตามลำดับ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ น้ำตาลซูโครส (10 กรัมต่อลิตร) และสารสกัดมอลต์ (20 กรัมต่อลิตร)

## ABSTRACT

Fifty-nine isolates of endophytic actinobacteria isolated from *Rutaceae* plants were classified in genera *Actinomycetospora*, *Amycolatopsis*, *Marmoricola*, *Micromonospora*, *Nocardia*, and *Streptomyces*. Based on the 16S rRNA gene sequencing and evolutionary analysis, four actinobacterial isolates, R6R-6, R7R-8, R15R-2, and R16R-3, were promising new species in the genus *Nocardia*. Screening for endophytic actinobacteria producing antibiotic agents against pathogenic microorganisms causing diabetes mellitus patient's infection, it was found that *Streptomyces* sp. R3R-6, isolated from the *Citrus hystrix* root, was the most effective strain in antibiotic production against Gram-positive bacteria, including *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, and *S. aureus* ATCC 25923. The antibiotic produced by *Streptomyces* sp. R3R-6 is actinomycin D, which showed highly effective activity against Gram-positive bacteria equivalent to chloramphenicol. Therefore, endophytic actinobacteria from *Rutaceae* plants are a potential source of microorganisms to produce antibiotics against pathogenic microorganisms causing diabetes mellitus patient's infection. In addition, the study of the factors affecting the production of antibiotic from *Streptomyces* sp. R3R-6 revealed that the optimum time and the inoculum size for antibiotic production were seven days and 1% v/v, respectively. The optimum composition of the culture medium was sucrose (10 g/l) and malt extract (20 g/l).

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
<b>1. บทนำ (Introduction)</b>	<b>1</b>
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	3
<b>2. วิธีดำเนินการวิจัย (Material &amp; Method)</b>	<b>10</b>
2.1 อุปกรณ์และสารเคมี	10
2.2 การเตรียมตัวอย่างพืชวงศ์ Rutaceae และการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์	13
2.3 การระบุสกุลของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานเบื้องต้น	15
2.4 การคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน	15
2.5 การผลิตและการสกัดแยกสารต้านจุลินทรีย์จากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์	16
2.6 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก <i>Streptomyces</i> sp. R3R-6	17
<b>3. ผลการทดลองและอภิปรายผล (Results &amp; Discussion)</b>	<b>20</b>
3.1 การคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพืชวงศ์ Rutaceae	20
3.2 การระบุสกุลของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae	23
3.3 การคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน	44
3.4 การผลิตและการสกัดแยกสารต้านจุลินทรีย์จากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์	45
3.5 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก <i>Streptomyces</i> sp. R3R-6	47

## สารบัญ (ต่อ)

4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)	52
เอกสารอ้างอิง	53
ผลผลิต	59
รายงานการเงิน	60
ประวัตินักวิจัยและคณะ	62

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	ตัวอย่างแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่ที่มีการค้นพบในช่วงปี 2012 - 2017	7
1-2	ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารทุติยภูมิที่ผลิตจากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกจากรากพืชและแอกติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินบริเวณรากพืช (Matsumoto & Takahashi, 2017)	8
1-3	ตัวอย่างพืชวงศ์ส้มที่สามารถพบในประเทศไทย	9
2-1	ตัวอย่างพืช และชิ้นส่วนของพืชตัวอย่างที่ใช้สำหรับการทดลอง	14
2-2	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรต่างๆ ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน	18
2-3	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส	18
2-4	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์	19
2-5	สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC	19
3-1	แอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างชิ้นส่วนพืชวงศ์ Rutaceae	21
3-2	ลักษณะสัณฐานวิทยาของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากพืชวงศ์ Rutaceae เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 และการจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในระดับสกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA	26
3-3	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae	44
3-4	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ผลิตจากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ R3R-6	46



## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1-1	แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืช	6
2-1	ตัวอย่างต้นมะนาวและมะกรูดที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์	13
2-2	การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion	17
3-1	สกุลของแอกติโนแบคทีเรียไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae	24
3-2	กราฟแสดงความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากพืชวงศ์ Rutaceae	24
3-3	ลักษณะโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะนาว (R1) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	30
3-4	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะนาว (R2) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	30
3-5	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะกรูด (R3) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	31
3-6	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะกรูด (R4) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	32
3-7	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากโปรงฟ้า (R5) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	33
3-8	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากเขยตาย (R6) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	34
3-9	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะตูมไซ้ (R7) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	34
3-10	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากส้มจี๊ด (R8) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	36
3-11	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากส้มเข้ง (R10) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	36
3-12	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากส้มจี๊ด (R11) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	37

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3-13	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจาก ส้มเขียวหวาน (R12) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	37
3-14	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยก จากมะขวิด (R13) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	37
3-15	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยก จากส้มจุก (R14) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	38
3-16	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยก จากมะตูมไข่ (R15) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	39
3-17	ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยก จากมะนาว (R16) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน	40
3-18	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R6R-6 และ R7R-8 กับแอก ติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล <i>Nocardia</i>	42
3-19	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R15R-2 และ R16R-3 กับ แอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล <i>Nocardia</i>	43
3-20	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, <i>M. luteus</i> ATCC 9341 และ <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R3R-6	45
3-21	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทที่ผลิตจาก แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ <i>Streptomyces</i> sp. R3R-6	47
3-22	ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ชนิดของน้ำตาล ความเข้มข้นของน้ำตาล และสารสกัดมอลต์ และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตสาร actinomycin D จาก <i>Streptomyces</i> sp. R3R-6	50

# 1. บทนำ (Introduction)

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นโรคหนึ่งที่พบผู้ป่วยเป็นจำนวนมากในศตวรรษที่ 21 ซึ่งได้มีการคาดการณ์ว่าในปี 2025 จะมีผู้ป่วยโรคเบาหวานในโลกมากถึง 380 ล้านคน โดยโรคเบาหวานนั้นเป็นภาวะที่ร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ ซึ่งเกิดจากการขาดฮอร์โมนอินซูลิน หรือประสิทธิภาพของอินซูลินลดลง เนื่องจากภาวะดื้อต่ออินซูลิน ทำให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูง ซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยเบาหวานจำนวนมากมีภาวะของโรคแทรกซ้อนที่เกิดจากระดับน้ำตาลในเลือดผิดปกติ เช่น โรคหลอดเลือดสมองและหลอดเลือดหัวใจ ภาวะความดันโลหิตสูง และโรคหลอดเลือดส่วนปลายอุดตัน เป็นต้น นอกจากนี้ร่างกายของผู้ป่วยโรคเบาหวานจะมีอัตราการตอบสนองต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันลดลง ทำให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความไวต่อการติดเชื้อจุลชีพสูง ซึ่งการติดเชื้อในผู้ป่วยเบาหวานส่วนใหญ่นั้นเกิดจากเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ก่อโรค โดยบริเวณที่มักพบการติดเชื้อ ได้แก่ ผิวหนัง ตับ ปอดและระบบทางเดินปัสสาวะ เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ซึ่งจะพบบ่อยในแผลติดเชื้อเรื้อรังที่บริเวณเท้า (chronic leg ulcer) *Klebsiella pneumonia* ทำให้เกิดฝีที่ตับ (liver abscess) *Burkholderia pseudomallei* ทำให้เกิดโรคเมลิออยด์ *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.* และ *Candida albicans* ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ และ *Mycobacterium tuberculosis* ทำให้เกิดวัณโรค เป็นต้น (Casqueiro และคณะ, 2012; Gan, 2013) ปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานสามารถทำได้ด้วยการให้ยาปฏิชีวนะแก่ผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานในผู้ป่วยเบาหวาน ส่งผลให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยา ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญของระบบสาธารณสุขและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อดื้อยาที่จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์ยังคงเป็นแหล่งของยาปฏิชีวนะที่มีความสำคัญซึ่งถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรีย จากการรวบรวมข้อมูลงานวิจัยเกี่ยวกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์พบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ค้นพบทั้งหมดประมาณ 23,000 ชนิด ผลิตมาจากแอคติโนแบคทีเรีย จำนวน 10,000 ชนิด ซึ่งคิดเป็น 45% ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด (Berdy, 2012) แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และจากข้อมูลดังกล่าวทำให้แอคติโนแบคทีเรียยังคงได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลกในการค้นหาสารต้านจุลชีพหรือสาร

ปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำมาใช้ในการรักษาเชื้อดื้อยา อย่างไรก็ตามโอกาสที่จะค้นพบแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ นั้นเกิดขึ้นได้ยาก เนื่องจากแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่ก็มักจะเป็นสายพันธุ์เดิมๆ ซึ่งได้มีการค้นพบมาแล้ว ซึ่งส่งผลให้สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ก็จะเป็นสารชนิดเดิมๆ เช่นเดียวกัน ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่จะแก้ปัญหาดังกล่าวก็คือการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน หรือคัดแยกจากแหล่งที่แตกต่างกัน และข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียจากแหล่งใหม่ ๆ ที่แตกต่างกันเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการค้นพบแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่น่าไปสู่การค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่

ในปัจจุบันนักวิจัยได้ให้ความสนใจในการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญและอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคหรือผลกระทบในแง่ลบแก่พืช ซึ่งเรียกว่า แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (endophytic actinobacteria) เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากได้มีรายงานค้นพบแอกติโนแบคทีเรียทั้งในสกุลและสายพันธุ์ใหม่เป็นจำนวนมาก ได้แก่ *Allonocardiosis* ซึ่งคัดแยกได้จากพืชสมุนไพรราก *Actinophytocola* คัดแยกได้ต้นข้าวเหนียวของไทย และ *Plantactinospora* ซึ่งแยกได้จากรากของพืชสมุนไพรราก เป็นต้น (Matsumoto และ Takahashi, 2017) เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางธรรมชาติและมีความอุดมสมบูรณ์ของพืชพรรณไม้นานาชนิด ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียจากพืชสมุนไพรรวมวงศ์ Rutaceae ซึ่งพืชวงศ์นี้มีหลายชนิดและยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในพืชดังกล่าวมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถค้นพบแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาอาการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพืชวงศ์ Rutaceae ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

1.2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

1.2.3 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

### 1.3 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การคัดแยกแอสโคสปอร์ที่เรียเอนโดไฟท์จากพืชวงศ์ Rutaceae ซึ่งไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จะนำไปสู่การค้นพบแอสโคสปอร์ที่เรียสายพันธุ์ใหม่ หรือสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการผลิตเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางการแพทย์ เภสัชกรรม และการเกษตรต่อไป

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของแอสโคสปอร์ที่เรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้พืชวงศ์ Rutaceae ซึ่งเป็นองค์ความรู้พื้นฐานทางด้านจุลชีววิทยาที่สามารถนำไปต่อยอดในงานวิจัยด้านต่างๆ ทั้งด้านการแพทย์ เภสัชกรรมกรรม และการเกษตรได้

1.4.2 ได้แอสโคสปอร์ที่เรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่ หรือสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะต้านเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

1.4.3 ได้สารปฏิชีวนะหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาภาวะติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และโรคต่างๆ

1.4.4 สร้างโอกาสให้แก่บัณฑิตช่วยงานที่ศึกษาในระดับปริญญาตรีได้ฝึกฝนทักษะและกระบวนการคิดในการทำงานวิจัย เพื่อให้บัณฑิตเกิดกระบวนการเรียนรู้ตลอดชีวิต

### 1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

#### 1.5.1 โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus)

โรคเบาหวานเป็นภาวะที่ร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ ซึ่งเกิดจากการขาดฮอร์โมนอินซูลิน หรือประสิทธิภาพของอินซูลินลดลง เนื่องจากภาวะดื้อต่ออินซูลินทำให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดสูง โรคนี้นับเป็นหนึ่งในโรคที่พบผู้ป่วยเป็นจำนวนมากในศตวรรษที่ 21 โดยคาดการณ์ว่าในปี 2025 จะมีผู้ป่วยโรคเบาหวานในโลกมากถึง 380 ล้านคน จากข้อมูลของสำนักโรคไม่ติดต่อกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้แบ่งชนิดของโรคเบาหวานตามสาเหตุของการเกิดโรคออกเป็น 4 ประเภท คือ เบาหวานชนิดที่ 1 เบาหวานชนิดที่ 2 เบาหวานขณะตั้งครรภ์ และเบาหวานชนิดอื่นๆ โรคเบาหวานชนิดที่ 1 เกิดจากขาดอินซูลินโดยสิ้นเชิง คือตับอ่อนไม่สามารถสร้างอินซูลินได้ ต้องรักษาด้วยการฉีดอินซูลินเข้าไปทดแทน มักเกิดในคนอายุน้อยและผอม เบาหวานชนิดนี้พบน้อย โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เกิดจากขาดอินซูลินบางส่วนหรืออินซูลินทำหน้าที่บกพร่อง (ดื้อต่อฤทธิ์อินซูลิน) มักเกิดในผู้ใหญ่และผู้มีน้ำหนักเกินหรืออ้วน ปัจจุบันพบมากในเด็กที่มีน้ำหนักเกิน การรักษาเบาหวานชนิดนี้ อาจเริ่มด้วยการควบคุมอาหาร ออกกำลังกาย และให้ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิด

รับประทาน ส่วนโรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ เป็นเบาหวานที่ตรวจพบครั้งแรกในหญิงตั้งครรภ์ และโรคเบาหวานชนิดอื่นๆ นั้น เป็นเบาหวานที่เกิดจากการใช้ยาบางชนิด หรือเกิดจากตับอักเสบ หรือเกิดจากการติดเชื้อไวรัสบางชนิด โรคเบาหวานที่พบมากที่สุดในประเทศไทยคือ โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคเบาหวาน ได้แก่ กรรมพันธุ์ (family history of diabetes) น้ำหนักเกิน (overweight) กินอาหารไม่มีดีต่อสุขภาพ (unhealthy diet) และขาดการเคลื่อนไหวและออกกำลังกาย (physical inactivity)

ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงอย่างต่อเนื่อง มักเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหรือโรคแทรกซ้อนต่างๆ เช่น ภาวะความดันโลหิตสูง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบที่ทำให้เกิดอาการกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดสมองที่ทำให้เกิดอัมพฤกษ์และอัมพาต โรคแทรกซ้อนทางตาที่ทำให้จอประสาทตาเสื่อม ตามัว ต้อกระจก และต้อหิน โรคเบาหวานลงไตที่ทำให้ไตเสื่อม และโรคแทรกซ้อนทางระบบประสาทที่ส่งผลให้มีอาการชาที่เท้า และเกิดแผลได้โดยไม่รู้ตัว นอกจากนี้โรคเบาหวานยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการลดลงของอัตราการตอบสนองต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความไวต่อการติดเชื้อก่อโรค ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้ป่วยเบาหวานมีโอกาสดูติดเชื้อได้ง่าย การติดเชื้อที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ได้แก่ การติดเชื้อในปอด (วัณโรคปอด) การติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ และการติดเชื้อที่ผิวหนัง โดยเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้นมีทั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งจะพบบ่อยในแผลติดเชื้อเรื้อรังที่บริเวณเท้า (chronic leg ulcer) เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ทำให้เกิดฝีที่ตับ (liver abscess) เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ทำให้เกิดโรคเมลิออยด์ เชื้อ *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.* และ *Candida albicans* ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ และเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ทำให้เกิดวัณโรค เป็นต้น (Casqueiro และคณะ, 2012; Gan, 2013) ปัจจุบันการรักษาโรคติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้นสามารถทำได้ด้วยการให้ยาปฏิชีวนะ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานส่งผลให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยาในผู้ป่วย ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของระบบสาธารณสุขและเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้ในการรักษาเชื้อดื้อยาที่จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในอนาคต

### 1.5.2 แอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (endophytic actinobacteria)

แอคติโนแบคทีเรีย (actinobacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) เป็นองค์ประกอบในจีโนมมากกว่า 50 mol% แอคติโนแบคทีเรียจัดอยู่ในไฟลัม *Actinobacteria* ซึ่งเป็นไฟลัมที่มีจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่พบมากที่สุดโดเมน *Bacteria* (Ludwig & Klenk, 2005) บางกลุ่มมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือ สามารถสร้างเส้นใย (hyphae) ได้ แต่เส้นใยจะมีขนาดเล็กกว่าเชื้อรา แอคติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถ

