

## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากตัวอย่างดินจากเกาะตะรุเตา เกาะอาดัง และ เกาะราวี จำนวน 20, 10 และ 10 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหาร Glucose Yeast extract Malt agar (GYM) ที่เติมยาปฏิชีวนะ cycloheximide 50 µg/ml และ nalidixic acid 20 µg/ml สามารถแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากหมู่เกาะตะรุเตาทั้งหมด 306 ไอโซเลท โดยแยกเชื้อจากเกาะตะรุเตาได้ 148 ไอโซเลท โดยเมื่อทำการวัดค่าพีเอช ของดินอยู่ระหว่าง 4.16 - 8.12 แยกเชื้อจากเกาะอาดังได้ 60 ไอโซเลท ค่าพีเอชของดิน อยู่ระหว่าง 4.57 - 8.09 แยกเชื้อจากเกาะราวีได้ 98 ไอโซเลท ค่าพีเอชของดินอยู่ ระหว่าง 4.99 - 7.75

เมื่อทำการตรวจนับปริมาณของเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากตัวอย่างต่างๆ บน อาหาร GYM agar ที่เติมยาปฏิชีวนะ สามารถแยกเชื้อสเตรปโตมัยซีทจากเกาะตะรุเตา อยู่ในช่วง  $0.2 \times 10^3 - 8.0 \times 10^4$  CFU/g ของดิน เกาะอาดังจำนวนเชื้อสเตรปโตมัยซีท อยู่ในช่วง  $2.0 \times 10^3 - 2.6 \times 10^4$  CFU/g ของดิน และเกาะราวีจำนวนเชื้อสเตรปโตมัยซีท อยู่ในช่วง  $1.6 \times 10^3 - 4.0 \times 10^4$  CFU/g ของดิน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของดิน ค่า พีเอชและจำนวนเชื้อสเตรปโตมัยซีทที่แยกได้ พบว่าเกาะตะรุเตาบริเวณเก็บตัวอย่างจุดที่ 3, 4, 12, 17 และ 26 สามารถแยกเชื้อได้ 17, 26, 15, 10 และ 54 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งค่าพีเอชของดินอยู่ระหว่าง 4.82 - 6.47 เกาะอาดังบริเวณเก็บตัวอย่างจุดที่ 1 และ 11 สามารถแยกเชื้อได้ 17 และ 14 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งค่าพีเอชของดินเท่ากับ 5.27 และ 4.57 ตามลำดับ และเกาะราวีบริเวณเก็บตัวอย่างจุดที่ 3, 4, 5, 8 และ 10 สามารถแยกเชื้อได้ 13, 29, 14, 11 และ 10 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งค่าพีเอชของดิน อยู่ระหว่าง 5.06 - 7.75 โดยลักษณะของดินส่วนใหญ่เป็นดินร่วน หรือดินร่วนปนทราย ที่มีเศษใบไม้ปกคลุมซึ่งเป็นแหล่งของสารอินทรีย์วัตถุเหมาะแก่การเจริญของเชื้อ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายสปอร์ด้วยเทคนิค slide culture ตรวจดูลักษณะของเส้นใยและสายสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของสายสปอร์ 3 แบบ คือ แบบที่ 1 Rectiflexibiles ซึ่งลักษณะของสายสปอร์เป็นแบบปลายตรง (straight) จนถึงคดงอเล็กน้อย (flexuous) แบบที่ 2 Retinaculiaperti ลักษณะของสายสปอร์เป็นรูป

ตะขอ (hook) จนถึงม้วนเป็นห่วง (loop) และแบบที่ 3 Spirales ลักษณะของสายสปอร์ เป็นเกลียว (spiral) โดยเชื้อบางไอโซเลทมีการสร้างสายสปอร์ได้มากกว่าหนึ่งแบบ

