บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จำนวน 3 จุด ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร 3 ชนิด คือ SCA OMA และ HVA โดยทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินที่เตรียมด้วยวิธีการต่างๆ 3 วิธี คือ การเจือจางตัวอย่างด้วย yeast extract เข้มข้น 6% และ SDS เข้มข้น 0.05% การเจือจางตัวอย่างด้วย phenol ความเข้มข้น 1.5% และการอบตัวอย่างดินที่อุณหภูมิ 120 ^{o}C นาน 1 ชั่วโมง พบว่าจำนวนแอคติโนมัยสีทที่นับได้จากดินบริเวณฟาร์มโคนมอยู่ระหว่าง 1×10^{4} ถึง 2.2×10^{5} CFU/กรัม ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของกิตฑามาศและคณะ (2550) ทำการแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทจากดินถ่ำจากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท โดยการใช้วิธี dilution plate technique บนอาหาร SCA จากผลการทดลองแสดงว่าแอคติโนมัยสีทสามารถเจริญได้บนอาหารชนิดนี้ จากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินทั้ง 6 จุด จำนวน 90 ไอโซเลท โดยเลือกจากดินบริเวณนาข้าวข้างหอพักอินทนิล 25 ไอโซเลท แปลงทดลองข้างตึกโดม 18 ไอโซเลท ฟาร์มโคนม 7 ไอโซเลท บริเวณตึกโดม 31 ไอโซเลท บริเวณป่าข้างตึกวิทยบริการ 5ไอโซเลท และดินจากแปลงนาข้าวบริเวณตึกโดม 4 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยวิธี cross streak โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่เป็น clinical strains 6 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa, S. aureus, A. baumannii, E. coli,* CoNS และ *K. pneumoniae* และเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เป็น lab strains 5 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa, S. aureus*, *Salmonella* sp., *B. cereus*, *Klebsiella* sp. และยีสต์ 1 ชนิด คือ *S. cerevisiae* จากการทดสอบพบว่า แอคติโนมัยสีทจำนวน 61 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้อย่างน้อยที่สุด 1 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 67.8 โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เป็น clinical strains แกรมบวก 24 ไอโซเลท (34%) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 25 ไอโซเลท (35%) และไม่ยับยั้ง 22 ไอโซเลท (31%) และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เป็น lab strains แกรมบวก 21 ไอโซเลท (35%) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 10 ไอโซเลท (17%) ยับยั้งยีสต์ 3 ไอโซเลท (5%) ไม่ยับยั้ง 11 ไอโซเลท (18%) และไม่ได้ทำการทดสอบ 15 ไอโซเลท (25%) เมื่อนำแอคติโนมัยสีทดังกล่าวบางสายพันธุ์ ไปเลี้ยงในอาหารเหลว 2 ชนิดคือ YM broth และ Bennet's broth แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี disc diffusion โดยการทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบที่เป็น clinical strains 6 ชนิด คือ *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *A.*

baumannii *E. coli* CoNS และ *K. pneumoniae* และเชื้อทดสอบที่เป็น lab strains 5 ชนิด ได้แก่ *P. aeruginosa* *S. aureus* *Salmonella* sp. *B. cereus* และ *K. pneumonia* และยีสต์ 1 ชนิด ได้แก่ *S. cerevisiae* พบว่าเฉพาะแอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM broth เท่านั้นที่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ และยับยั้งได้เฉพาะ *S. aureus* ชนิดเดียวเท่านั้น ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญในแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น โดยยับยั้ง *S. aureus* ที่เป็น clinical strains จำนวน 12 ไอโซเลท และยับยั้ง *S. aureus* ที่เป็น lab strains จำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งผลไม่สอดคล้องกับการทดสอบโดยวิธี cross streak ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุมาจากการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทำที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการทดลอง จึงทำให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากกว่าความเป็นจริง ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบอีกแบบ คือ agar plug และทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทดสอบกับแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* จากการทดสอบพบว่าแอคติโนมัยสีทสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ จำนวนไอโซเลทคิดเป็น 61% ของปริมาณเชื้อแอคติโนมัยสีทที่นำมาทดสอบ ซึ่งไอโซเลท BB1-11 และ 8/5 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิดได้ดีที่สุด คิดเป็น 2% ของเชื้อที่นำมาทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของรัชนี (2552) ซึ่งนำแอคติโนมัยสีทมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบซึ่งได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas campestris* pv. *glycine* บนอาหาร ISP2 ด้วยวิธีราดทับ พบว่ามีแอคติโนมัยสีทจำนวน 233 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 73.5% สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

