บทที่ 2
เอกสารและรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

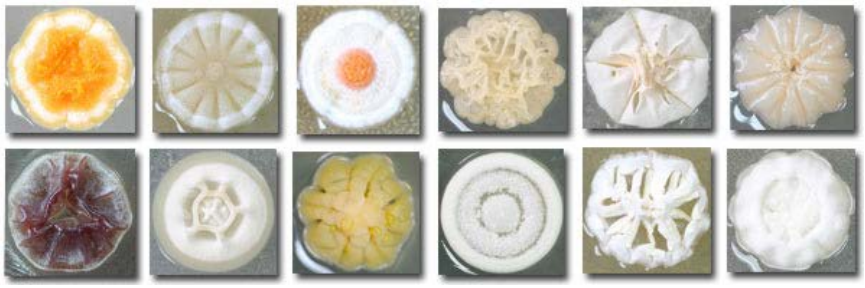
2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแอคติโนมัยสีท และการกระจายตัวในธรรมชาติ

แอคติโนมัยสีท (actinomycete) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในอันดับ (Oder) *Actinomycetales* ประกอบด้วย 8 วงศ์ (Family) ได้แก่ *Actinomycertaceae, Mycobacteriaceae, Frankiaceae, Actinoplanaceae, Dermatophilaceae, Nocardiaceae, Streptomycetaceae* และ *Micromonosporaceae* (Kalakoutshi and Agre, 1976) โดยส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เชื้อนี้มีลักษณะทางสัณฐานทางวิทยาที่หลากหลาย มีตั้งแต่เป็นทรงกลม ท่อน และเป็นเส้นสาย คล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนง และมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศ หรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในเชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นส่วนใหญ่ เชื้อกลุ่มนี้สวนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรียกินซาก (saprophyte) ที่มีความสำคัญในการย่อยสลายอินทรียสาร สามารถย่อยสลายเคอราติน ไคติน เซลลูโลส และแป้ง และเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่ผลิตสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรีย เชื้อรา เป็นสารต่อต้านมะเร็ง สารกดระบบภูมิคุ้มกัน สารฆ่าแมลง และสารปราบวัชพืช เป็นต้น (Goodfellow *et al*., 1988)

เชื้อแอคติโนมัยสีทในดินส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่มของสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัว และความหนาแน่นมากที่สุด เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะสร้างเส้นใยอาหารที่แตกกิ่งก้าน อาจเป็นท่อนฝังลงในเนื้อวุ้น และสร้างเส้นใยอากาศที่ประกอบด้วยสายสปอร์รูปแบบต่างๆ ถ้าจำนวนสปอร์มากพอจะเป็นสายสปอร์เป็นแบบเส้นตรง (rectiflexibile) รูปลูป (rectinaculiaperti) หรือบิดเป็นเกลียว (spiral) บางสายพันธุ์อาจมีลักษณะโคโลนีเป็นแบบแผ่นกระจาย (discrete) คล้ายไลเคนแข็งคล้ายแผ่นหนัง หรือคล้ายเนยเหลว ผิวโคโลนีมีลักษณะเรียบหรือขรุขระ มีหลายสี ได้แก่ ขาว เทา แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน ดังภาพที่ 2 ส่วนเส้นใยอาหารที่ด้านล่างของโคโลนีมักมีสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ แต่ก็อาจพบสีอื่นๆ เช่นเดียวกันสีสปอร์ได้ ในการเจริญระยะแรก โคโลนีจะมีผิวเรียบ ต่อมาจะพัฒนาเส้นใยอากาศจนปรากฏเป็นกลุ่มก้อนคล้ายแป้งหรือกำมะหยี่ เชื้อแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่มีปริมาณเบสกวานีน (guanine) และไซโทซีน (cytosine) ในเซลล์มากกว่า 55% สกุลที่มีการศึกษาทางพันธุศาสตร์มากที่สุดคือ *Streptomyces* ซึ่งพบว่ามีโครงสร้าง