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Oatmeal agar slant พบว่าเชื้อสามารถผลิตเม็ดสีได้หลากหลาย โดยเชื้อที่แยกได้จากเมื่อทำการจัดกลุ่มสีที่แพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ สีน้ำตาล สีเหลือง สีชมพู สีเขียว-ดำ และไม่ผลิตเม็ดสี เมื่อทำการจัดกลุ่มสีของสปอร์สามารถแบ่งเป็น 8 กลุ่ม คือ สีขาว สีน้ำตาล สีเหลือง สีเขียว สีแดง สีดำ สีฟ้า และสีเทา แม้ว่าสีของแอกติโนมัยซีทที่เจริญบนจานอาหารนั้นจะสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของอาหาร ตามการเปลี่ยนแปลงของ pH และตามอายุของเชื้อที่มากขึ้นได้ อย่างไรก็ตามการพิจารณาสีของสปอร์แอกติโนมัยซีทก็ยังคงมีความสำคัญ ความหลากหลายของสเตรปโตมัยซีท ที่พบจากการสังเกตสีของสปอร์ และลักษณะรูปร่างของเส้นใยและสายของสปอร์ แม้ว่าหลายไอโซเลท จะมีลักษณะของเส้นสายสปอร์ที่เป็นชนิดบิดเป็นเกลียว (spiral) หรือชนิดเส้นตรง (rectiflexibile) เป็นลักษณะคล้ายห่วง (loop) หรือเป็นสายยาวและม้วนเป็นเกลียวที่ปลาย 1-2 รอบ (retinaculiaperti) ก็พบว่ามีลักษณะความยาวของสายสปอร์ จำนวนรอบของการม้วนเกลียว หรือ ลักษณะที่แตกออกจากเส้นใย รวมทั้งลักษณะการแตกแขนงของเส้นใยที่แตกต่างกัน นับว่าการค้นพบครั้งนี้ มีความหลากหลายมากกว่ารายงานของรัตนภรณ์ (2541) ที่ทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดินเลน จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา พังงา จากดิน 84 ตัวอย่าง พบสเตรปโตมัยซีท 21 ไอโซเลท แต่ความหลากหลายของสายพันธุ์จะน้อยเมื่อเทียบกับงานทดลองของ Saadoun และ Al-Momani (1997) ที่ทำการสำรวจหาสายพันธุ์ของสเตรปโตมัยซีทจากดินสวนป่าทางเหนือของประเทศจอร์แดนพบสเตรปโตมัยซีท 339 สายพันธุ์จากดิน 45 ตัวอย่าง ในขณะที่การศึกษาของ Sahin และ Ugur (2003) ในประเทศตุรกีได้รายงานว่ามีสเตรปโตมัยซีทเพียง 74 ไอโซเลทจากดินที่นำมาแยกเชื้อ 46 ตัวอย่าง ความหลากหลายของจำนวนที่แตกต่างกันนี้เนื่องมาจากองค์ประกอบทางกายภาพของดินในแต่ละพื้นที่คือ ปริมาณสารอินทรีย์และความอุดมสมบูรณ์ของดิน ความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิและความชื้น ตลอดจนวิธีการแยกเชื้อที่แตกต่างกัน จากรายงานของ Williams และคณะ (1989a) พบสเตรปโตมัยซีทที่เป็นพวกชอบอุณหภูมิสูงปานกลาง ส่วนใหญ่พบหนาแน่นในดินที่มีปริมาณสารอินทรีย์มาก และความเป็นกรดเป็นเบสอยู่ระหว่าง 6.5-8.0 สเตรปโตมัยซีทบางสายพันธุ์อาจจะไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ใช้แยกเชื้อ รวมทั้งทุกขั้นตอนของการแยกเชื้อจะใช้วิธีสุ่มโดยตลอด ทำให้บางครั้งไม่พบแบคทีเรียที่ต้องการขึ้นบนจานเพาะเชื้อเลย อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้เหล่านี้ นับเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญที่จะนำไปสู่การค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในขั้นตอนต่อไป จากการศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าเชื้อเจริญที่อุณหภูมิ