จากการนำแอคติโนมัยสีทจำนวน 75 ไอโซเลท ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราด้วยวิธี dual culture พบว่าการยับยั้งเชื้อราทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยเปรียบเทียบค่าการยับยั้งกับชุดควบคุม โดยใช้เกณฑ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้มากกว่าร้อยละ 50 พบว่า มีจำนวน 6 ไอโซเลท (8%) ของแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบทั้ง 4 ชนิด 17 ไอโซเลท (22.7%) สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ 3 ชนิด 14 ไอโซเลท (18.7%) สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ 2 ชนิด 29 ไอโซเลท (38.7%) สามารถยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ 1 ชนิด และ 9 ไอโซเลท (12%) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของศิริภรณ์ (2550) ทำการคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากดินในจังหวัดต่างๆได้ 115 ไอโซเลท และทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้ 66% และไอโซเลทที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้คิดเป็น 33.04%

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคได้แก่ไอโซเลท IN2-11, P1-1, P1-2, P1-10 และ8/5 ด้วยตัวทำละลายเอทิลอาซิเตต แล้วทำ

การระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) จนตัวทำละลายแห้งทำการชั่งน้ำหนัก และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ*E. coli* ด้วยวิธี disc diffusion method พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลท P1-2 สามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้ ซึ่งมีขนาดของวงใสในการยับยั้งเท่ากับ 17.5 มิลลิเมตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปหาค่า MIC ต่อเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี Broth microdilution พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลท P1-1, P1-2 และ 8/5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ที่ระดับความเจือจาง 1:4 และการทดสอบการยับยั้งของสารสกัดหยาบต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Agar well พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลท IN2-11/1, P1-2, P1-1/1 และ8/5 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ซึ่งมีขนาดของวงใสที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* เป็น 14.8, 11.7, 8.4 และ7.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วย 3 วิธีข้างต้นสารสกัดที่สกัดได้สามารถยับยั้งเฉพาะเชื้อ *B. cereus* เพียงชนิดเดียวซึ่งไม่สอดคล้องกับณัฐชัย (2550) สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 77 สายพันธุ์จากดิน และทรายตัวอย่างจากบริเวณชายหาด และป่าชายเลน 4 จังหวัดในประเทศ เมื่อนำมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนที่แยกได้ พบว่าส่วนของสารที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus, S. aureus* และ *P. aeruginosa* เนื่องจากตัวทำละลายเอทิอาซิเตตที่ใช้ในการสารสกัดสำหรับการทดลองนี้ไม่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ จึงทำให้สารสกัดที่สกัดได้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa, S. aureus* และ *E. Coli* ได้ จึงควรจะใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น ที่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่นนอกจากเชื้อ *B. cereus* และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากไอโซเลท IN2-11/1, P1-2,P1-1/1 และ 8/5 ด้วยวิธี disc diffusion method เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทดสอบของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอาซิเตต พบว่าสารสกัดที่สกัดได้จากเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท P1-10 สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้เพียงชนิดเดียว ซึ่งจากรายงานการวิจัยของสุทธิ์นัน (2551) เมื่อนำสารสกัดหยาบจากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CMU-PA101 ในอาหารเหลวมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิดได้แก่ hexeane, diethyl ether, ethyl acetate, chloroform และ butanol พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายดังกล่าวสามรถยับยั้งเชื้อราก่อโรคทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพดี โดยเฉพาะสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ butanol สามารถยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

จากการจัดจำแนกแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากดินตัวอย่าง โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่น ลักษณะสีโคโลนี สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และการสร้างสารสีบนอาหาร ISP2 สามารถจัดกลุ่มได้ออกเป็น 12 กลุ่ม ซึ่งค่อนข้างน้อยกว่ารายงานการวิจัยของ รัชนี (2552) ที่