สร้างเส้นใยได้ทั้งเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) และเส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และบางสายพันธุ์อาจมีรูปร่างแบบกลม (coccus) หรือแบบท่อน (rod) การสืบพันธุ์ของแอกติโนแบคทีเรียเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ แอกติโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการดำรงชีพอย่างอิสระ และมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น ซากพืช ซากสัตว์ สาหร่าย และเชื้อราที่ตายในระบบนิเวศ แล้วทำให้เกิดการสะสมสารอินทรีย์ในดินที่ส่งผลให้เกิดการหมุนเวียนนำสารอาหารประเภทสารอินทรีย์กลับมาใช้ในระบบนิเวศอย่างต่อเนื่อง แอกติโนแบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในระบบนิเวศที่เป็นแหล่งน้ำ (น้ำจืด และน้ำทะเล) และพื้นดิน ซึ่งส่วนใหญ่จะพบมากในดิน นอกจากนี้แอกติโนแบคทีเรียสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิดทั้งยาปฏิชีวนะ สารต้านเชื้อรา สารต้านไวรัส สารต้านมะเร็ง และสารต้านปรสิต เป็นต้น ดังนั้นในปัจจุบันแอกติโนแบคทีเรียจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เกษษกรรม อุตสาหกรรม และการเกษตร (Anandan และคณะ, 2016; Barka และคณะ, 2016; Goodfellow และ Williams, 1983; Sharma, 2014)

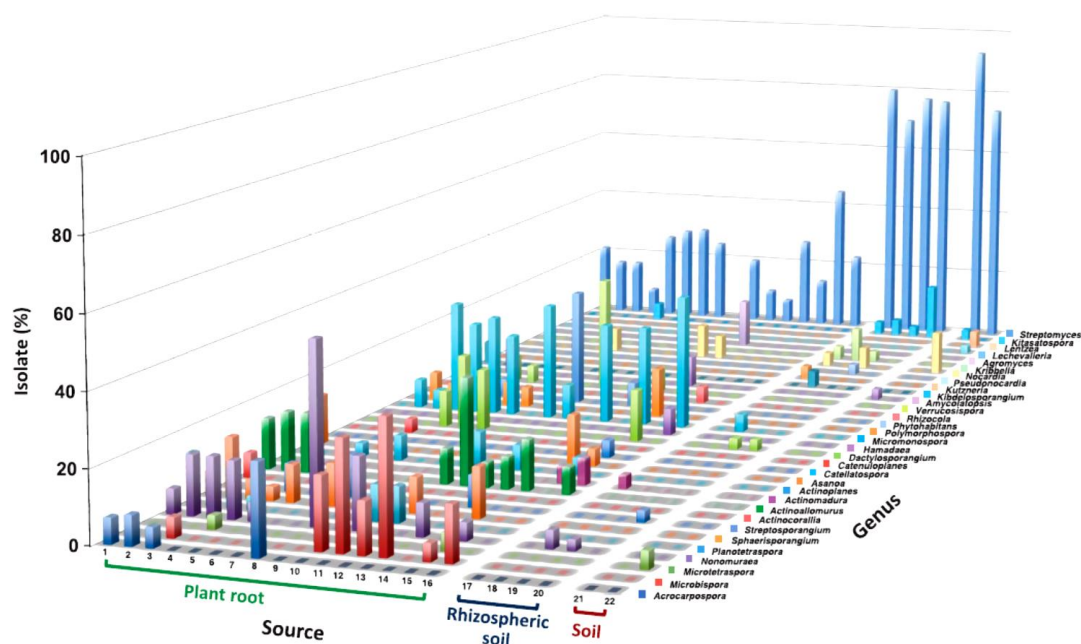
คำว่า เอนโดไฟท์ (endophyte) หมายถึง จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของพืช แต่ไม่ก่อให้เกิดโรคหรือผลในแง่ลบแก่พืชที่จุลินทรีย์ดังกล่าวได้อาศัยอยู่ รูปแบบในการดำรงชีวิตระหว่างเอนโดไฟท์และพืชเป็นความสัมพันธ์แบบการอยู่ร่วมกัน (symbiotic relationship) แบบภาวะพึ่งพา (mutualism) โดยพืชจะทำหน้าที่ปกป้องและให้อาหารแก่เอนโดไฟท์ ในขณะที่เดียวกัน เอนโดไฟท์ก็จะสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการป้องกันพืชจากสัตว์กินพืชและเชื้อก่อโรคพืช และสร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย (Gunatilaka, 2006; Haridoim และคณะ, 2015) ดังนั้น แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (endophytic actinobacteria) ก็คือ แอกติโนแบคทีเรียที่เจริญและอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช โดยไม่ก่อให้เกิดโรคและผลในแง่ลบแก่พืช

Janso และ Carter (2010) ได้คัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช (ใบ ราก และลำต้น) จำนวน 253 ตัวอย่าง จากพืชทั้งหมด 113 ชนิด พบว่าสามารถคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 123 สายพันธุ์ และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA บริเวณ 16S RNA gene ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้งหมดเพื่อจัดจำแนกชนิด พบว่าเป็นแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในแฟมิลี *Streptosporangiaceae* (40%), *Streptomycetaceae* (27%), *Thermomonosporaceae* (16%), *Micromonosporaceae* (8%), *Pseudonocardiaceae* (8%) และ *Actinosynnemataceae* (2%) และจากการรวบรวมข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในสกุล *Streptomyces* มีเพียง 26% ส่วนที่เหลืออีก 74% เป็นแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์หายาก (rare actinobacteria หรือ non-*Streptomyces*) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็น

ว่า ถ้าต้องการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์หายากควรคัดแยกจากพืช (Qin และคณะ, 2009; Zhao และคณะ 2011; Li และคณะ, 2012)

โดยปกติแอกติโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้จะอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งจากข้อมูลใน List of prokaryotic names with standing in nomenclature พบว่าในปัจจุบันมีแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* มากกว่า 800 สปีชีส์ (<http://www.bacterio.net/streptomyces.html>) ส่งผลให้แอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ก็จะเป็น *Streptomyces* สายพันธุ์เดิม ๆ และสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Streptomyces* ก็จะเป็นสารปฏิชีวนะชนิดเดิม ๆ ที่ได้มีการค้นพบมาแล้ว ดังนั้นแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญในการค้นหาแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ หรือสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่

งานวิจัยของ Matsumoto & Takahashi (2017) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายของสายพันธุ์แอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากรากพืช ดินบริเวณรากพืช และดินทั่วไป พบว่าแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากรากพืชมีความหลากหลายของสายพันธุ์แอกติโนแบคทีเรียในสกุลต่างๆ มากกว่าที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืช และดินทั่วไป (ภาพที่ 1-1) ซึ่งสายพันธุ์แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในสกุล *Streptomyces* ที่คัดแยกได้จากรากพืชมีเพียง 23% ในขณะที่มีสายพันธุ์แอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืชและดินทั่วไปมากถึง 84% จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่ารากพืชเป็นแหล่งของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์หายากที่มีประสิทธิภาพมากสำหรับใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่



ภาพที่ 1-1 แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืช



จากการศึกษาข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า มีการค้นพบแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สกุลใหม่และสายพันธุ์ใหม่จำนวนมาก เช่น *Nonomuraea syzygii*, *Phytohabitans kaempferiae*, *Sphaerisorangium rufum* และสายพันธุ์อื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 ตัวอย่างแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่ที่มีการค้นพบในช่วงปี 2012 - 2017

Actinobacteria species	Plant host	Plant family	Reference
<i>Actinomadura syzygii</i>	<i>Syzygium cumini</i>	Myrtaceae	Rachniyom et al., 2015 <sup>a</sup>
<i>Asanoa endophytica</i>	<i>Boesenbergia rotunda</i>	Zingiberaceae	Niemhom et al., 2016 <sup>a</sup>
<i>Glycomyces artemisiae</i>	<i>Artemisia argyi</i>	Asteraceae	Zhang et al., 2014
<i>Micromonospora parathelypteridis</i>	<i>Parathelypteris beddomei</i>	Thelypteridaceae	Zhao et al., 2017
<i>Nonomuraea syzygii</i>	<i>Syzygium cumini</i>	Myrtaceae	Rachniyom et al., 2015 <sup>b</sup>
<i>Phytohabitans kaempferiae</i>	<i>Kaempferia larsenii</i>	Zingiberaceae	Niemhom et al., 2016 <sup>b</sup>
<i>Plantactinospora soyae</i>	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Gao et al., 2016
<i>Pseudonocardia antimicrobica</i>	<i>Artemisia annua</i>	Asteraceae	Zhao et al., 2012
<i>Sphaerisorangium rufum</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	Mingma et al., 2014
<i>Streptomyces oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	Mingma et al., 2015

### 1.5.3 สารปฏิชีวนะจากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (endophytic actinobacteria)

เนื่องจากปัจจุบันมีปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ส่งผลให้ต้องมีการค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพอยู่ตลอดเวลาเพื่อนำมาใช้ในการรักษาเชื้อดื้อยา ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่ว่ายาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางการแพทย์ส่วนใหญ่ผลิตมาจากแอกติโนแบคทีเรีย ดังนั้นจึงส่งผลให้นักวิจัยพยายามที่จะค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแอกติโนแบคทีเรีย

Matsumoto และ Takahashi (2017) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายของสายพันธุ์แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกจากรากพืชกับแอกติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินบริเวณรากพืชในการผลิตสารปฏิชีวนะ ผลการทดลองพบว่า สายพันธุ์แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะมีความหลากหลายมากกว่าแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากดินบริเวณรากพืช (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์น่าจะเป็นแหล่งหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 1-2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารทุติยภูมิที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกจากรากพืชและแอคติโนแบคทีเรียที่แยกจากดินบริเวณรากพืช (Matsumoto & Takahashi, 2017)

Genus	Plant			Rhizospheric soil		
	Test no.	Positive no.	Ration (%)	Test no.	Positive no.	Ration (%)
<i>Acrocarpospora</i>	25	1	4	0	0	–
<i>Microbispora</i>	5	1	20	0	0	–
<i>Nonomuraea</i>	25	7	28	2	1	50
<i>Planotetraspora</i>	38	1	3	0	0	–
<i>Sphaerisporangium</i>	30	15	50	0	0	–
<i>Streptosporangium</i>	8	0	0	0	0	–
<i>Actinoallomurus</i>	24	4	17	0	0	–
<i>Asanoa</i>	5	0	0	0	0	–
<i>Dactylosporangium</i>	19	1	5	2	0	0
<i>Micromonospora</i>	48	12	2	1	0	0
<i>Polymorphospora</i>	20	1	5	0	0	–
<i>Verrucosispora</i>	11	2	18	0	0	–
<i>Nocardia</i>	1	0	0	3	1	33
<i>Kribbella</i>	0	0	–	4	0	0
<i>Kitasatospora</i>	1	0	0	10	4	40
<i>Streptomyces</i>	43	10	23	110	45	41
Others	30	1	3	5	1	20
Total	333	56	17	137	52	38

Antimicrobial activities against at least one of six tested microorganisms; *Bacillus subtilis* KB-211, *Kocuria rhizophila* KB-212, *Escherichia coli* KB-213, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* KB-88, *Candida albicans* KF-1 and *Mucor racemosus* KF-223.

#### 1.5.4 พืชสมุนวงศ์ Rutaceae

เป็นที่ทราบกันดีอยู่ว่าพืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากที่นำมาใช้ในการรักษาโรคหรือเป็นองค์ประกอบในตำรับยาต่างๆ และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า แอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชสมุนไพรก็สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นเดียวกับพืชสมุนไพรชนิดนั้น เช่น *Kitasatospora* sp. ที่คัดแยกได้จากพืชสมุนไพร *Taxus baccata* มีความสามารถในการผลิตสาร paclitaxel ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนกับที่แยกได้ต้น *Taxus baccata* (Caruso และคณะ, 2000) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีส่วนร่วมในวิวัฒนาการของพืชในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืช หรือแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับพืชสมุน ดังนั้นการมีปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวระหว่างแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์กับพืชสมุนไพรจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง (Mitchell และคณะ, 2015; Golinska และคณะ, 2015)

พืชวงศ์ Rutaceae เป็นของพืชใบเลี้ยงคู่ในที่จะอยู่ในอันดับ Sapindales หรือ Rutales มีสมาชิกของพืชในกลุ่มนี้ทั่วโลกประมาณ 155 สกุล 1600 สายพันธุ์ ซึ่งมักจะพบอยู่ในเขตร้อนหรือเขตกึ่งร้อน พืชวงศ์นี้มีตั้งแต่ไม้พุ่ม ไม้ล้มลุก จนถึงไม้ต้นขนาดเล็ก พืชในกลุ่มนี้สามารถผลิตน้ำมันหอม

ระเหยที่มีกลิ่นหอมจากต่อมใบ พืชในกลุ่มนี้หลายชนิดมีความสำคัญในการขับเคลื่อนทางเศรษฐกิจ เช่น สกุล *Citrus* ซึ่งเป็นสกุลของส้มชนิดต่างๆ และ มะนาว สกุล *Pilocarpus* เป็นแหล่งของสารอัลคาลอยดีในกลุ่ม pilocarpine ที่ใช้เป็นยารักษาโรคต้อหิน และอาการปากแห้งของผู้ป่วยมะเร็ง เป็นต้น นอกจากนี้ในบางสกุลยังสามารถใช้ในการผลิตน้ำหอมอีกด้วย (Chase และคณะ, 1999) ประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนและมีการกระจายของพืชวงศ์ *Rutaceae* หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งส่วนใหญ่ที่พบจะมีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ได้ นอกจากนี้ยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในพืชดังกล่าวมาก่อน ดังนั้นพืชสมุนไพรวงศ์ *Rutaceae* น่าจะเป็นแหล่งของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ในอนาคต

ตารางที่ 1-3 ตัวอย่างพืชวงศ์ส้มที่สามารถพบในประเทศไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ
<i>Acronychia pedunculata</i> (L.) Miq.	กะอวม
<i>Aegl marmelos</i> (Linn.) Corr.	มะตูม
<i>Casimiroa edulis</i>	ละมุดขาว
<i>Citrus aurantifolia</i>	มะนาว
<i>Citrus hystrix</i>	มะกรูด
<i>Citrus medica</i> L. var. <i>sarcodactylis</i> (Hoola van Nooten) Swingle	ส้มโอมือ
<i>Citrus medica</i> Linn. var. <i>sarcodactylis</i> Swing.	ส้มมือ
<i>Clausena excavate</i> Burm.f.	สมัดใหญ่
<i>Clausena lansium</i> (Lour.) Skeels	มะไฟจีน
<i>Feroniella lucida</i> (Scheff.) Swingle	มะสัง
<i>Feronia limonia</i>	มะขวิด
<i>Glycosmis pentaphylla</i> (Retz.) DC.	เขยตาย
<i>Micromelum minutum</i> (G. Forst.) Wight & Arn.	หัสคุณ
<i>Murraya paniculata</i> (Linn.) Jack	แก้ว
<i>Toddalia asiatica</i> (L.) Lam.	เครื่องห้า
<i>Zanthoxylum rhetsa</i> (Roxb.) DC.	มะแขว่น

## 2. วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)

### 2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

#### 2.1.1 เครื่องมือ

- 1) Autoclave
- 2) Hot air oven
- 3) Incubating shaker
- 4) Laminar flow
- 5) pH meter
- 6) Vortex mixer

#### 2.1.2 อุปกรณ์

- 1) Autopipette
- 2) Beaker
- 3) Basket
- 4) Cylinder
- 5) Dropper
- 6) pH meter
- 7) Glass funnel
- 8) Glass rod
- 9) Laboratory bottle
- 10) Label
- 11) Loop
- 12) Microtube
- 13) Needle
- 14) Parafilm
- 15) Pestle and Mortar
- 16) Plastic bag
- 17) Screw cap tube
- 18) Spoon
- 19) Spreader

- 20) Test tube
- 21) Test tube rack
- 22) Autopipette Beaker
- 23) Basket
- 24) Cylinder
- 25) Dropper
- 26) pH meter
- 27) Glass funnel
- 28) Glass rod
- 29) Laboratory bottle
- 30) Loop
- 31) Micro tube
- 32) Needle
- 33) Parafilm
- 34) Pestle and Mortar
- 35) Plastic bag
- 36) Screw cap tube
- 37) Spoon
- 38) Spreader
- 39) Test tube
- 40) Test tube rack

### 2.1.3 สารเคมี

- 1) Acetonitrile
- 2) Agarose
- 3) Calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ )
- 4) Casein
- 5) Cycloheximide
- 6) Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 7) Dipotassium phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- 8) Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 9) Distilled water

- 10) DNTP
- 11) Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)
- 12) Ethyl acetate
- 13) Ferrous sulfate heptahydrate (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)
- 14) Glucose
- 15) Hexane
- 16) Humic acid
- 17) Malt extract
- 18) Magnesium sulphate heptahydrate (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)
- 19) Nalidixic acid
- 20) L-Poline
- 21) Potassium chloride (KCl)
- 22) Potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- 23) Potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>)
- 24) Sodium chloride (NaCl)
- 25) Sodium hydroxide (NaOH)
- 26) *Taq* DNA polymerase
- 27) Universal primer
- 28) Yeast extract