ของโครโมโซมเป็นเส้นตรง และมีขนาดของจีโนมประมาณ 7.8-8.0 เมกะเบส ซึ่งประกอบเบสกวานีนและไซโทซีนในอัตราที่สูง ประมาณ 70-74 % (Williams, 1989)

นอกจากนี้ยังมีแอคติโนมัยสีทกลุ่มอื่นเรียกว่า non-streptomycete ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่หายาก มีอยู่ประมาณ 100 สกุล มีความหลากหลายทางด่านรูปร่าง นิเวศวิทยา และสายวิวัฒนาการ (Miyadoh, 1997) แอคติโนมัยสีทชนิดอื่นๆ ที่จัดว่าเป็นแอคติโนมัยสีทที่หายาก เช่น *Micromonospora, Microtetraspora, Microbispora, Streptosporangium, Actinomadura, Nocardia, Dectylosporangium* และ *Actinoplanes* เป็นต้น



ภาพที่ 2.1 ตัวอย่างโคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดิน

ที่มา: Mahidol and Osaka University Collaborative Research Center for Biosciences and Biotechnology

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเชื้อในกลุ่มที่หายากนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะค้นหาสารปฏิชีวนะหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ (Lazzarini *et al*., 2000) ประชากรของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่พบในดินเป็นเชื้อในกลุ่มของ *Streptomyces* ประมาณ 96 % รองลงมาเป็น *Nocardia* 2 % และอันดับสาม คือ *Micromonospora* 1 % ส่วนสกุลอื่นๆ จะพบน้อยกว่า 1% (Kim, 1992)

มีการแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินบริเวณต่างๆ ของมณฑลยูนนาน ประเทศจีน ได้ 29 สกุล โดยตัวอย่างดินในเขตร้อนชื้นพบเชื้อในสกุล *Streptomyces* ประมาณ 86 % ของจำนวนแอคติโนมัยสีทในดิน และพบแอคติโนมัยสีทสกุลที่หายากอีก 10 สกุล สำหรับตัวอย่างดินในเขตร้อนชื้นและกึ่งร้อนชื้น พบว่ามีความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทมากกว่าเขตอบอุ่นที่เป็นภูเขา และมีหิมะปกคลุม โดยตัวอย่างดินจากภูเขาและบริเวณที่มีหิมะปกคลุมจะมีปริมาณของเชื้อสกุล *Streptomyces* สูงถึง 98 % และยังพบว่าดินในป่าซึ่งสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ถึง 9 สกุล มีความ

หลากหลายของเชื้อมากกว่าดินในเขตที่ทำการเกษตร ซึ่งแยกเชื้อได้เพียง 6 สกุล นอกจากนั้นยังพบว่าจำนวนแอคติโนมัยสีทจะลดลงเมื่อความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลง (Xu *et al*., 1996)

สำหรับการกระจายตัวของแอคติโนมัยสีทในดินบริเวณป่าชายเลนพบว่า ปริมาณเชื้อในดินป่าชายเลนอยู่ระหว่าง 10^3-10^4 เซลล์ต่อดินแห้ง 1 กรัม โดยพบสกุล *Micromonospora* สูงที่สุด ประมาณ 55 % รองลงมาเป็น *Streptomyces* ประมาณ 33 % และยังมีแอคติโนมัยสีทสกุลอื่นๆ เช่น *Actinomadura, Microtetraspora, Microbiospora, Streptosporangium* และ *Actinoplanes* เป็นต้น (Hatano, 1997) นอกจากนั้นยังมีรายงานการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากป่าชายเลน จากตัวอย่างดินในประเทศไทย ซึ่งสามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 14 สกุล เป็นจำนวน 151 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้ 95 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และ 27 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* ได้ (รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2541) ส่วนการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลนเขตชายฝั่งตะวันออกของประเทศไทย พบว่า *Actinomadura* เป็นแอคติโนมัยสีทที่พบมากที่สุด รองลงมาเป็น *Streptocycetes* และยังพบสกุลที่หายากอีกหลายสกุล และยังมีรายงานการศึกษาการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากแหล่งดินชายทะเลในประเทศไทยจำนวน 200 ตัวอย่าง พบว่าแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เป็น *Streptomyces, Micromonospora* และ *Rhodococcus* (วชิร ใจภักดี, 2544)