20, 28 และ 37°C ซึ่งจัดเป็นเชื้อพวก mesophile แต่บางไอโซเลทก็ได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45°C ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อ เพื่อหา isomer ของ diamonopimelic acid ซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวที่สามในองค์ประกอบของเปปติโดไกลแคน พบว่าเป็นแบบ LL-DAP isomer ซึ่งเป็นการยืนยันคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นประการหนึ่งของเชื้อจุลินทรีย์แตรปโตมัยซีท ซึ่งถ้าหากไม่ใช่ LL-DAP isomer ก็ถือว่าเชื้อดังกล่าวไม่ใช่แตรปโตมัยซีท แต่ถ้าหากพบว่าเป็น LL-DAP isomer ก็ต้องทำการพิสูจน์คุณสมบัติอื่นต่อว่าใช่แตรปโตมัยซีทหรือไม่ เช่นพบไกลซีน ส่วนรูปแบบของชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์นั้นไม่ได้กำหนดชนิดที่แน่นอน (Williams *et al.*, 1989)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา การผลิตเม็ตดี และการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแตรปโตมัยซีท นำผลการทดสอบมาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติตามหลักการของ Numerical taxonomy โดยใช้ Simple matching coefficient ซึ่งทำการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกัน (% similarity) โดยใช้คุณสมบัติที่เป็นผลลบและผลบวกมาทำการวิเคราะห์ จากข้อมูล % similarity ที่ได้นำมาทำการจัดกลุ่ม แสดงผลเป็น dendrogram โดยใช้ Unweighted pair group method with arithmetic averages algorithm (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYS pc 2.1 ซึ่งผลที่ได้จะช่วยในจัดกลุ่มเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันเข้าด้วยกัน และแยกจากกลุ่มเชื้อที่มีความแตกต่างกัน ออกมาอย่างชัดเจน จากเชื้อแต่ละกลุ่มสามารถทำการหาตัวแทนของกลุ่มได้อย่างถูกต้อง เพื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทำให้ทราบถึงสปีชีส์ของเชื้อที่ค้นพบในหมู่เกาะตะรุเตาที่ทำการศึกษา

จากผล Numerical taxonomy และ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA ของเชื้อจากเกาะอาดังมาเทียบเคียงกัน พบว่า เชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อจากเกาะอาดังมีทั้งหมด 13 สายพันธุ์ ได้แก่ *Kitasatospora sampliensis* VT-36<sup>T</sup>, *Streptomyces alanosinicus* NBRC 13493<sup>T</sup>, *Streptomyces avellaneus* NBRC 13451<sup>T</sup>, *Streptomyces cavourensis* NBRC 13026<sup>T</sup>, *Streptomyces durhamensis* NRRL B-3309<sup>T</sup>, *Streptomyces gelaticus* NRRL B-2928<sup>T</sup>, *Streptomyces griseoluteus* NBRC 13375<sup>T</sup>, *Streptomyces griseoruber* NBRC 12873<sup>T</sup>, *Streptomyces lucensis* NBRC 13056<sup>T</sup>, *Streptomyces malaysiensis* NBRC 16446<sup>T</sup>, *Streptomyces misionensis* NBRC 13063<sup>T</sup>, *Streptomyces niveiscabiei* S78<sup>T</sup> และ *Streptomyces violascens* ISP 5183<sup>T</sup>

นำผลจาก numerical taxonomy และ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA ของเชื้อจากเกาะราวีมาเทียบเคียงกัน พบว่า เชื้อที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อจากเกาะราวีมีทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces avellaneus* NBRC

13451<sup>T</sup>, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi* NBRC 12748<sup>T</sup>, *Streptomyces chromofuscus* NBRC 12851<sup>T</sup>, *Streptomyces djakartensis* NBRC 15409<sup>T</sup>, *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773<sup>T</sup>, *Streptomyces echinatus* NBRC 12763<sup>T</sup>, *Streptomyces flavidovirens* IFO 13039<sup>T</sup>, *Streptomyces gelaticus* NRRL B-2928<sup>T</sup>, *Streptomyces laurentii* LMG 19959<sup>T</sup>, *Streptomyces malachitospinus* NBRC 101004<sup>T</sup>, *Streptomyces parvulus* NBRC 13193<sup>T</sup>, *Streptomyces sanglieri* NBRC 100784<sup>T</sup>, *Streptomyces sporocinereus* NBRC 100766<sup>T</sup>, *Streptomyces violaceorubidus* LMG 20319<sup>T</sup>, *Streptomyces violascens* ISP 5183<sup>T</sup> และ *Streptomyces yatensis* NBRC 101000<sup>T</sup>