#### 2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) Humic vitamin agar (HV)
- 2) Inorganic salts starch agar (ISP4),
- 3) Mueller Hinton agar (MHA)
- 4) Starch casein nitrate agar (SCN)
- 5) Yeast extract-malt extract agar (ISP2 agar)
- 6) Yeast extract-malt extract broth (ISP2 broth)
- 7) Yeast mold agar (YM)
- 8) Tap water yeast extract agar (TWYE)
- 9) Water proline agar (WP)

### 2.1.5 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

- 1) *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- 2) *Candida albicans* ATCC 10231
- 3) *Escherichia coli* ATCC 25922
- 4) *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- 5) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- 6) *Staphylococcus aureus* ATCC25923

## 2.2 การเตรียมตัวอย่างพืชวงศ์ Rutaceae และการตัดแยกแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์

การตัดแยกแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทำการทดลองโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Inahashi และคณะ (2010) นำตัวอย่างพืชวงศ์ Rutaceae จำนวน 16 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มะนาว (R1, R2 และ R16) มะกรูด (R3 และ R4) โปรงฟ้า (R5) เขยตาย (R6) มะตูมไข่ (R7 และ R15) ส้มจี๊ด (R8 และ R11) มะสัง (R9) ส้มเซ้ง (R10) ส้มเขียวหวาน (R12) มะขวิด (R13) และส้มจุก (R14) ล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด เพื่อกำจัดเศษฝุ่นและตะกอนดินออกจากตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาแยกเป็นส่วนของราก ลำต้น และใบ (ภาพที่ 2-1 และตารางที่ 3) จะได้ตัวอย่างทั้งหมด 64 ตัวอย่าง สำหรับนำมาใช้ในการแยกแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์



ภาพที่ 2-1 ตัวอย่างต้นมะนาวและมะกรูดที่ใช้ในการตัดแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์

นำชิ้นส่วนตัวอย่างพืชทั้งหมด 64 ตัวอย่าง ๆ ละ 1 กรัม มาพอกฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อยู่บริเวณผิวก่อนการตัดแยกแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ โดยการแช่ชิ้นส่วนตัวอย่างพืชในเอทานอล (70% v/v) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ต่อใน sodium hypochlorite (1% v/v) ที่มี Tween 80 (0.1% v/v) ผสมอยู่ โดยส่วนรากจะแช่เป็นเวลา 15 นาที ส่วนลำต้นและใบแช่เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 1 นาที (น้ำ

กลั่นที่ผ่านการล้างตัวอย่างครั้งสุดท้ายจะนำไปเป็นชุดควบคุมสำหรับการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์) และนำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อไปตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเติม extraction buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างพืชบดละเอียด และทำการเจือจางแบบ serial dilution จากนั้นนำตัวอย่างที่เจือจางที่ความเข้มข้น  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  และตัวอย่างน้ำกลั่นที่ผ่านจากการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชทั้ง 64 ตัวอย่าง (ชุดควบคุม) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารจำเพาะ (selective media) ซึ่งประกอบด้วย cellobiose asparagine agar (CA), humic acid-vitamin agar (HV), starch casein nitrate agar (SCN) และ water proline agar (WP) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ cycloheximide (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และ nalidixic acid (25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ จากนั้นนำจานอาหารคัดแยกเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14-30 วัน จากนั้นนำแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการ streak บนอาหารแข็ง ISP2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน นำแอกติโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปเลี้ยงต่อในอาหารวุ้นแข็ง ISP2 เพื่อใช้เป็น stock culture สำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2-1 ตัวอย่างพืช และชิ้นส่วนของพืชตัวอย่างที่ใช้สำหรับการทดลอง

ตัวอย่างพืช	ชิ้นส่วนตัวอย่างพืชที่ใช้		
	ราก (root)	ลำต้น (stem)	ใบ (leaf)
มะนาว (R1)	R1R	R1S	R1L
มะนาว (R2)	R2R	R2S	R2L
มะกรูด (R3)	R3R	R3S	R3L
มะกรูด (R4)	R4R	R4S	R4L
โปรงฟ้า (R5)	R5R	R5S	R5L
เขยตาย (R6)	R6R	R6S	R6L
มะตูมไข่ (R7)	R7R	R7S	R7L
ส้มจี๊ด (R8)	R8R	R8S	R8L
มะสัง (R9)	R9R	R9S	R9L
ส้มเซ้ง (R10)	R10R	R10S	R10L
ส้มจี๊ด (R11)	R11R	R11S	R11L
ส้มเขียวหวาน (R12)	R12R	R12S	R12L
มะขวิด (R13)	R13R	R13S	R13L
ส้มจุก (R14)	R14R	R14S	R14L
มะตูมไข่ (R15)	R15R	R15S	R15L
มะนาว (R16)	R16R	R16S	R16L



## 2.3 การระบุสกุลของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานเบื้องต้น

การจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในระดับสกุลโดยการการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยการเพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์บนอาหารแข็ง ISP2 โดยวิธี streak plate method และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 14 วัน หลังจากเชื้อเจริญบนอาหารแข็งนำไปศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง โดยการบันทึกสีของโคโลนีด้านบนอาหาร (upper colony) และด้านล่างอาหาร (reversed colony) และการผลิตสีรงควัตถุ (soluble pigment) ในอาหาร เทียบกับแผ่นสีมาตรฐาน (The NBS/IBCC color System) รวมถึงศึกษาลักษณะของเส้นใยอากาศภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA โดยเพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว ISP2 เป็นเวลานาน 3-5 วัน จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์แล้วนำมาสกัด DNA โดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) หลังจากนั้นนำ DNA ที่เตรียมได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Thermal cycler ตามวิธีการของ Suriyachadkun และคณะ (2009) เพื่อเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ 16S rRNA โดยใช้ universal primers คือ 27F และ 1392R นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบ โดยวิธี gel electrophoresis เพื่อดูแถบของยีน 16S rRNA จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี และนำข้อมูลลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่วิเคราะห์ได้ของแต่ละไอโซเลทเทียบกับลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA ที่มีในฐานข้อมูลออนไลน์ EzBiocloud (<http://www.ezbiocloud.net>; Yoon และคณะ, 2017) เพื่อระบุสกุลของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้

นอกจากนี้มีการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA (16S rRNA gene phylogenetic tree) สำหรับเชื้อที่คาดว่าจะจะเป็นแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ซึ่งมีร้อยละความเหมือนของยีน 16S rRNA เทียบกับเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง (type strains) ต่ำกว่า 99 โดยการสร้าง phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ด้วยซอฟต์แวร์ MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016)

## 2.4 การคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

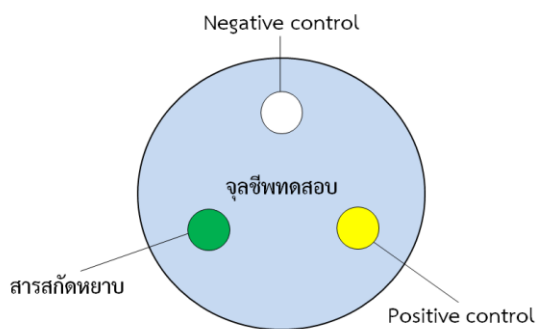
นำแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้หมด 59 ไอโซเลท เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยบนเครื่อง rotary shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 9 วัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion โดย

เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ประกอบด้วย *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทำได้โดยนำเชื้อทดสอบเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MHA และ YM สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (สำหรับแบคทีเรีย) และ 30 องศาเซลเซียส (สำหรับยีสต์) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อทดสอบที่เตรียมได้มาละลายในน้ำเกลือและปรับให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.5 และ 2.0 McFarland สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ และนำมาเกลี่ยบนอาหาร MHA (สำหรับแบคทีเรีย) และ YM (สำหรับยีสต์) โดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (sterilized cotton swab) จากนั้นใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรเจาะอาหารบนแข็ง MHA และ YM ที่ได้เกลี่ยเชื้อไว้ให้เป็นหลุม แล้วหยดอาหารเลี้ยงเชื้อของสารทุติยภูมิปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในหลุมโดยใช้ยาปฏิชีวนะ chloramphenicol และ amphotericin B เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) และอาหารเหลว ISP2 เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

## 2.5 การผลิตและการสกัดแยกสารต้านจุลินทรีย์จากแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์

เพาะเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-5 วัน สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร (5% v/v) ลงในอาหารเหลว ISP2 ใหม่ ปริมาตรรวม 1 ลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซิเตท (EtOAc) แยกส่วนของสารละลายชั้นน้ำเลี้ยงเชื้อ (W) และสารละลายชั้น EtOAc ออกจากกัน ทำการสกัดซ้ำ 3 รอบนำสารละลายชั้น EtOAc และชั้น W ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะได้เป็นสารสกัดหยาบชั้น EtOAc (EtOAc-crude extract) และชั้นน้ำ (water-crude extract) จากนั้นทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโดยวิธี agar disc diffusion โดยเชื้อทดสอบที่ใช้ประกอบด้วย *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus* ATCC 9341, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 การเตรียมเชื้อทดสอบทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.4 การเตรียมตัวอย่างสกัดทำได้โดยนำสารสกัดหยาบชั้น EtOAc และชั้นน้ำไปเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยสารละลาย DMSO (10% โดยปริมาตร) แล้วหยดลงบนแผ่นแผ่นดิสก์ (disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำแผ่นดิสก์มาวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ โดยใช้ยาปฏิชีวนะ chloramphenicol (C30)

และ amphotericin B (AB20) เป็นชุดควบคุมเชิงบวก และสารละลาย DMSO (10% โดยปริมาตร) เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (ภาพที่ 2-2)จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (สำหรับยีสต์) และ 37 องศาเซลเซียส (สำหรับแบคทีเรีย) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง



รูปที่ 2-2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion

## 2.6 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Streptomyces* sp. R3R-6

### 2.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. R3R-6

เพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. R3R-6 ในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน นำหัวเชื้อที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 2.6.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

นำหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. R3R-6 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (2% โดยปริมาตร) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 13 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 และนำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC

### 2.6.3 ชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

นำหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. R3R-6 ร้อยละ 2 โดยปริมาตร (4 มิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 3 สูตร ที่มีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส น้ำตาลทรายและกากน้ำตาล ดังตารางที่ 3-1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 7 วัน

แล้วสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 และนำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC

**ตารางที่ 2-2** องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรต่างๆ ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

องค์ประกอบ	สูตรที่ 1 (ISP2)	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
Yeast extract (g/L)	4	4	4
Glucose (g/L)	4	-	-
Sucrose (g/L)	-	4	-
Molasses (g/L)	-	-	4
Malt extract (g/L)	10	10	10
pH	7.2	7.2	7.2

#### 2.6.4 ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

นำหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. R3R-6 ร้อยละ 2 โดยปริมาตร (4 มิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 5 สูตร ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลทราย ดังตารางที่ 3-2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 7 วัน แล้วสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 และนำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC

**ตารางที่ 2-3** องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส

องค์ประกอบ	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5
Yeast extract (g/L)	4	4	4	4	4
Sucrose (g/L)	0	4	10	20	50
Malt extract (g/L)	10	10	10	10	10

#### 2.6.5 ความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

นำหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. R3R-6 ร้อยละ 2 โดยปริมาตร (4 มิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 6 สูตรที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ ดังตารางที่ 3-3 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150

รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 7 วัน แล้วสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 และนำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC

**ตารางที่ 2-4** องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในสูตรต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์

องค์ประกอบ	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6
Yeast extract (g/L)	4	4	4	4	4	4
Sucrose (g/L)	4	4	4	4	4	4
Malt extract (g/L)	5	7.5	10	12.5	15	20

### 2.6.6 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

นำหัวเชื้อ *Streptomyces* sp. R3R-6 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยปริมาตรเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของสารสกัดยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 4 กรัมต่อลิตร และสารสกัดมอลต์ 10 กรัมต่อลิตร (pH≈7.2) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 7 วัน แล้วสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 และนำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC

### 2.6.7 การวิเคราะห์ปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC

นำสารตัวอย่างที่สกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที และสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC (ตารางที่ 3-4) คำนวณหาปริมาณสาร actinomycin D ในสารตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร actinomycin D

**ตารางที่ 2-5** สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC

Parameter	Condition
HPLC	Agilent 1260 infinity II
Column	C18 (150 mm*4.6 mm 5 um)
Mobile phase	Isocratic (Acetonitrile : Water, 65 : 35)
Injection volume	10 uL
Detector/ Runtime	DAD $\lambda$ =436 nm/ 15 min

### 3. ผลการทดลองและอภิปรายผล (Results & Discussion)

#### 3.1 การคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากพืชวงศ์ Rutaceae

จากการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างพืชวงศ์ Rutaceae จำนวน 16 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2-1) ด้วยวิธี spread plate technique ลงบนอาหารคัดเลือกทั้ง 5 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย humic acid vitamin agar (HV), inorganic salts starch agar (ISP4), starch casein nitrate agar (SCN), tap water yeast extract medium (TWYE) และ water proline agar (WP) ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 59 ไอโซเลท ประกอบด้วย แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะนาว (R1) มีจำนวน 1 ไอโซเลท (R1S-3) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะนาว (R2) มีจำนวน 7 ไอโซเลท (R2R-1, R2R-2, R2R-3, R2R-4, R2R-5, R2R-6 และ R2R-7) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะกรูด (R3) มีจำนวน 5 ไอโซเลท (R3L-1, R3R-1, R3R-4, R3R-5 และ R3R-6) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะกรูด (R4) มีจำนวน 3 ไอโซเลท (R4R-1, R4R-2 และ R4R-3) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากโปรงฟ้า (R5) มีจำนวน 6 ไอโซเลท (R5S-1, R5S-3, R5S-6, R5R-1, R5R-3 และ R5R-4) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเขยตาย (R6) มีจำนวน 4 ไอโซเลท (R6R-1, R6R-2, R6R-4 และ R6R-6) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะตูมไข่ (R7) มีจำนวน 8 ไอโซเลท (R7R-1, R7R-2, R7R-5, R7R-6, R7R-7, R7R-8, R7R-9 และ R7R-11) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส้มจี๊ด (R8) มีจำนวน 1 ไอโซเลท (R8S-3) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส้มแขก (R10) มีจำนวน 3 ไอโซเลท (R10R-1, R10R-2 และ R10R-4) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาก (R11) มีจำนวน 3 ไอโซเลท (R11R-1, R11R-2 และ R11R-3) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส้มเขียวหวาน (R12) มีจำนวน 1 ไอโซเลท (R12L-1) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะขวิด (R13) มีจำนวน 1 ไอโซเลท (R13R-3) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส้มจุก (R14) มีจำนวน 5 ไอโซเลท (R14R-1, R14R-2, R14R-3, R14R-4 และ R14R-5) แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะตูมไข่ (R15) มีจำนวน 7 ไอโซเลท (R15L-3, R15L-4, R15S-1, R15R-1, R15R-2, R15R-3, R15R-5, R15R-6, และ R15R-8) และแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากมะนาว (R16) มีจำนวน 2 ไอโซเลท (R16R-1 และ R16R-3) สำหรับการทดลองนี้ไม่สามารถคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้จากมะสัง (R9) (ตารางที่ 3-1) จากการนำน้ำกลั่นที่ผ่านการล้างตัวอย่างชิ้นส่วนพืชครั้งสุดท้ายหลังจากการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิว ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมสำหรับการคัดแยกเชื้อแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์มาเกลือเชื้อบนอาหารทั้ง 5 ชนิด พบว่าไม่มีการเจริญการของเชื้อจุลินทรีย์และแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารดังกล่าว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 59 ไอโซเลท เป็นแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แท้จริง เมื่อพิจารณาถึงชิ้นส่วน

ของพืชวงศ์ Rutaceae ที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อ พบว่าแอกแบคทีเรียเอนโดไฟท์เกือบทั้งหมดคัดแยกได้จากส่วนของรากซึ่งมีจำนวน 48 ไอโซเลท (81%) นอกจากนี้ยังคัดแยกได้จากส่วนของต้นจำนวน 7 ไอโซเลท (12%) และใบจำนวน 4 ไอโซเลท (7%)

ตารางที่ 3-1 แอกติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างชิ้นส่วนพืชวงศ์ Rutaceae