2.2 ความสามารถและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญ ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา รวมถึงยาต้านไวรัส ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และเภสัชกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถผลิตสารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็งและสารกดภูมิคุ้มกัน

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยสีทสกุล *Streptomyces* หลายชนิด ได้แก่ ampicillin และ penicillin-N ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนั้น *S. clavuligerus* สามารถผลิต clavams มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบตาแลคตาเมสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย staphylococci และแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน streptomycin ที่ผลิตโดย *S. griseus* และ neomycin ที่ผลิตโดย *S. fradiae* ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด (Goodfellow *et al*., 1988; Lazzarini *et al*., 2000)

จากฐานข้อมูลของ Antibiotic Literature Database (ABL) รายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างโดยจุลินทรีย์ทั้งหมด 23,000 ชนิด พลว่ามาจากเชื้อรา 42 % *Streptomyces* 32.1 % แบคทีเรียอื่นๆ 10.8 % และแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากอีก 15.1 % ถ้าพิจารณาเฉพาะสารต่อต้านจุลชีพที่มีอยู่ประมาณ 8,000 ชนิด จะพบว่าผลิตจาก *Streptomyces* 45.6 % เชื้อรา 21.5 % แบคทีเรีย 16.9 % และแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่หายากอีก 16 % (Lazzarini *et al*., 2000)

มีการใช้แอคติโนมัยสีทควบคุมเชื้อก่อโรคในพืช ตัวอย่างเช่น การใช้ *Streptomyces lydicus* WYEC108 สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่มีสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมราก่อนโรคพืชอย่างกว้างขวาง นอกจากเอนไซม์ไคติเนสแล้ว เชื้อชนิดนี้ยังสามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับราก และเมล็ดของพืช (Mahadevan and Crawford, 1997)

จากการศึกษา *Streptomyces* ที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืชในกลุ่ม alfalfa สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ป้องกันการเกิดโรคใบจุดของพืชในกลุ่มนี้ และมีการนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชอื่นๆได้เช่นกัน (Samac *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า *Streptoverticillium albireticculi* ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อราก่อโรคที่อยู่ในดิน เช่น *Zhizoctonia solani, Phytopthora cinnamomi* และ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น (Park et al., 2002) ในขณะที่วชิรและคณะ (2544) คัดแยกแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อ *Colletorichum* ซึ่งเป็นราก่อโรค anthracnose ในพืช พบแอคติโนมัยสีทที่มีคุณสมบัติดังกล่าว 9 สายพันธุ์ ซึ่งทั้งหมดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces*

Fguira และคณะ (2004) พบแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใหม่ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่ามีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Streptomyces reseoflavus* และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 ชนิด จัดอยู่ในกลุ่ม macrolide ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อรา

Sujatha และคณะ (2004) พบสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyketide ที่ผลิตโดย *Streptomyces psammoticus* BT-408 ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา รวมทั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin

เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถเจริญและสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน จากรายงานพบว่าแหล่งของสารอาหารที่เป็นที่นิยมใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส แป้ง กลีเซอรอล, แหล่งไนโตรเจน เช่น แอสพารากีน, ถั่วเหลือง, yeast extract, เปปโตน, แหล่งของแร่ธาตุอื่นๆ เช่น โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคาร์บอร์เนต แมกนีเซียมซัลเฟต, โพแพสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นต้น (Kala and Chandrika, 1993)

Vasavada และคณะ (2006) ศึกษา *S. sannanensis* strain RJT-1 พบว่าสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี เมื่อศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่ผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ ทดสอบโดยการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร nutrient agar, starch agar, gelatin agar และ actinomycete agar ที่มี NaCl ร้อยละ 5 พบว่าการเลี้ยงบน starch agar มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อชนิดนี้ได้ดี นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม พบว่า กลูโคสและแลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารปฏิชีวนะ และศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่า inorganic nitrogen ได้แก่ โซเดียมซัลเฟต โซเดียมซิเตรต และยูเรีย จะให้ผลต่อการเจริญและผลิตสารได้ดีกว่าพวก organic nitrogen