นำผลจาก numerical taxonomy และ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วน 16S rDNA ของเชื้อจากเกาะตะรุเตามาเทียบเคียงกัน พบว่าเชื้อที่มีความใกล้เคียงทั้งหมด 15 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces avellaneus* NBRC 13451<sup>T</sup>, *Streptomyces chartreusis* NBRC 12753<sup>T</sup>, *Streptomyces chromofuscus* NBRC 12851<sup>T</sup>, *Streptomyces flavidovirens* IFO 13039<sup>T</sup>, *Streptomyces griseoluteus* NBRC 13375<sup>T</sup>, *Streptomyces griseoflavus* LMG 19344<sup>T</sup>, *Streptomyces gramineus* NBRC 15420<sup>T</sup>, *Streptomyces malachitospinus* NBRC 101004<sup>T</sup>, *Streptomyces purpureus* NRRL B-5403<sup>T</sup>, *Streptomyces parvulus* NBRC 13193<sup>T</sup>, *Streptomyces carpinensis* NBRC 14214<sup>T</sup>, *Streptomyces sporocinereus* NBRC 100766<sup>T</sup>, *Streptomyces violascens* ISP 5183<sup>T</sup>, *Streptomyces hyderabadensis* OU-40<sup>T</sup> และ *Streptomyces yatensis* NBRC 101000<sup>T</sup>

เชื้อสายพันธุ์ที่พบมากกว่าหนึ่งเกาะ จำนวน 9 สปีชีส์ ได้แก่ *Streptomyces avellaneus* NBRC 13451<sup>T</sup>, *Streptomyces chromofuscus* NBRC 12851<sup>T</sup>, *Streptomyces flavidovirens* IFO 13039<sup>T</sup>, *Streptomyces gelaticus* NRRL B-2928<sup>T</sup>, *Streptomyces griseoluteus* NBRC 13375<sup>T</sup>, *Streptomyces parvulus* NBRC 13193<sup>T</sup>, *Streptomyces violascens* ISP 5183<sup>T</sup>, *Streptomyces yatensis* NBRC 101000<sup>T</sup> และ *Streptomyces malachitospinus* NBRC 101004<sup>T</sup> แต่อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อจากเกาะราวีมีความหลากหลายของเชื้อสเตรปโตมัยซีมากกว่าที่สุดคือ 16 สปีชีส์ และยังมีไอโซเลทที่คาดว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ และที่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ (14 และ 9 ไอโซเลทตามลำดับ) อย่างไรก็ตามเกาะตะรุเตาแม้ว่าสามารถระบุชนิดได้เพียง 10 สปีชีส์ แต่จำนวนของเชื้อที่คาดว่าเป็นสปีชีส์ใหม่และที่ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้อีกมีจำนวนมากกว่า (29 และ 34 ไอโซเลทตามลำดับ) ซึ่งก็เป็นความหวังต่อการศึกษาต่อไปในเรื่องของการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความแตกต่างจากที่ค้นพบมาแล้วในโลก ผล

การศึกษาในครั้งนี้ยืนยันให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อจากหมูเกาะตะรุเตาในการแสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ตัวแทน 6 ชนิด ซึ่งมีทั้งเชื้อยีสต์ แบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม และท่อน กล่าวคือจากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 306 ไอโซเลท จากทั้งสามเกาะ ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีเชื้อจำนวนมากถึง 250 ไอโซเลท คิดเป็น 81.7% ของเชื้อทั้งหมด สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยมีบางตัวสามารถยับยั้งได้มากถึง 5 ชนิด ทั้งนี้พบว่ามีจำนวน 93, 40, 70, 174, 161 และ 183 ไอโซเลท แสดงการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 90028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ตามลำดับ

ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถยืนยันได้ว่าหมูเกาะตะรุเตาเป็นแหล่งทรัพยากรจุลินทรีย์สเตรปโตมัยซีทที่ทรงคุณค่าของประเทศที่มีโอกาสและศักยภาพที่จะสร้างคุณประโยชน์ต่อมวลมนุษยชาติได้ต่อไป