พืช	ชิ้นส่วนของพืช	ไอโซเลท
มะนาว (R1)	ใบ (R1L)	-
	ลำต้น (R1S)	R1S-3
	ราก (R1R)	-
มะนาว (R2)	ใบ (R2L)	-
	ลำต้น (R2S)	-
	ราก (R2R)	R2R-1, R2R-2, R2R-3, R2R-4, R2R-5, R2R-6, R2R-7
มะกรูด (R3)	ใบ (R3L)	R3L-1
	ลำต้น (R3S)	-
	ราก (R3R)	R3R-1, R3R-4, R3R-5, R3R-6
มะกรูด (R4)	ใบ (R4L)	-
	ลำต้น (R4S)	-
	ราก (R4R)	R4R-1, R4R-2, R4R-3
โปรงฟ้า (R5)	ใบ (R5L)	-
	ลำต้น (R5S)	R5S-1, R5S-3, R5S-6
	ราก (R5R)	R5R-1, R5R-3, R5R-4
เขยตาย (R6)	ใบ (R6L)	-
	ลำต้น (R6S)	-
	ราก (R6R)	R6R-1, R6R-2, R6R-4, R6R-6
มะตูมไซ้ (R7)	ใบ (R7L)	-
	ลำต้น (R7S)	-
	ราก (R7R)	R7R-1, R7R-2, R7R-5, R7R-6, R7R-7, R7R-8, R7R-9, R7R-11
ส้มจี๊ด (R8)	ใบ (R8L)	-
	ลำต้น (R8S)	R8S-3
	ราก (R8R)	-

## ตารางที่ 3-1 (ต่อ)

มะสัง (R9)	ใบ (R9L)	-
	ลำต้น (R9S)	-
	ราก (R9R)	-
ส้มเข้ง (R10)	ใบ (R10L)	-
	ลำต้น (R10S)	-
	ราก (R10R)	R10R-1, R10R-2, R10R-4
ส้มจี๊ด (R11)	ใบ (R11L)	-
	ลำต้น (R11S)	-
	ราก (R11R)	R11R-1, R11R-2, R11R-3
ส้มเขียวหวาน (R12)	ใบ (R12L)	R12L-1
	ลำต้น (R12S)	-
	ราก (R12R)	-
มะขวิด (R13)	ใบ (R13L)	-
	ลำต้น (R13S)	-
	ราก (R13R)	R13R-3
ส้มจุก (R14)	ใบ (R14L)	-
	ลำต้น (R14S)	-
	ราก (R14R)	R14R-1, R14R-2, R14R-3, R14R-4, R14R-5
มะตูมไข่ (R15)	ใบ (R15L)	R15L-3, R15L-4
	ลำต้น (R15S)	R15S-1
	ราก (R15R)	R15R-1, R15R-2, R15R-3, R15R-5, R15R-6, R15R-8
มะนาว (R16)	ใบ (R16L)	-
	ลำต้น (R16S)	-
	ราก (R16R)	R16R-1, R16R-3



### 3.2 การระบุสกุลของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae

การจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในระดับสกุลโดยการการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA

การศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 59 ไอโซเลท พบว่า แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้แบ่งออกได้เป็น 6 สกุล (ตารางที่ 3-1) ซึ่งประกอบด้วย แอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Actinomycetospora*, *Amycolatopsis*, *Marmoricola*, *Micromonospora*, *Nocardia* และ *Streptomyces* (ภาพที่ 3-1)

**กลุ่มที่ 1** แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในสกุล *Actinomycetospora* มีจำนวน 2 ไอโซเลท คิดเป็น 3% ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ ประกอบด้วย ไอโซเลท R5R-4 และ R5R-6 ซึ่งเชื้อในสกุลนี้คัดแยกได้จากรากโปรงฟ้า (R5) เท่านั้น

**กลุ่มที่ 2** แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในสกุล *Amycolatopsis* มีจำนวน 6 ไอโซเลท คิดเป็น 10% ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ ประกอบด้วย ไอโซเลท R10R-1, R10R-2, R10R-4, R13R-3, R14R-4 และ R14R-5 ซึ่งเชื้อในสกุลนี้คัดแยกได้จากรากส้มแขก (R10) รากมะขวิด (R13) และรากส้มจุก (R14)

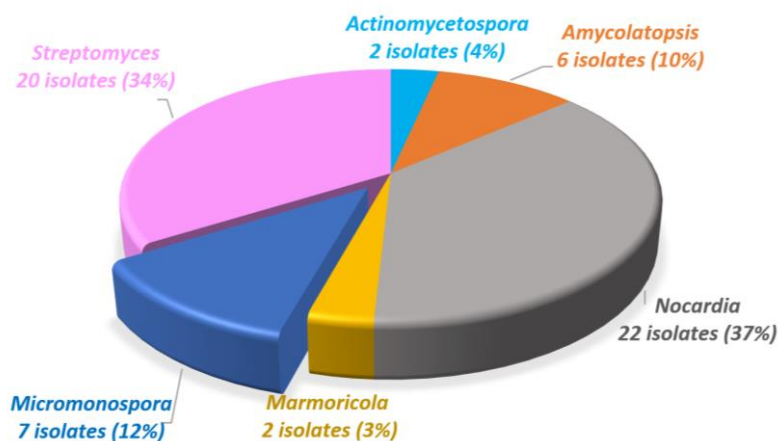
**กลุ่มที่ 3** แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในสกุล *Marmoricola* มีจำนวน 2 ไอโซเลท คิดเป็น 3% ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ ประกอบด้วย ไอโซเลท R1S-3 และ R8S-3 ซึ่งเชื้อในสกุลนี้คัดแยกได้จากลำต้นของมะนาว (R1) และส้มจี๊ด (R8)

**กลุ่มที่ 4** แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในสกุล *Micromonospora* มีจำนวน 7 ไอโซเลท คิดเป็น 12% ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ ประกอบด้วย ไอโซเลท R7R-9, R14R-1, R14R-2, R14R-3, R15L-3, R15L-4 และ R16R-1 ซึ่งเชื้อในสกุลนี้คัดแยกได้จากรากมะตูมไซ้ (R7) รากส้มจุก (R14) ใบมะตูมไซ้ (R15) และรากมะนาว (R16)

**กลุ่มที่ 5** แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในสกุล *Nocardia* มีจำนวน 22 ไอโซเลท คิดเป็น 37% ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ ประกอบด้วย ไอโซเลท R4R-1, R4R-2, R4R-3, R5R-1, R5R-3, R6R-6, R7R-1, R7R-2, R7R-5, R7R-6, R7R-7, R7R-8, R7R-11, R12L-1, R15S-1, R15R-1, R15R-2, R15R-3, R15R-5, R15R-6, R15R-8 และ R16R-3 ซึ่งเชื้อในสกุลนี้คัดแยกได้จากรากของมะกรูด (R4) โปรงฟ้า (R5) เขยตาย (R6) มะตูมไซ้ (R7) มะตูมไซ้ (R15) และมะนาว (R16) นอกจากนี้ยังคัดแยกได้จากใบส้มเขียวหวาน (R12) และลำต้นมะตูมไซ้ (R15) อีกด้วย

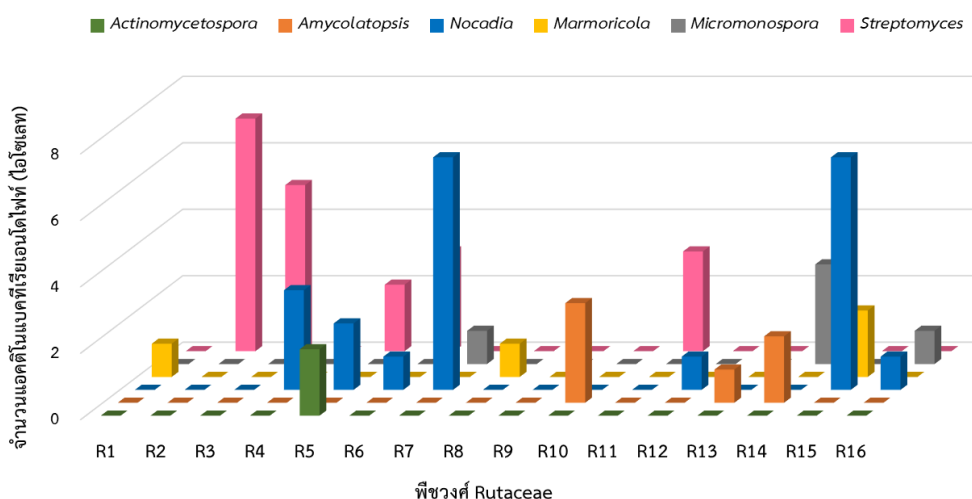
**กลุ่มที่ 6** แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในสกุล *Streptomyces* มีจำนวน 20 ไอโซเลท คิดเป็น 34% ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ ประกอบด้วย ไอโซเลท R2R-1, R2R-2, R2R-3, R2R-4, R2R-5, R2R-6, R2R-7, R3L-1, R3R-1, R3R-4, R3R-5, R3R-6, R5S-1, R5S-3, R6R-1, R6R-2, R6R-4, R11R-1, R11R-2 และ R11R-3 ซึ่งเชื้อในสกุลนี้คัดแยกได้จากรากของมะนาว

(R2) มะกรูด (R3) เขยตาย (R6) และส้มจี๊ด (R11) นอกจากนี้ยังคัดแยกได้จากใบมะกรูด (R3) และลำต้นโปรงฟ้า (R5) อีกด้วย



ภาพที่ 3-1 สกุลของแอกติโนแบคทีเรียไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae

เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากพืชวงศ์ Rutaceae แต่ละชนิด พบว่าแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากโปรงฟ้า (R5) มีความหลากหลายของเชื้อมากที่สุด ซึ่งพบแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 3 สกุล คือ *Actinomycetospira*, *Nocardia* และ *Streptomyces* (ภาพที่ 3-2)



ภาพที่ 3-2 กราฟแสดงความหลากหลายของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากพืชวงศ์ Rutaceae

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้งหมดจำนวน 59 ไอโซเลท โดยนำเชื้อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 14 วัน และศึกษาการสร้างเส้นใยอากาศ ลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนีด้านบน (upper colony) และด้านล่าง (reversed colony) และการสร้างรงควัตถุ (soluble pigment) ผลการทดลองพบว่าแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 59 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง ISP 2 ลักษณะโคโลนีมีทั้งแบบขอบเรียบและหยัก ตรงกลางโคโลนียุบตัวลงเล็กน้อย ผิวหน้าโคโลนีคล้ายกำมะหยี่หรือมีลักษณะเป็นผง สีโคโลนีที่ปรากฏมีทั้งสีขาว ครีမ် เหลือง ส้ม น้ำตาล เทา จนถึงสีดำ และเมื่อนำโคโลนีไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า แอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่สามารถสร้างเส้นใยอากาศได้ ซึ่งลักษณะของเส้นใยอากาศที่พบมีทั้งแบบเกลียว (spiral) เส้นตรง (straight) และแบบสายสั้น (short) (ตารางที่ 3-2 และภาพที่ 3-3 ถึง 3-17) นอกจากนี้แอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไอโซเลทที่สามารถสร้างรงควัตถุที่มีสีเหลืองอ่อน สีเหลืองเข้ม และสีน้ำตาล

ตารางที่ 3-2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากพืชวงศ์ Rutaceae เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 และการจัดจำแนกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในระดับสกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุที่ผลิต	การจัดจำแนกในระดับสกุล
R1S-3	None	Vivid yellow	Deep yellow	Moderate yellow	<i>Marmoricola</i>
R2R-1	Abundant, spiral	White-light bluish gray	Dark grayish yellow	Dark yellow	<i>Streptomyces</i>
R2R-2	Moderate, spiral	White-pale blue-grayish yellow	Light olive brown	Dark yellow	<i>Streptomyces</i>
R2R-3	Moderate, spiral	White -light greenish gray	Dark yellow	Dark orange yellow	<i>Streptomyces</i>
R2R-4	Abundant, spiral	Light bluish gray	Deep yellow	Dark yellow	<i>Streptomyces</i>
R2R-5	Abundant, spiral	Light bluish gray	Deep yellow	Dark yellow	<i>Streptomyces</i>
R2R-6	Abundant, spiral	White - light bluish	Dark yellow	Dark grayish yellow	<i>Streptomyces</i>
R2R-7	Abundant, straight	Bluish white - light bluish gray	Light yellow	None	<i>Streptomyces</i>
R3L-1	Abundant, straight	Bluish white - light bluish gray	Moderate greenish yellow	None	<i>Streptomyces</i>
R3R-1	Abundant, spiral	Pinkish gray - light brownish gray	Deep greenish yellow	Light yellow	<i>Streptomyces</i>
R3R-4	Abundant, spiral	Greenish gray - bluish white	Moderate olive brown	Dark grayish yellow	<i>Streptomyces</i>
R3R-5	Abundant, spiral	Light gray - medium gray Purplish white	Moderate greenish yellow	Brilliant yellow	<i>Streptomyces</i>
R3R-6	Moderate, straight	Light yellow - pale yellow	Deep yellow	Vivid yellow	<i>Streptomyces</i>
R4R-1	Moderate, short	Bluish white - light orange	Deep orange yellow	None	<i>Nocardia</i>

ตารางที่ 3-2 (ต่อ)

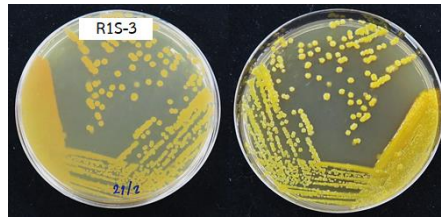
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สิ่งควัฒ์ที่ผลิต	การจัดจำแนกในระดับสกุล
R4R-2	Moderate, short	Bluish white - light orange	Deep orange yellow	None	<i>Nocardia</i>
R4R-3	Moderate, short	Bluish white - light orange	Deep orange yellow	None	<i>Nocardia</i>
R5S-1	Abundant, spiral	Medium gray	Light grayish olive	None	<i>Streptomyces</i>
R5S-3	Abundant, short	Grayish yellowish brown	Grayish yellowish brown	None	<i>Streptomyces</i>
R5S-6	Moderate, short	Greenish white	Pale greenish yellow	None	<i>Actinomycetospora</i>
R5R-1	Abundant, hook	Pale yellow	Pale yellow	None	<i>Nocardia</i>
R5R-3	Moderate, short	Greenish white	Pale greenish yellow	None	<i>Nocardia</i>
R5R-4	Moderate, short	Greenish white	Pale greenish yellow	None	<i>Actinomycetospora</i>
R6R-1	Abundant, spiral	Bluish gray	Moderate yellowish brown	None	<i>Streptomyces</i>
R6R-2	Abundant, spiral	Bluish gray	Moderate yellowish brown	None	<i>Streptomyces</i>
R6R-4	Abundant, spiral	Bluish gray	Moderate yellowish brown	None	<i>Streptomyces</i>
R6R-6	Moderate, short	Yellowish white	Grayish yellow	None	<i>Nocardia</i>
R7R-1	Moderate, short	White	Pale yellow	None	<i>Nocardia</i>
R7R-2	Moderate, short	Pale yellowish green	Pale yellowish green	None	<i>Nocardia</i>
R7R-5	Rare, short	Pale yellow	Pale yellow	None	<i>Nocardia</i>
R7R-6	Moderate, short	Pale yellowish green	Pale yellowish green	None	<i>Nocardia</i>
R7R-7	Moderate, long	Greenish white	Pale yellowish green	None	<i>Nocardia</i>

ตารางที่ 3-2 (ต่อ)