วรณิมา ชุดพิมาย และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล (2552) พบว่า *Streptomyces*-87 เพิ่มปริมาณได้ดี และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* 2 ไอโซเลต ได้กว้างมากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร corn meal (1.44 กรัม) น้ำหนักแห้ง/ 100 มล. มีความกว้างของวงใสที่ยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* แต่ละไอโซเลต เป็น 20 มม.และ 24.5 มม.) และอาหาร oat meal (1.46 กรัมน้ำหนักแห้ง/ 100 มล. ความกว้างของวงใส 17 มม. และ 24.5 มม.) อาหาร YEME เชื้อ *Streptomyces*-87 เพิ่มปริมาณได้ดีมาก (1.53 กรัมน้ำหนักแห้ง/ 100 มล.) แต่ความกว้างของวงใสแคบกว่า (14.5 มม. และ 16 มม.) ในอาหาร AGMB เชื้อเพิ่มปริมาณได้ในระดับต่ำกว่า (1.34 กรัมน้ำหนักแห้ง/ 100 มล.) แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ดีกว่าการเลี้ยงในอาหาร YEME (15.5 มม. และ 22 มม.) ส่วนใน sporulation medium ได้ปริมาณเชื้อต่ำสุด (1.22 กรัมน้ำหนักแห้ง/100 มล.) แต่ยังคงยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้ชัดเจนมีความกว้างของวงใส 13 มม.และ 21 มม. ตามลำดับ เชื้อ *Streptomyces*-87 เพิ่มปริมาณได้ดีมากที่สุดในน้ำมะพร้าวแก่ผสมรำละเอียด 5% (1.62 กรัมน้ำหนักแห้ง/ 100 มล.) แต่ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. solanacearum* ลดลงอย่างชัดเจน ส่วนใน mollase ผสมรำละเอียด 5% เชื้อ *Streptomyces*-87 เพิ่มปริมาณได้ดี (1.31 กรัมน้ำหนักแห้ง/100 มล.) แต่ไม่ยับยั้งเชื้อโรคเป้าหมาย ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเลือกเป็นอาหารเพิ่มมวลเชื้อ *Streptomyces*-87 คือ อาหาร corn meal

แอคติโนมัยสีทเป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ และการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นอัตราการให้อากาศจึงมีผลต่อการเจริญและผลิตสารปฏิชีวนะ จากรายงานพบว่าอัตราการให้อากาศจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ 2 อย่างคือ อัตราส่วนอาหารต่อปริมาตรภาชนะบรรจุ โดยส่วนใหญ่แล้วอัตราส่วนนี้จะอยู่ระหว่าง 1:2.5 – 1:5 และความเร็วรอบในการเขย่า โดยมีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 90-400 รอบต่อนาที (Stritzke *et al*., 2004; Cai *et al*., 2005)

แอคติโนมัยสีทสามารถเจริญได้ดีในพีเอชที่เป็นกลาง พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 6 – 8 เมื่อพีเอชต่ำกว่า 6 มีผลทำให้โคโลนีมีขนาดเล็กลง และไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง นอกจากนั้นยังสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 10 - 60 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิคือ 26 - 28 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shik และคณะ (2000) ที่รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Streptomyces* sp. NS13239 คือ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ความเข้มข้นของ NaCl 3% ซึ่งทำให้เชื้อนี้มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดี โดยเฉพาะ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) แต่ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์พวกยีสต์และราได้

Katzer และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตการทุติยภูมิของเชื้อแอคติโนมัยสีท 3 สายพันธุ์ พบว่าระยะในการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตสารคือ 7-7.6 วัน อัตราเร็วในการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะคือ 180-240 รอบต่อนาที