คัดแยกแอคติโนมัยสีทจากรากและดินรอบรากพืชตระกูลถั่วพบว่าเมื่อจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ตามสีสปอร์ สีเส้นใยอาหารและความสามารถในการสร้างสารสีบนอาหาร ISP 3 พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 71 กลุ่ม ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่ความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทในดินตัวอย่างของมหาวิทยาลัยทักษิณ มีความหลากหลายน้อยกว่าดินที่เก็บจากบริเวณรากของพืช จากนั้นนำแอคติโนมัยสีทบางสายพันธุ์ ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชในระดับที่สูงกว่าร้อยละ 50 เพื่อจัดจำแนกชนิดของแอคติโนมัยสีทดังกล่าวโดยศึกษาลักษณะของสปอร์ด้วยวิธีการใช้เทคนิคการปักกระจกปิดสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า สปอร์มีลักษณะกลม ผิวเรียบ เรียงตัวเป็นกลุ่ม และเป็นเส้นสายคล้ายลูกโซ่ กระจัดกระจายอยู่ตามเส้นใย จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคการปักกระจกปิดสไลด์ลักษณะดังกล่าวน่าจะเป็นแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนก จึงต้องทำการจัดจำแนกด้วยวิธีอื่น จึงต้องใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจัดจำแนก โดยการนำแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือก มาเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยนำไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบจำนวน 20 ไอโซเลท นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อเป็น template DNA ในการทำ PCR ด้วยวิธีการต้ม โดยใช้ยูนิเวอร์ซัลไพรเมอร์ 27F และ1525R สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นDNA บริเวณ 16S rDNA พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.4 kb จำนวน 8 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ40 จากนั้นจะนำ PCR products ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์และจะส่งไป วิเคราะห์หาลำดับเบส แล้วนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับข้อมูล 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในฐานข้อมูล Genbank เพื่อหาชนิดของแอคติโนมัยสีทดังกล่าว การที่บางไอโซเลตให้ผล PCR เป็นลบอาจเนื่องมาจากสาเหตุจากการเตรียม DNA Template ได้ไม่เหมาะสม ซึ่งอาจจะต้องใช้วิธีอื่นในการสกัด DNA สำหรับไอโซเลทดังกล่าว เช่น การใช้ไนโตรเจนเหลวในการบดเซลล์ เป็นต้น วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยการนำเซลล์ไปต้มก็เป็นวิธีที่ได้ผลในระดับหนึ่งซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและค่าใช้จ่ายน้อย โดยมีการรายงานผลจากงานวิจัยของ Andrew (2003) และคณะ ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแอคติโนมัยสีทโดยการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนอาหารเหลว ISP1 และนำเซลล์ไปต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียสและนำเซลล์ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค RCR พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ ดังนั้นแสดงว่าวิธีการนำเซลล์ไปต้มสามารถสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำไปเพิ่มจำนวนได้ แต่อาจจะไม่เหมาะสมสำหรับแอคติโนมัยสีทบางสายพันธุ์ ซึ่งไอโซเลทที่ PCR ให้ผลลบ อาจจะมีสาเหตุจากการที่สายพันธุ์เหล่านั้นมีองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ที่ซับซ้อน ทำให้มีความแข็งแรงมากกว่าปกติ

ข้อเสนอแนะ

1. ปัจจัยในการเจริญและการสร้างสารต้านจุลชีพของแอคติโนมัยสีทมีหลายประการ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ฯลฯ ดังนั้นควรมีการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมในการสร้างสารต้านจุลชีพ
2. ควรมีการวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ว่าเป็นแบบ *LL*-DAP หรือ *meso*-DAP ด้วยวิธี thin layer chromatography
3. ในการสกัดสารสกัดหยาบ ควรใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ นอกจากสารละลาย Ethyl acetate เช่น *n*-hexeane, Diethyl ether, Chloroform, Hexane และ Ethanol เป็นต้น
4. ควรนำ PCR product ของยีน 16S rRNA ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อต่อไป