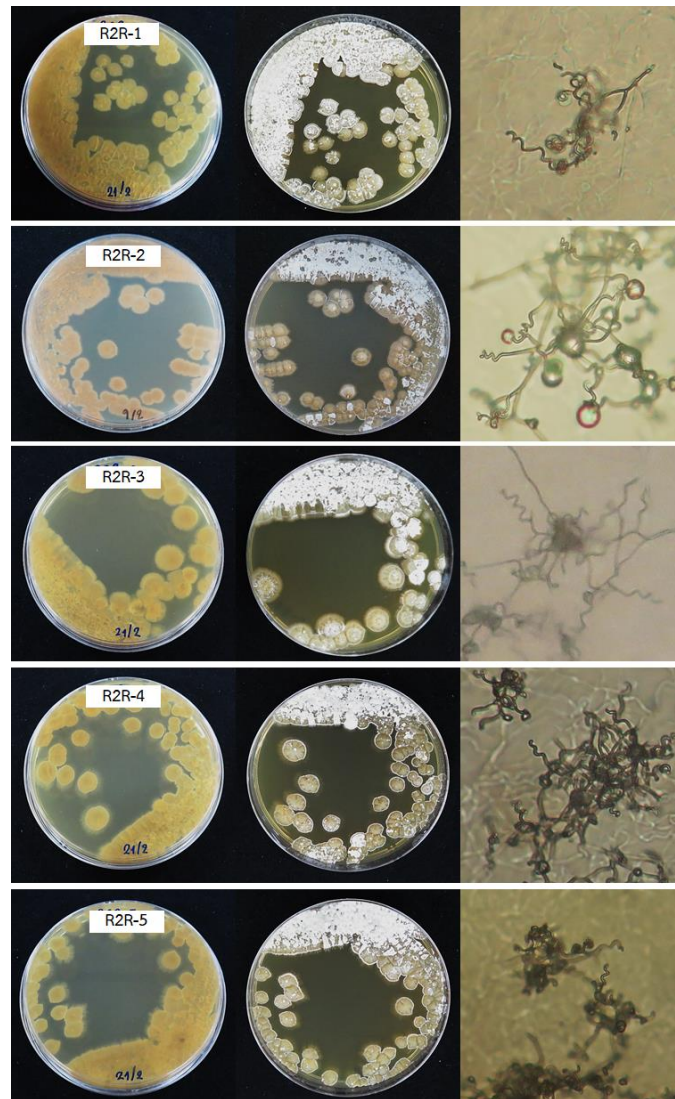
ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สิ่งควัฒ์ที่ผลิต	การจัดจำแนกในระดับสกุล
R7R-8	Moderate, short	Pale yellowish green - greenish white	Pale yellowish green	None	<i>Nocardia</i>
R7R-9	None	Moderate olive brown	Moderate olive brown	None	<i>Micromonospora</i>
R7R-11	Moderate, short	Pale yellow	Pale yellow	None	<i>Nocardia</i>
R8S-3	None	Vivid yellow	Vivid yellow	None	<i>Marmoricola</i>
R10R-1	Abundant, straight	White - greenish white	Light yellow	None	<i>Amycolatopsis</i>
R10R-2	Abundant, spiral	White	Light yellow	None	<i>Amycolatopsis</i>
R10R-4	Abundant, straight	Pinkish white	Moderate yellow	None	<i>Amycolatopsis</i>
R11R-1	Abundant, spiral	Medium gray	Strong yellowish Brown	Light olive brown	<i>Streptomyces</i>
R11R-2	Abundant, straight	Light yellow	Light greenish yellow	None	<i>Streptomyces</i>
R11R-3	Abundant, spiral	Light olive gray	Strong yellowish Brown	Olive brown	<i>Streptomyces</i>
R12L-1	Abundant, short	Greenish white	Pale yellowish green	None	<i>Nocardia</i>
R13R-3	Abundant, straight	Light yellow	Light yellow	None	<i>Amycolatopsis</i>
R14R-1	None	Strong orange yellow	Strong orange yellow	None	<i>Micromonospora</i>
R14R-2	None	Strong orange yellow	Strong orange yellow	None	<i>Micromonospora</i>
R14R-3	None	Dark brown	Deep brown	None	<i>Micromonospora</i>
R14R-4	Abundant, straight	Brownish pink	Strong yellow	None	<i>Amycolatopsis</i>

ตารางที่ 3-2 (ต่อ)

ไอโซเลท	ลักษณะเส้นใยอากาศ	สีโคโลนี	สีเส้นใยอาหาร	สิ่งมีชีวิตที่ผลิต	การจัดจำแนกในระดับสกุล
R14R-5	Abundant, straight	White	Light yellow	None	<i>Amycolatopsis</i>
R15L-3	None	Moderate olive brown	Moderate olive brown	None	<i>Micromonospora</i>
R15L-4	None	Moderate olive brown	Moderate olive brown	None	<i>Micromonospora</i>
R15S-1	Moderate, short	Greenish white	Pale yellowish green	None	<i>Nocardia</i>
R15R-1	Moderate, long	Greenish white	Pale greenish yellow	None	<i>Nocardia</i>
R15R-2	Moderate, short	Greenish white	Pale yellowish green	None	<i>Nocardia</i>
R15R-3	Moderate, short	Strong orange yellow	Strong orange yellow	None	<i>Nocardia</i>
R15R-5	Moderate, short	Pale yellowish green greenish white	Pale yellowish green	None	<i>Nocardia</i>
R15R-6	Abundant, short	Pale yellowish green	Pale yellowish green	None	<i>Nocardia</i>
R15R-8	Moderate, short	Moderate pink	Moderate pink	None	<i>Nocardia</i>
R16R-1	None	Moderate olive brown	Moderate olive brown	None	<i>Micromonospora</i>
R16R-3	Abundant, short	White	Pale yellow	None	<i>Nocardia</i>

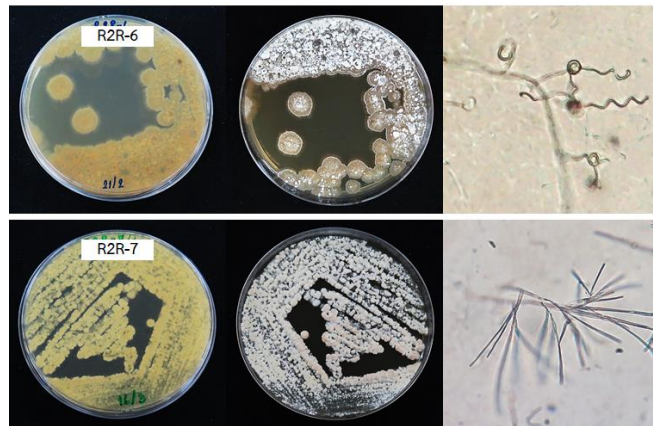


ภาพที่ 3-3 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะนาว (R1) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

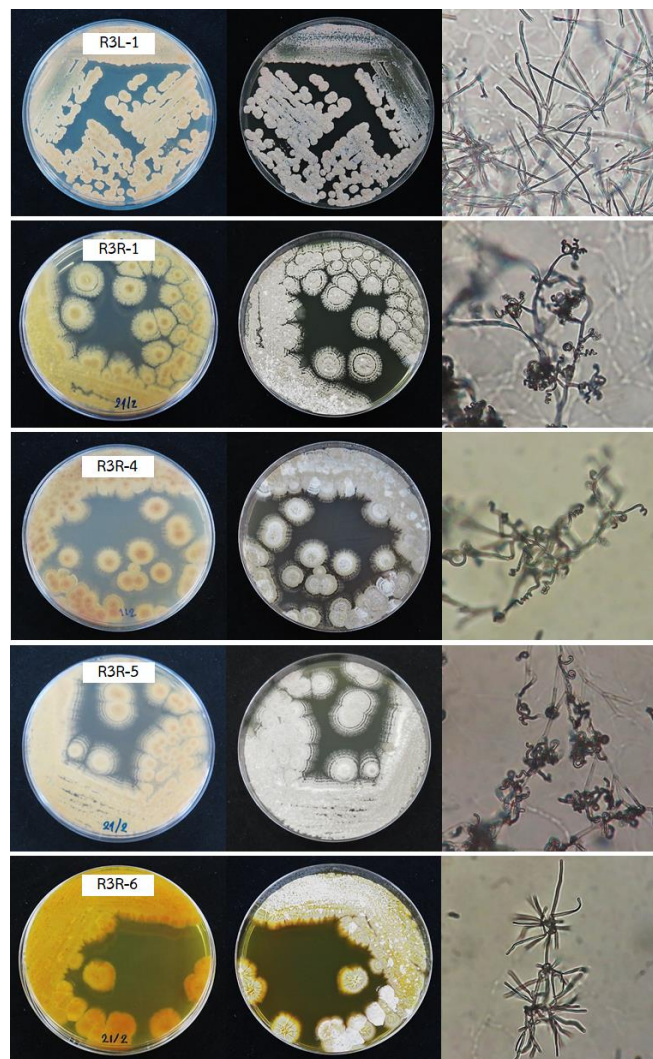


ภาพที่ 3-4 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะนาว (R2) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

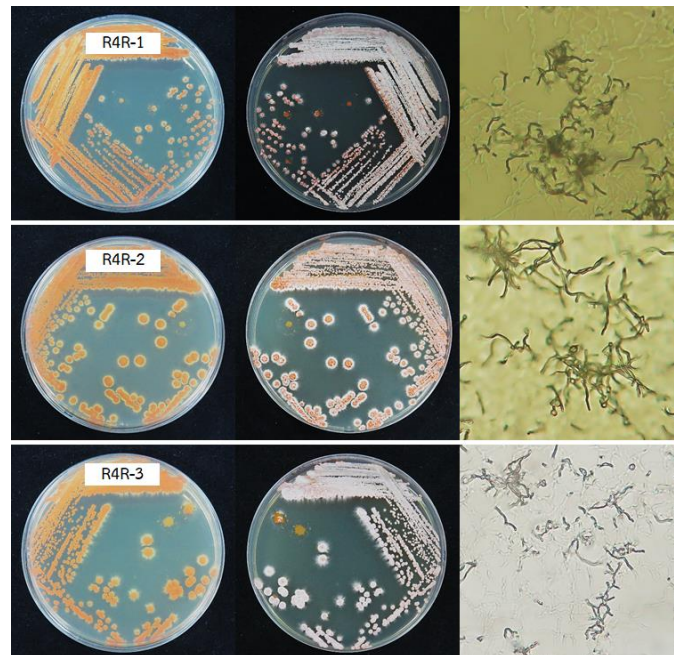




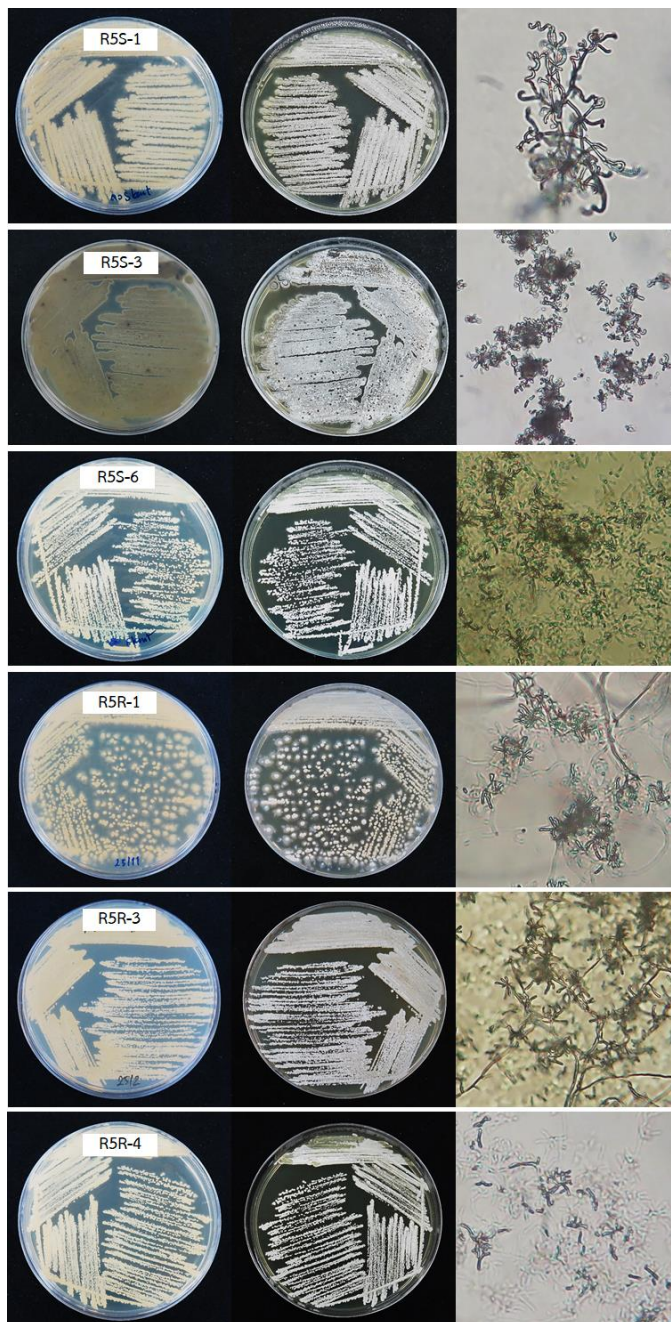
ภาพที่ 3-4 (ต่อ)



ภาพที่ 3-5 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะกรูด (R3) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

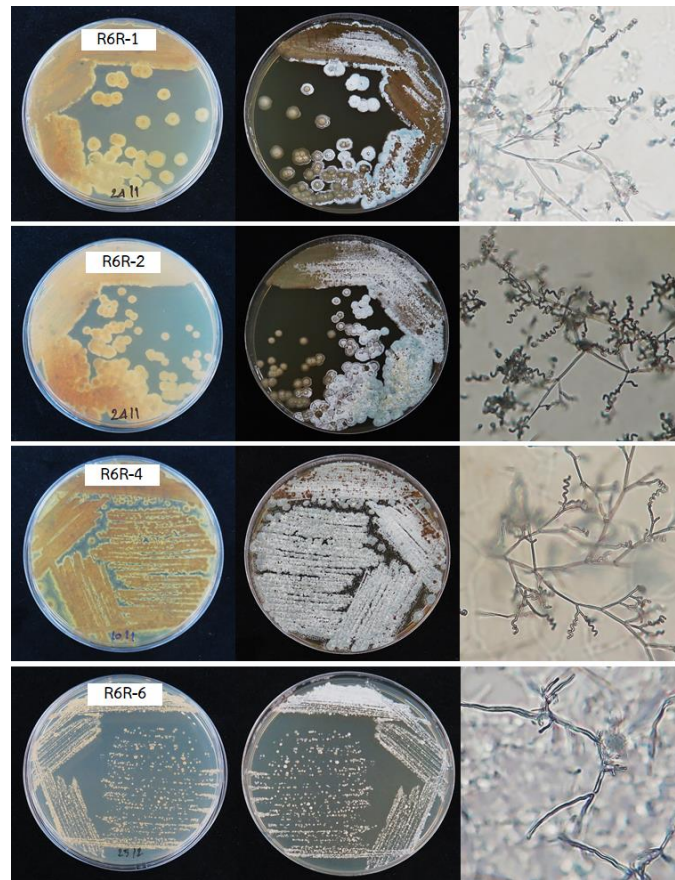


ภาพที่ 3-6 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนมัยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะกรูด (R4) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

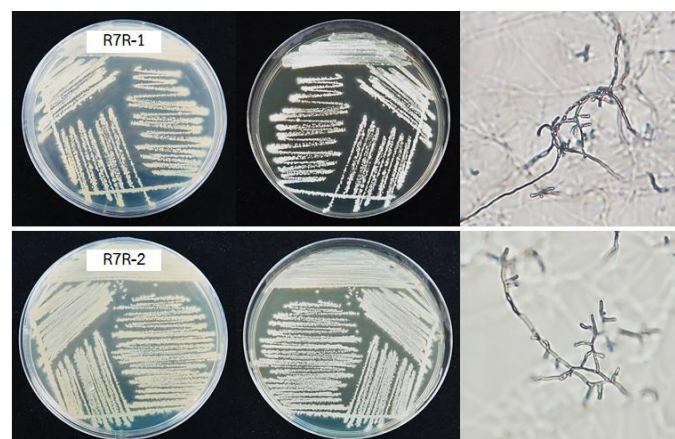


ภาพที่ 3-7 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากโปรงฟ้า (R5) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

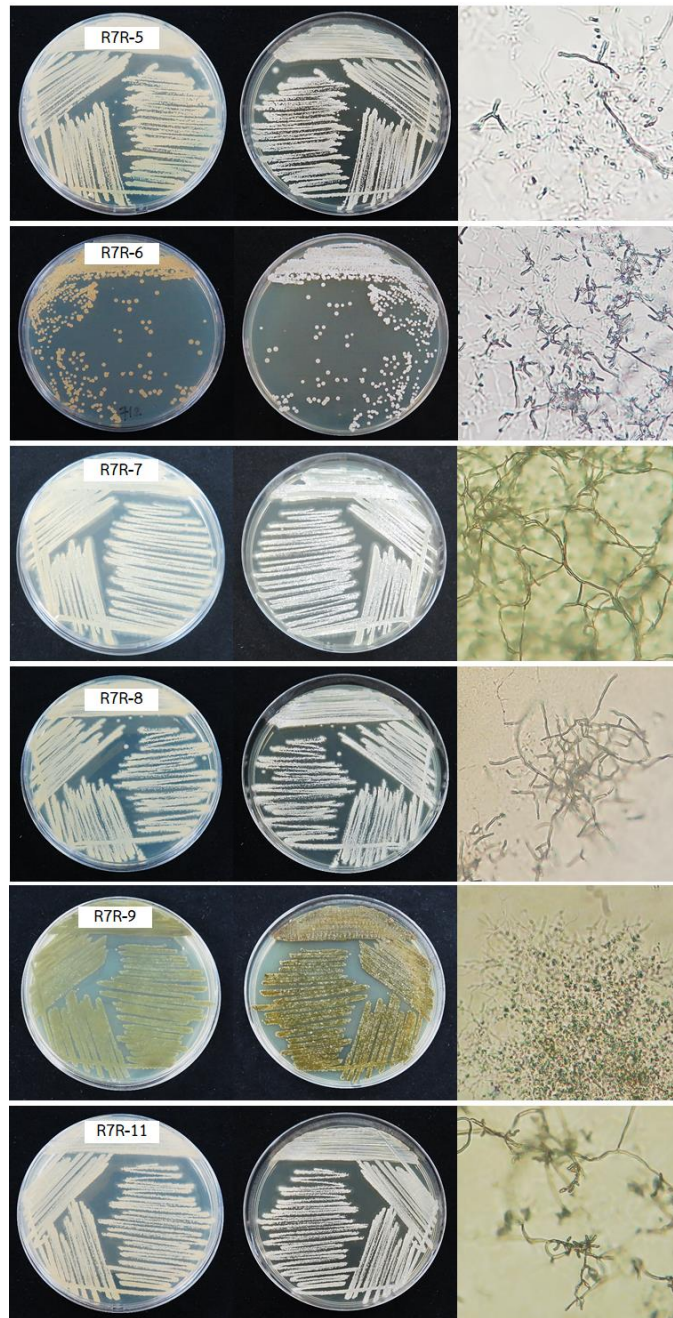




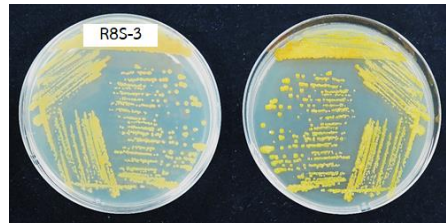
ภาพที่ 3-8 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากเขยตาย (R6) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน



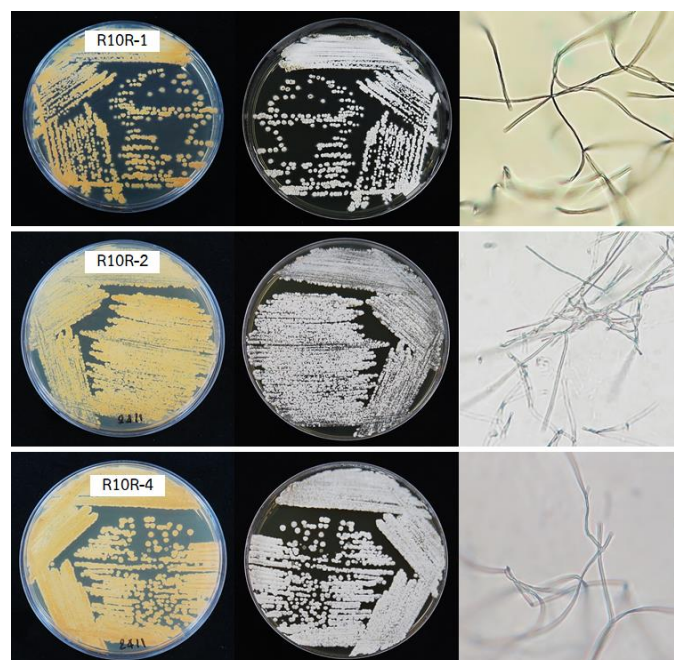
ภาพที่ 3-9 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะตูมไข่ (R7) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน



ภาพที่ 3-9 (ต่อ)

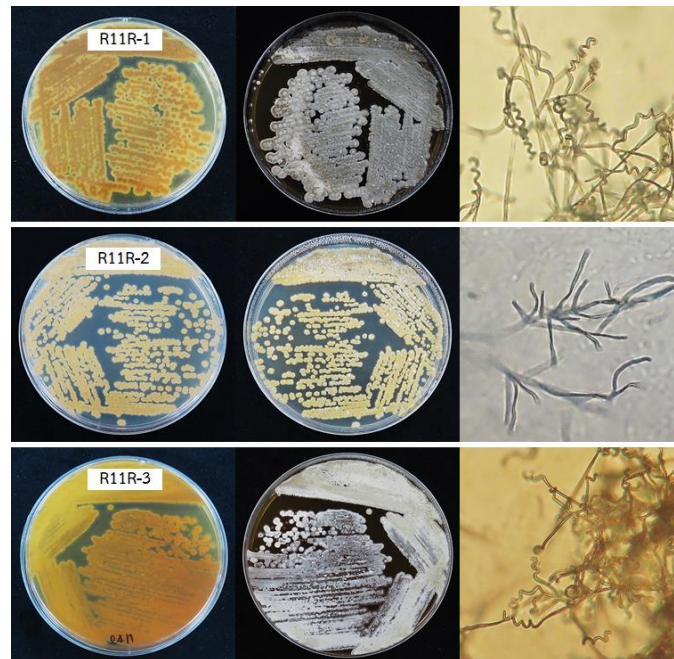


ภาพที่ 3-10 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากส้มจี๊ด (R8) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน



ภาพที่ 3-11 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากส้มเขียวหวาน (R10) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน





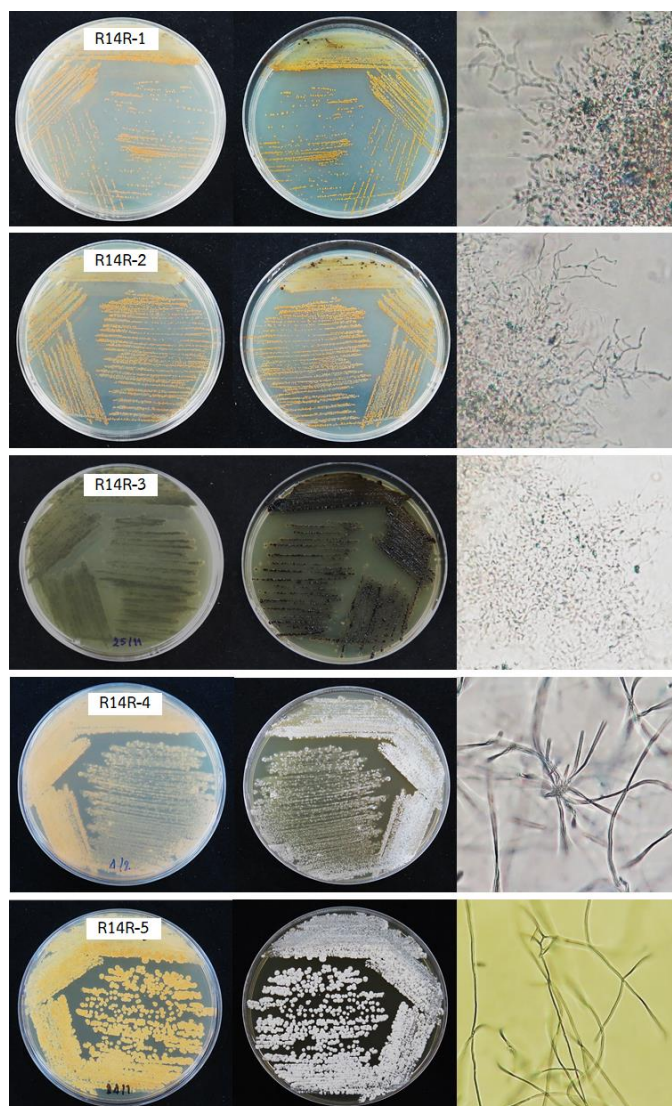
ภาพที่ 3-12 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากส้มจี๊ด (R11) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน



ภาพที่ 3-13 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากส้มเขียวหวาน (R12) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

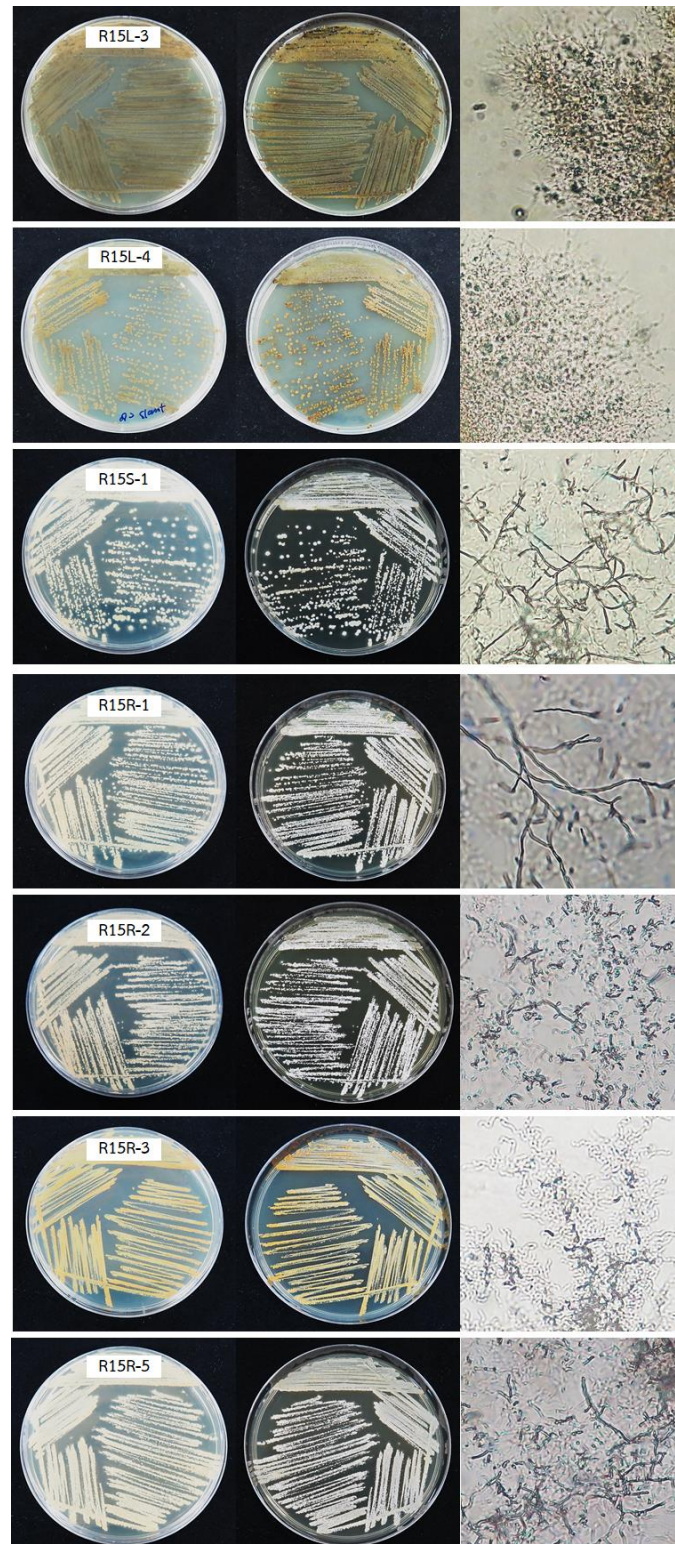


ภาพที่ 3-14 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะขวิด (R13) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

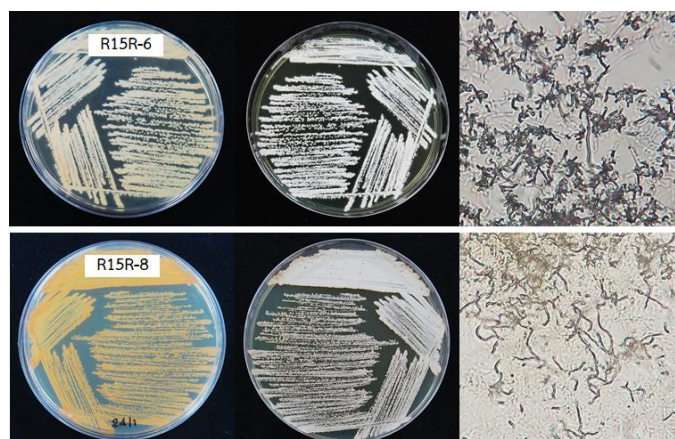


ภาพที่ 3-15 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากส้มจุก (R14) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

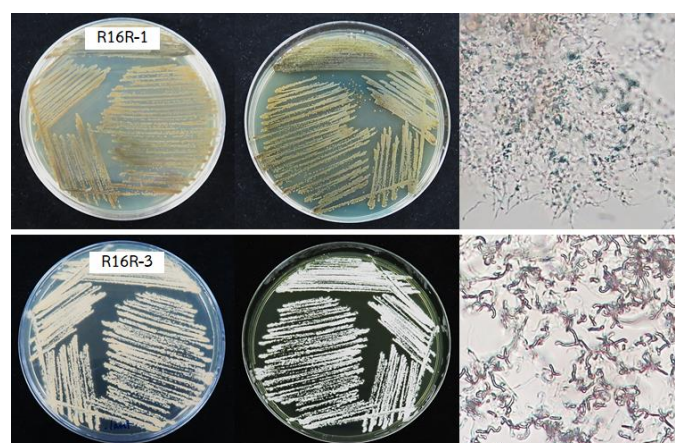




ภาพที่ 3-16 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะตูมไข่ (R15) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน



ภาพที่ 3-16 (ต่อ)

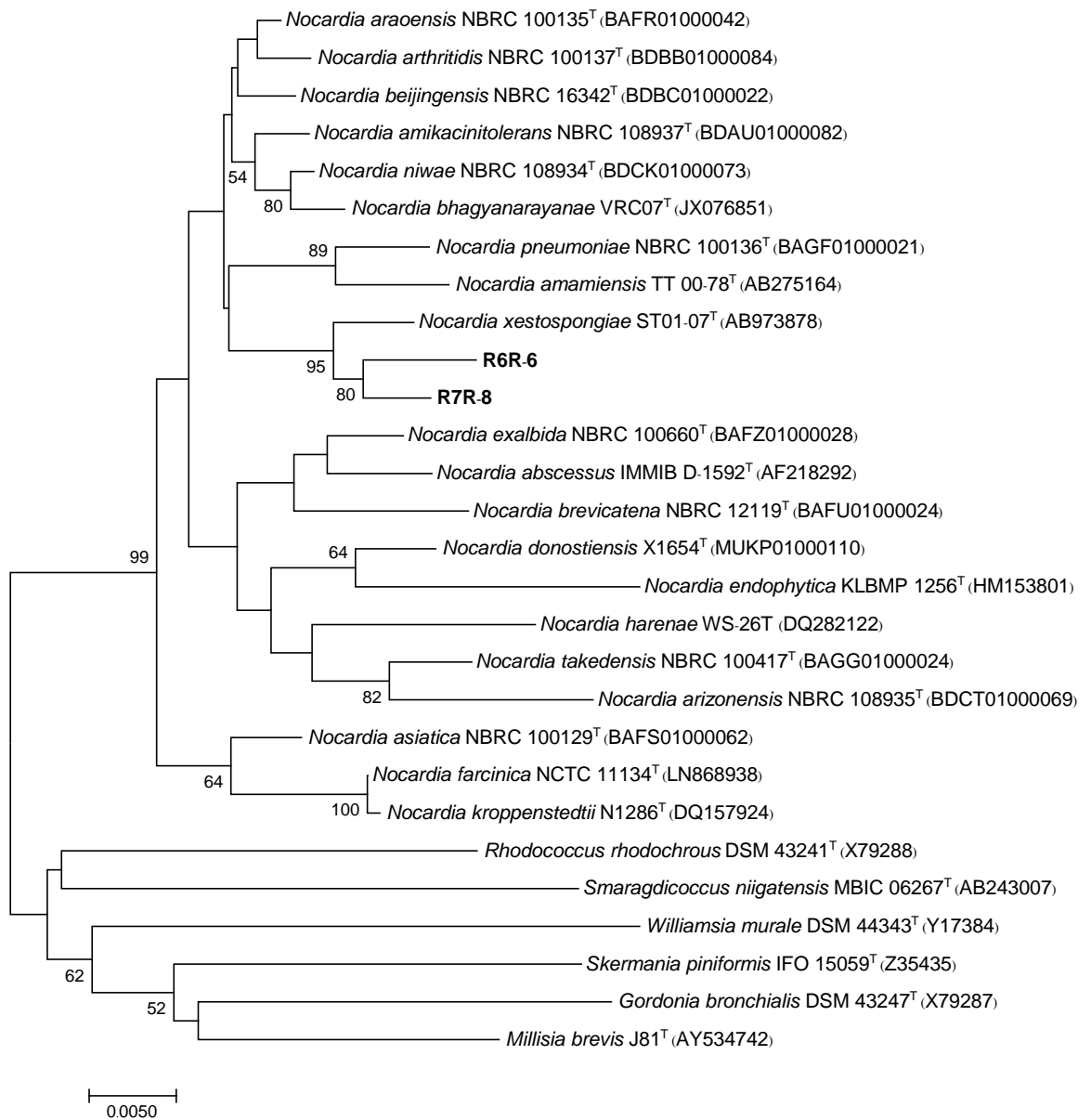


ภาพที่ 3-17 ลักษณะโคโลนีและเส้นใยอากาศของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากมะนาว (R16) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ISP2 เป็นเวลานาน 14 วัน

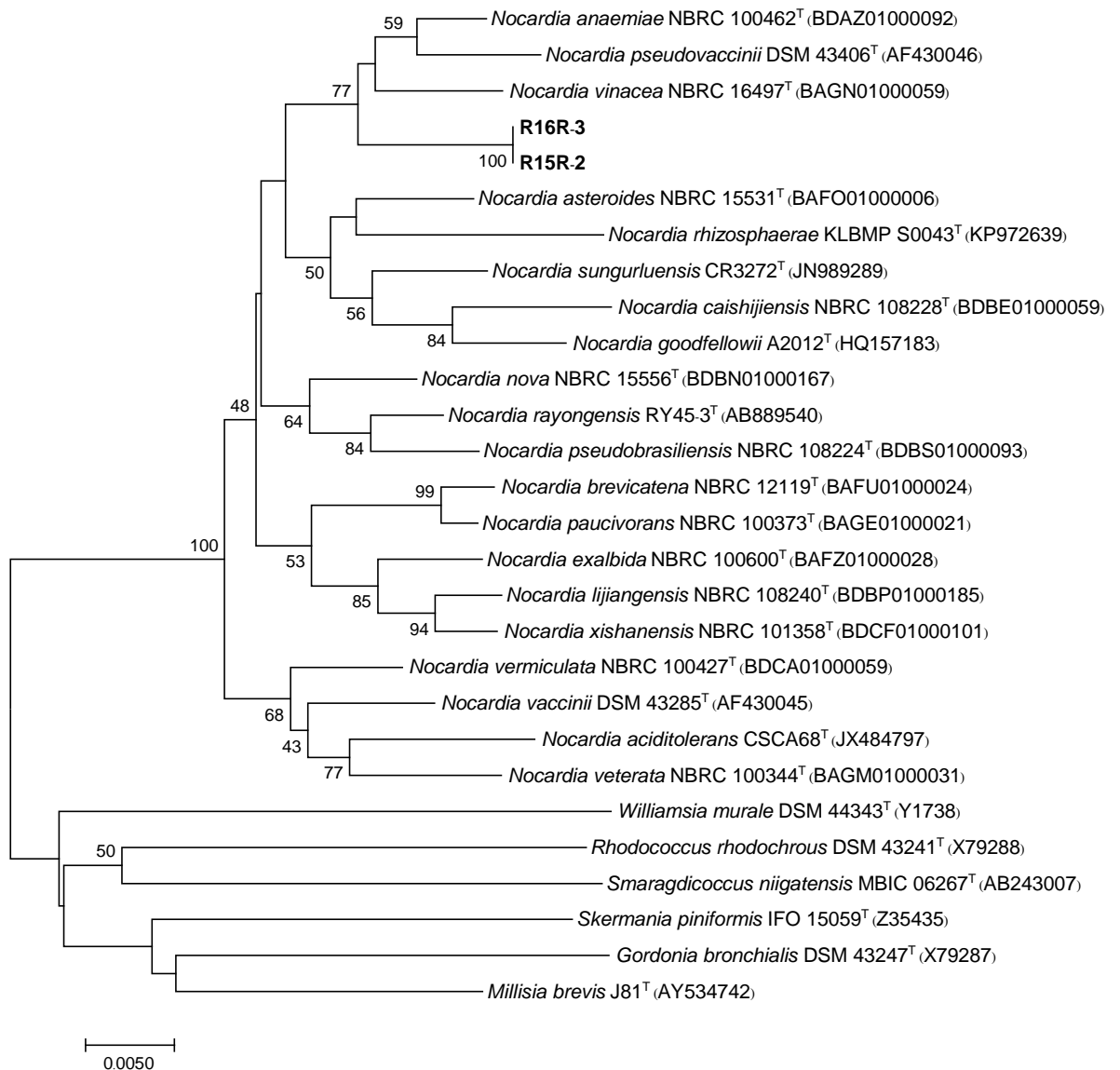
จากการวิเคราะห์ความเหมือนของยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ พบว่า มีแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลท ที่มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Nocardia* ได้แก่ ไอโซเลท KK12-4 และ KK12-5 และ *Streptomyces* ได้แก่ ไอโซเลท R6R-6, R7R-8, R15R และ R16R-3 เนื่องจากมีความเหมือนของยีน 16S rRNA เทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงที่มีความใกล้เคียงกันที่สูดน้อยกว่า 99% ซึ่งเป็นไปตามผลการวิจัยของ Stackebrandt และ Eber ในปี 2006 ที่กล่าวไว้ว่า การนำจีโนมของแบคทีเรียมาเข้าคู่กับจีโนมของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (DNA-DNA hybridization) ที่มีความเหมือนของยีนบริเวณ 16S rRNA น้อยกว่า 99% จะมีความเข้ากันได้ของจีโนมต่ำกว่า 70% และการที่จีโนมของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์เข้าคู่กันได้น้อย 70% นั้น แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่หรือสปีชีส์ใหม่ (Wayne et al., 1987)

แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R6R-6 และ R7R-8 มีความเหมือนของยีน 16S rRNA คล้ายกับ *Nocardia xestospongiae* ST01-07<sup>T</sup> (98.8%) เมื่อนำยีนดังกล่าวของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree ยีน 16S rRNA เทียบกับแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Nocardia* พบว่า ไอโซเลท R6R-6 และ R7R-8 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกออกจากสายพันธุ์ *Nocardia xestospongiae* ST01-07<sup>T</sup> และสายพันธุ์อื่นๆ (ภาพที่ 3-18) แสดงให้เห็นว่า แอกติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท R6R-6 และ R7R-8 น่าจะเป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Nocardia*

แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R15R-2 และ R16R-3 มีความเหมือนของยีน 16S rRNA คล้ายกับ *Nocardia anaemiae* NBRC 100462<sup>T</sup> (98.5%) เมื่อนำยีนดังกล่าวของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree ยีน 16S rRNA เทียบกับแอกติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Nocardia* พบว่า ไอโซเลท R15R-2 และ R16R-3 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกออกจากสายพันธุ์ *Nocardia anaemiae* NBRC 100462<sup>T</sup> และสายพันธุ์อื่นๆ (ภาพที่ 3-19) แสดงให้เห็นว่า แอกติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท R15R-2 และ R16R-3 น่าจะเป็นแอกติโนแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Nocardia* และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไอโซเลท R15R-2 และ R16R-3 พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทนี้น่าจะเป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกัน



ภาพที่ 3-18 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R6R-6 และ R7R-8 กับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Nocardia*



ภาพที่ 3-19 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนบริเวณ 16S rRNA ของ แอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R15R-2 และ R16R-3 กับแอคติโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความคล้ายกันในสกุล *Nocardia*



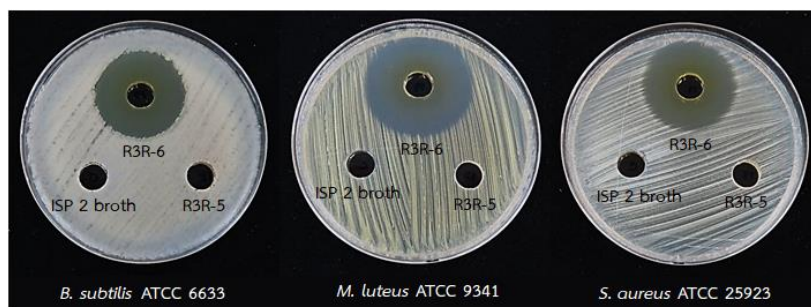
### 3.3 การคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

จากการทดสอบความสามารถของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae จำนวน 59 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน การทดลองนี้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 6 สายพันธุ์ สำหรับเป็นตัวแทนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus* ATCC 9341, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 และยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ผลการทดลองพบว่า มีแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบ คือ ไอโซเลท R2R-2, R2R-6, R3R-6, R6R-1, R6R-2 และ R6R-4 ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และไอโซเลท R10R-1, R10R-2, R10R-4 และ R14R-4 ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Amycolatopsis* (ตารางที่ 3-3 และภาพที่ 3-20) โดยไอโซเลท R3R-6 ซึ่งแยกได้จากรากของมะกรูดสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 ส่วนไอโซเลท R10R-1, R10R-2 และ R10R-4 ซึ่งแยกได้จากรากส้มเขียว นอกจากสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ได้อีกด้วย

ตารางที่ 3-3 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร)					
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
R2R-2	-	16.0±0.00	-	-	-	-
R2R-6	-	13±0.00	-	-	-	-
R3R-6	33.3±0.58	40±0.00	35.0±0.00	-	-	-
R6R-1	10±0.00	10±0.00	11±0.00	-	-	-
R6R-2	15±0.00	20±0.00	16±0.10	-	-	-
R6R-4	14 ±0.10	13±0.00	11.7±0.06	-	-	-
R10R-1	18.2±0.03	18.2±0.03	23.3±0.12	-	-	15.5±0.09
R10R-2	18±0.09	28.5±0.00	24.0±0.00	-	-	15.7±0.12
R10R-4	17.2±0.03	27.5±0.00	22.2±0.10	-	-	10±0.17
R14R-4	14±0.00	22±0.00	18.5±0.09	-	-	-
Chloram-phenicol (C <sub>30</sub> )	24.3±0.58	37.3±0.58	28.7±0.58	-	13±0.58	-
Amphotericin B	-	-	-	-	-	15

\* - ; ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ



ภาพที่ 3-20 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 ของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R3R-6

### 3.4 การผลิตและการสกัดแยกสารต้านจุลินทรีย์จากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์

จากผลการคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานพบว่า แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R3R-6 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตสารต้านแบคทีเรียบกที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะสำหรับใช้เป็นยาในทางการแพทย์ได้ ดังนั้น ไอโซเลท R3R-6 จึงถูกคัดเลือกสำหรับมาใช้ในการผลิตและการสกัดแยกสารต้านจุลินทรีย์จากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์

จากการเพาะเลี้ยงแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R3R-6 ในอาหารเหลว ISP 2 ปริมาตร 1 ลิตร ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 7 วัน และนำมาสกัดแยกด้วยเอทิลอะซิเตทจะได้ผลิตภัณฑ์สารสกัดหยาบ 2 ส่วน คือ สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบชั้นน้ำ ซึ่งสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทที่ได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีส้ม เมื่อทำให้อยู่ในรูปของสารละลายจะมีสีเหลืองเข้ม ส่วนสารสกัดหยาบชั้นน้ำที่ได้จะมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

จากการนำสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทและชั้นน้ำที่ผลิตจากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ไอโซเลท R3R-6 ที่ความเข้มข้น 0.1875, 0.375, 0.75, 1.5, 3.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 ด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ทุกความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 3-4 และภาพที่ 3-21) และไม่พบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบสำหรับสารสกัดหยาบในชั้นน้ำ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทมีสารต้านแบคทีเรีย (antibacterial compound) เป็นองค์ประกอบ เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทที่ผลิตจากเชื้อไอโซเลท R3R-6 (ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20

ไมโครลิตร) กับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน chloramphenicol (C30) ที่ปริมาณสารเท่ากันคือ 30 ไมโครกรัม พบว่า สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทที่ผลิตจากเชื้อไอโซเลท R3R-6 มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 เทียบเท่ามาตรฐาน chloramphenicol ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ ซึ่งหากมีการนำสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปก็อาจจะส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่ามาตรฐาน

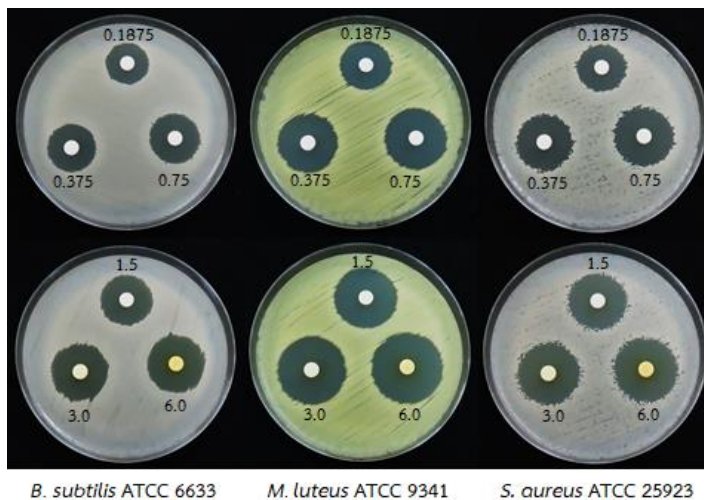
ตารางที่ 3-4 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ R3R-6

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ ชั้นเอทิลอะซิเตท (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร)		
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>M. luteus</i> ATCC9341	<i>S. aureus</i> ATCC25923
0.1875	19.0±0.00	22.3±0.58	23.0±0.00
0.375	20.0±0.00	24.0±1.00	25.0±0.00
0.75	21.7±1.15	25.3±0.58	26.7±0.58
1.5	23.7± 0.58	25.0±0.00	28.7± 0.58
3.0	24.3±0.58	25.3±0.58	29.7± 0.58
6.0	25.0±0.00	26.7±0.58	31.0± 0.00
Chloramphenicol (C30)	14.7±0.58	25.3±0.58	30.7±0.58
10% DMSO	-	-	-

\* ทดสอบฤทธิ์โดยวิธี agar disc diffusion ปริมาตรสารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบ 20 ไมโครลิตร

-; ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบ





ภาพที่ 3-21ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Streptomyces* sp. R3R-6

### 3.5 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Streptomyces* sp. R3R-6

จากการวิเคราะห์ชนิดของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Streptomyces* sp. R3R-6 ด้วยเทคนิค HPLC เทียบกับฐานข้อมูลและสารมาตรฐานพบว่า สารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. R3R-6 คือ actinomycin D ซึ่งนอกจากจะมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกแล้วยังมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งอีกด้วย

#### 3.5.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* ในอาหารเหลว ISP2 เป็นเวลานาน 13 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลในอัตราส่วน 1: 1 และนำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสาร actinomycin D ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า *Streptomyces* sp. R3R-6 สามารถผลิตสาร actinomycin D ได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ  $154.9 \pm 25.18$  มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 เป็นเวลานาน 10 วัน (ภาพที่ 3-22A) แต่เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสาร actinomycin D ที่ผลิตเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7, 8, 9 และ 10 วัน พบว่าปริมาณของสาร actinomycin D ที่เชื้อผลิตไม่แตกต่างกัน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสาร actinomycin D คือ 7 วัน เนื่องจากช่วยให้สามารถลดระยะเวลาและต้นทุนด้านพลังงานในการผลิตได้

### 3.5.2 ชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

จากการศึกษาชนิดของน้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ glucose, sucrose และ molasses (ภาพที่ 3-22B) พบว่า ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อนาน 7 วัน *Streptomyces* sp. R3R-6 สามารถผลิตสาร actinomycin D ได้สูงสุดเท่ากับ  $248.9 \pm 4.36$  มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งให้ปริมาณสาร actinomycin D เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 30 โดยปริมาณ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสาร actinomycin D จาก *Streptomyces* คือ sucrose เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ actinomycin D ที่ผลิตได้กับผลการทดลองของ Praveen & Tripathi (2009) ซึ่งได้ศึกษาการผลิต actinomycin-D จาก *Streptomyces griseoruber* Py ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณรากพืชสมุนไพร *Azadirachta indica* โดยเพาะเลี้ยง *S. griseoruber* PY ในอาหารเหลว X-medium ที่มีองค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร) ของ  $K_2HPO_4$  1,  $(NH_4)_2HPO_4$  0.5,  $MgSO_4$  0.5, NaCl 3,  $CaCO_3$  2, soybean meal 10 และ glycerol 15 บนเครื่องเขย่าแบบหมุน 200 rpm เป็นเวลานาน 6 วัน พบว่า *S. griseoruber* PY สามารถผลิตสาร actinomycin D สูงสุดเท่ากับ 210 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่า แอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Streptomyces* sp. R3R-6 มีประสิทธิภาพในการผลิตสาร actinomycin D สูงกว่า *S. griseoruber* PY ดังนั้น *Streptomyces* sp. R3R-6 เป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์แหล่งใหม่ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้สำหรับผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

### 3.5.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. R3R-6 ในอาหารเลี้ยงเหลว ISP2 ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ sucrose เป็น 0, 4, 10, 20 และ 50 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 3-22C) พบว่า การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. R3R-6 ในอาหารเลี้ยงเหลว ISP2 ที่มีความเข้มข้นของ sucrose เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน เชื้อสามารถผลิตสาร actinomycin D ได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ  $176.4 \pm 2.8$  มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณสาร actinomycin D เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 30 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ sucrose ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ดังนั้นความเข้มข้นของ sucrose เหมาะสมในการผลิตสาร actinomycin D จาก *Streptomyces* sp. R3R-6 คือ 10 กรัมต่อลิตร

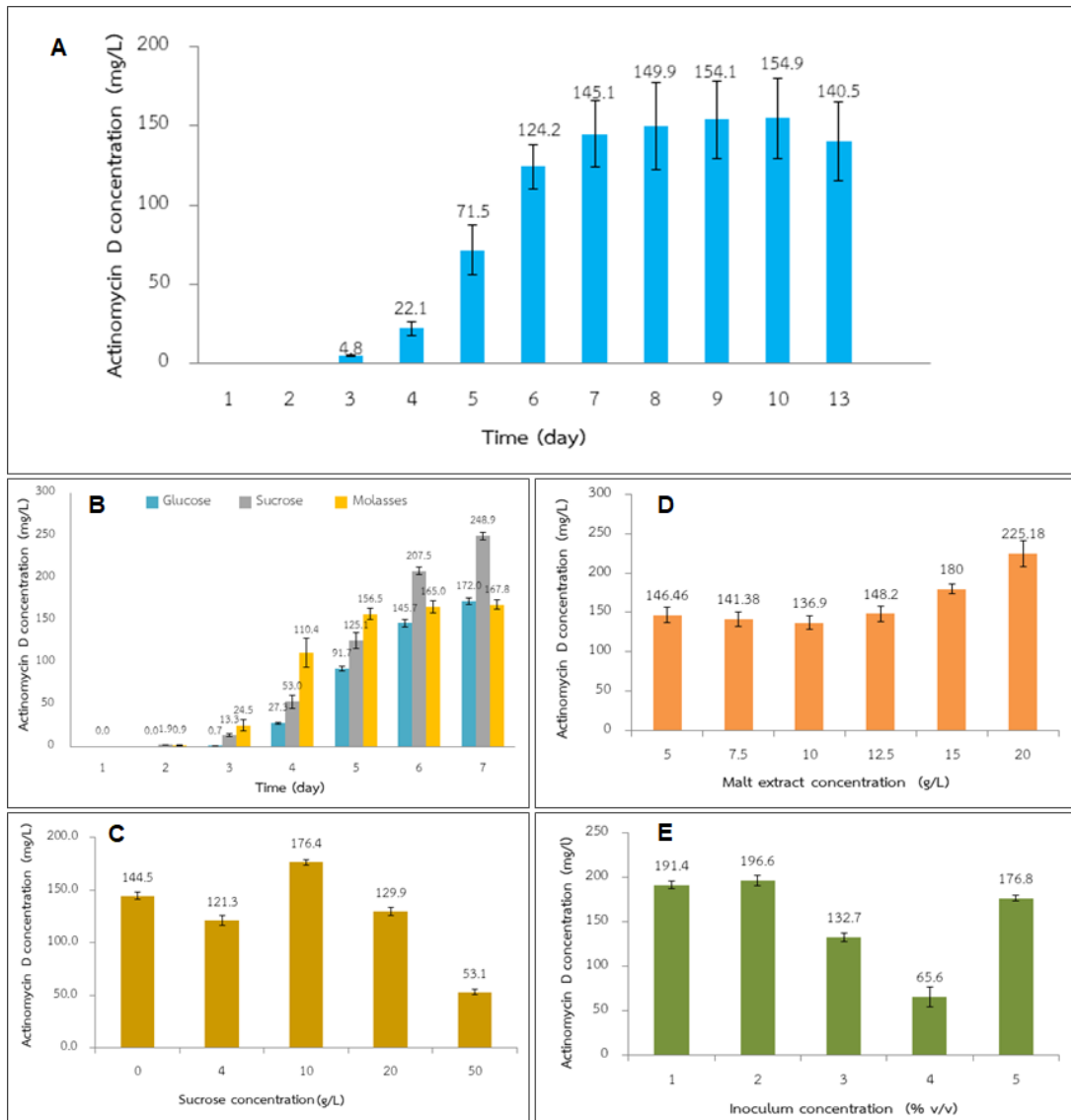
### 3.5.4 ความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. R3R-6 ในอาหารเลี้ยงเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลทราย (4 กรัมต่อลิตร) และยีสต์สกัด (4 กรัมต่อลิตร) ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่ความเข้มข้น 5, 7.5, 10, 12.5, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 3-22D) พบว่า การเพาะเลี้ยง

*Streptomyces* sp. R3R-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ 20 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน เชื้อสามารถผลิตสาร actinomycin D ได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ  $225.5 \pm 16.76$  มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณสาร actinomycin D เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 40 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารสกัดมอลต์ที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดมอลต์ที่เหมาะสมในการผลิตสาร actinomycin D จาก *Streptomyces* sp. R3R-6 คือ 20 กรัมต่อลิตร

### 3.5.5 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

จากการเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp. R3R-6 ในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของ sucrose (4 กรัมต่อลิตร) สารสกัดยีสต์ (4 กรัมต่อลิตร) และสารสกัดมอลต์ (10 กรัมต่อลิตร) ที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยปริมาตร (ภาพที่ 3-22E) ผลการทดลองพบว่า การใช้หัวเชื้อ *Streptomyces* sp. R3R-6 ปริมาณร้อยละ 2 โดยปริมาตร สามารถผลิตสาร actinomycin D ได้ความเข้มข้นสูงสุด ซึ่งเท่ากับ  $196.6 \pm 5.8$  มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. R3R-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อร้อยละ 1 และ 2 โดยปริมาตร พบว่า มีความเข้มข้นของสาร actinomycin D ไม่แตกต่างกัน จากการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสาร actinomycin D คือ 1% โดยปริมาตร



รูปที่ 3-22 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ชนิดของน้ำตาล ความเข้มข้นของน้ำตาลและสารสกัด

มอลต์ และปริมาณหัวเชื้อต่อการผลิตสาร actinomycin D จาก *Streptomyces* sp.

R3R-6

#### 4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

การคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากตัวอย่างพืชวงศ์ Rutaceae จำนวน 16 ตัวอย่าง ประกอบด้วย มะนาว (R1, R2 และ R16) มะกรูด (R3 และ R4) โปรงฟ้า (R5) เขยตาย (R6) มะตูมไข่ (R7 และ R15) ส้มจี๊ด (R8 และ R11) มะสัง (R9) ส้มเซ้ง (R10) ส้มเขียวหวาน (R12) มะขวิด (R13) และส้มจุก (R14) สามารถคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 59 ไอโซเลท โดยเชื้อส่วนใหญ่คัดแยกได้จากชิ้นส่วนของรากพืช

การระบุสกุลของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae โดยการศึกษาลักษณะทางจีโนมไทป์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16S rRNA เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในเนื้อเยื่อพืชวงศ์ Rutaceae พบว่าแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดจำนวน 59 ไอโซเลท แบ่งออกได้เป็น 6 สกุล ซึ่งประกอบด้วย แอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Actinomycetospora* จำนวน 2 ไอโซเลท (3%), *Amycolatopsis* จำนวน 6 ไอโซเลท (10%), *Marmoricola* จำนวน 2 ไอโซเลท (3%), *Micromonospora* จำนวน 7 ไอโซเลท (12%), *Nocardia* จำนวน 22 ไอโซเลท (37%) และ *Streptomyces* จำนวน 20 ไอโซเลท (34%) นอกจากนี้พบว่า มีแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 4 ไอโซเลท ที่น่าจะเป็นแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์สปีชีส์ใหม่ที่จัดอยู่ในสกุล *Nocardia* ได้แก่ ไอโซเลท R6R-6, R7R-8, R15R-2 และ R16R-3

แอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 10 ไอโซเลท (17%) ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ ไอโซเลท R2R-2, R2R-6, R3R-6, R6R-1, R6R-2 และ R6R-4 ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และไอโซเลท R10R-1, R10R-2, R10R-4 และ R14R-4 ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Amycolatopsis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 นอกจากนี้ ไอโซเลท R10R-1, R10R-2 และ R10R-4 ซึ่งแยกได้จากรากส้มเซ้ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC 10231 ได้อีกด้วย จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่าแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Streptomyces* sp. R3R-6 ซึ่งแยกได้จากรากของมะกรูดเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 ที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นแหล่งในการผลิตยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้

สารสกัดหยาบที่ผลิตจากแอกติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Streptomyces* sp. R3R-6 และสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *B. subtilis*

ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 และ *S. aureus* ATCC 25923 เทียบเท่ายาปฏิชีวนะมาตรฐาน chloramphenicol ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ เมื่อใช้ปริมาณของยาเท่ากันคือ 30 ไมโครกรัม และสารปฏิชีวนะที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. R3R-6 คือ สาร actinomycin D

การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Streptomyces* sp. R3R-6 เพื่อให้เชื้อสามารถผลิตสาร actinomycin D ได้ปริมาณสูง ได้แก่ ระยะเวลาในการผลิตสารปฏิชีวนะ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณสารสกัดมอลต์ และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อการผลิตสาร actinomycin D โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ คือ 7 วัน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม คือ น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และสารสกัดมอลต์ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของหัวเชื้อที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 1 โดยปริมาตร

จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า แอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชวงศ์ Rutaceae เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

#### ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

- งานวิจัยเสร็จล่าช้าเกินกว่าระยะเวลาที่กำหนดมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย โดยมีปัจจัยสำคัญคือ แอคติโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์เป็นแบคทีเรียที่ต้องคัดแยกจากเนื้อเยื่อพืชซึ่งทำได้ยากและเจริญได้ช้าบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้ต้องใช้ระยะเวลานานในการวิจัย และหลายครั้งมักจะปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว
- ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA บริเวณยีน 16S rRNA ไม่ประสบผลสำเร็จ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อจำแนกชนิดของแอคติโนแบคทีเรียได้ ส่งผลให้ต้องมีการสกัด DNA และทำ PCR ใหม่ซ้ำหลายๆ รอบ ทำให้ระยะเวลาในการทำวิจัยเพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดความล่าช้าในการทำวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- Anandan, R., Dharumadurai, D. & Manogaran, G. P. (2016). An introduction to actinobacteria. In: Dhanasekaran, D. & Jiang, Y. (eds). *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*. Intech, Rijeka. pp. 3–37.
- Arai, T. (1975). *Culture Media for Actinomycetes*, Tokyo, Japan: The Society for Actinomycetes.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H-P., Clement, C., Ouhdouch, Y. & Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. 80: 2–43.
- Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*. 65: 385–395.
- Caruso, M., Colombo, A. L., Fedeli, L., Pavesi, A., Quaroni, S., Saracchi, M. & Ventrella, G. (2000). Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Annals Microbiology*. 50: 3–13.
- Casqueiro, J., Casqueiro, J. & Alves C. (2012). Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 16: 27–36.
- Chase, M. W., Morton, C. M. & Kallunki, J. A. (1999). Phylogenetic relationships of Rutaceae: a cladistics analysis of the subfamilies using evidence from *rbcl* and *atpB* sequence variation. *American Journal of Botany*. 86: 1191-1199.
- Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. (1977). Distribution of menauinones in actinomycetes and corynebacteria. *Journal of general microbiology*. 100: 221–230.
- Duangmal, K., Thamchaipenet, A. Ara, I., Matsumoto, A. & Takahashi, Y. r 2008, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2439-2442.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine

- genetic relatedness among bacterial strains. *International journal of systematic bacteriology*. 39: 224 – 229.
- Gan, Y-H. (2013). Host Susceptibility Factors to bacterial infections in Type 2 Diabetes. *PLOS Pathogens*. 9(12): e1003794.
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H. & Rai, M. (2015). Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek*. 108: 267–289.
- Goodfellow, M. & Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*. 37: 189 – 216.
- Guo, X., Guan, X., Liu, C., Jia, F., Li, J., Li, J., Jin, P., Li, W., Wang, X. & Xiang, W. (2016). *Plantactinospora soyae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from soybean root [*Glycine max* (L.) Merr]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 2578–2584.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95–98.
- Inahashi, Y., Matsumoto, A., Danbara, H., Omura, S. & Takahashi, Y. (2010). *Phytohabitans suffuscus* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of the family *Micromonosporaceae* isolated from a plant root. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 2652–2658.
- Kelly, K. L. (1964). Inter-Society Color Council – National Bureau of Standards Color Name Charts Illustrated with Centroid Colors. Washington, DC: US Government Printing Office.
- Kumar. S., Stecher. G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870–1874.
- Li, J., Zhao, G. Z., Huang, H. Y., Qin, S., Zhu, W. Y., Zhao, L. X., Xu, L. H., Zhang, S., Li, W. J. & Strobel, G. (2012). Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 101: 515–527.



- Ludwig, W. & Klenk, H. P. (2005). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. & Garrity, G. M. (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn, vol 2, the Proteobacteria, part A, introductory essays. Springer, New York pp. 49–65.
- Matsumoto, A. & Takahashi, Y. (2017). Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of Antibiotics*. 70: 514–519.
- Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. & Parlett, J. H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *Journal of Microbiological Methods*. 2: 233–241.
- Mingma, R., Duangmal, K., Trakulnaleamsai, S., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A. & Takahashi, Y. (2014). *Sphaerisorangium rufum* sp. nov., an endophytic actinomycete from roots of *Oryza sativa* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64: 1077–1082.
- Mingma, R., Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Trakulnaleamsai, S., Matsumoto, A. & Takahashi, Y. (2015). *Streptomyces oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from stems of rice plant. *The Journal of Antibiotics*. 68(6): 368–72.
- Mitchell, A. M., Strobel, G. A., Moore, E., Robison, R. & Sears, J. (2010). Volatile antimicrobials from *Muscodora crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 156: 270–277.
- Niemhom, N., Chutrakul, C., Suriyachadkun, C. & Thawai, C. (2016a). *Asanoa endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of *Boesenbergia rotunda*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 1377–1382.
- Niemhom, N., Chutrakul, C., Suriyachadkun, C. & Thawai, C. (2016b). *Phytohabitans kaempferiae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the leaf of *Kaempferia larsenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66: 2917–2922.

- Praveen, V. & Tripathi, C.K.M. (2009). Studies on the production of actinomycin-D by *Streptomyces griseoruber* a novel source. *Applied Microbiology* 49 (2009): 450–455.
- Qin, S., Li, J., Chen, H-H., Zhao, G-Z., Zhu, W-Y., Jiang, C-L., Xu, L-H. & Li, W-J. (2009). Isolation diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna China. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 6176–6186.
- Rachniyom, H. , Matsumoto, A. , Indananda, C. , Duangmal, K. , Takahashi, Y. & Thamchaipenet, A. (2015a). *Actinomadura syzygii* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a jambolan plum tree (*Syzygium cumini* L. Skeels). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65: 1946-1949.
- Rachniyom, H. , Matsumoto, A. , Indananda, C. , Duangmal, K. , Takahashi, Y. & Thamchaipenet, A. (2015b). *Nonomuraea syzygii* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a jambolan plum tree (*Syzygium cumini* L. Skeels). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65: 1234–1240.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406–425.
- Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
- Sharma, M. (2014). Actinomycetes: source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(2): 801–832.
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*. 16: 313–340.
- Staneck, J. L. & Robert, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology*. 28: 226–231.

- Suriyachadkun, C., Chunhametha, S., Thawai, C., Tamura, T., Potacharoen, W., Kirtikara, K. & Sanglier, J. (2009). *Planotetraspora thailandica* sp. nov., isolated from soil in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59: 992–997.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673–4680.
- Uchida, K. & Aida, K. (1984). An improved method for the glycolate test for simple identification of the acyl type of bacterial cell walls. *Journal of General and Applied Microbiology*. 37: 463–64.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. et al. (1987). International committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematic. *International journal of systematic bacteriology*. 37: 463–464
- Williams, S. T. & Cross, T. (1971). Chapter XI Actinomycetes. *Methods in Microbiology*. 4: 295–334.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67(5): 1613–1617.
- Zhang, X. Ren, K. Du, J. Liu, H. & Zhang, L. (2014). *Glycomyces artemisiae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of *Artemisia argyi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64: 3492–3495.
- Zhao, K., Penttinen, P., Guan, T., Xiao, J., Chen, Q., Xu, J., Lindström, K., Zhang, L., Zhang, X., Strobel, G. A. (2011). The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau China. *Current Microbiology*. 62: 182–190.

- Zhao, S., Liu, C. Zheng, W., Ma, Z., Cao, T., Zhao, J. Yan, K., Xiang, W. & Wang, X. (2017). *Micromonospora parathelypteridis* sp. nov., an endophytic actinomycete with antifungal activity isolated from the root of *Parathelypteris beddomei* (Bak.) Ching. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67: 268–274.
- Zhao, G-Z., Li, J., Qin, Y-L., Miao, C-P., Wei, D-Q., Zhang, S., Xu, L-H. & Li, W-J. (2012). *Pseudonocardia antimicrobica* sp. nov., a novel endophytic actinomycete associated with *Artemisia annua* L. (sweet wormwood). *The Journal of Antibiotics* 65, 469–472

## ผลผลิต

- ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (อยู่ระหว่างดำเนินการ) จำนวน 1 เรื่อง
- ได้แอสตีโนแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่หรือสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ที่สามารถนำไปศึกษาต่อเพื่อประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรมได้
- ได้กระบวนการคัดแยกสายพันธุ์แอสตีโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ และกระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะจากแอสตีโนแบคทีเรีย
- ได้ฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของแอสตีโนแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้พืชวงศ์ Rutaceae ซึ่งเป็นองค์ความรู้พื้นฐานทางด้านจุลชีววิทยาที่สามารถนำไปต่อยอดในงานวิจัยด้านต่างๆ ทั้งด้านการแพทย์ เภสัชกรรมกรรม และการเกษตรได้
- ผลิตนักวิจัยในระดับปริญญาตรีที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญในการทำวิจัยทางด้านแอสตีโนแบคทีเรียจำนวน 1 คน