

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอคติโนมัยซีส (งามนิจ นนทโส , 2537)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะกึ่งกลางระหว่างเชื้อราและแบคทีเรีย ลักษณะรูปร่างมีทั้งแบบเซลล์เดี่ยวจนถึงเป็นเส้นใยที่แตกสาขา (Branched mycelium) และเส้นใยเหล่านี้จะแตกหักเป็นท่อนๆสั้นๆ มีลักษณะคล้ายเส้นใยของเชื้อรา แต่มีขนาดเล็กกว่าคือจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.2 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดเดียวกันกับเซลล์ของแบคทีเรีย นอกจากนี้แอคติโนมัยซีส ยังสามารถขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ไม่มีเพศ (asexual spore) มีชื่อเรียกว่า conidia ได้อีกด้วย

2.1.1 ลักษณะของแอคติโนมัยซีสที่คล้ายคลึงกับพวก Fungi Imperfect

1. เส้นใยของแอคติโนมัยซีสชั้นสูงจะแตกสาขาคลายเส้นใยของเชื้อรา
2. แอคติโนมัยซีสหลายกลุ่มจะสร้างเส้นใยที่เจริญอยู่ในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งตรงปลายจะมี Conidia คล้ายกับเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา
3. การเจริญของแอคติโนมัยซีสในอาหารเหลวไม่ค่อยจะปรากฏว่าทำให้เกิดสีขุ่น (turbidity) อันเนื่องมาจากการแขวนลอยของเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวเช่น แบคทีเรีย แต่แอคติโนมัยซีสจะเจริญแบบกลุ่มก้อน
4. การเพิ่มจำนวนของแอคติโนมัยซีสจะคล้ายเชื้อรา (apically) ส่วนการเพิ่มจำนวนของพวกแบคทีเรียจะเป็นแบบทวีคูณ (exponential)

2.1.2 ลักษณะของแอคติโนมัยซีสที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรีย

1. มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกันคือจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.2 ไมโครเมตร
2. ส่วนที่ขาดเป็นท่อนๆ (fragment) จะมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม Mycobacterium และ coryneform ไม่ว่าจะเป็นรูปร่าง การติดสีย้อมและลักษณะทางสรีรวิทยา
3. ถูกทำลายได้โดยแบคทีเรียโอฟาจ และสารปฏิชีวนะประเภทเดียวกับที่ทำลายแบคทีเรีย
4. เป็นเซลล์ชั้นต่ำที่ยังไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (prokaryotes)
5. ผนังเซลล์ไม่มีไคตินหรือเซลลูโลสแต่เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Polymer) ของน้ำตาลกรดอะมิโน ซึ่งคล้ายกับผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria)

2.2 แอคติโนมัยซีสในสภาพแวดล้อม

แอคติโนมัยซีส เจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันพอสมควร คือนอกจากจะพบในดินที่เป็นสภาพธรรมชาติแล้ว ยังพบในกองปุ๋ยหมักที่มีอุณหภูมิสูงมาก ๆ ในโคลน แม่น้ำ ใต้ทะเลสาบ แต่โดยปกติมักจะเจริญอยู่ผิวดินหรือในดินที่ไม่ลึกไปกว่า 4 เซนติเมตร จากการนับจำนวนจากดิน ตัวอย่างที่ไม่มีการจำกัดการเจริญ พบว่ามีจำนวนใกล้เคียงกับแบคทีเรีย แต่ถ้าในดินที่มีสภาพที่เป็นต่าง จะพบแอคติโนมัยซีสในอัตราส่วนที่สูงขึ้นเช่นดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่มี pH 6.5-8.0 จะมีแอคติโนมัยซีสสูงถึง 95% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด แต่ในดินต่าง ๆ ทั่วไปจะพบประมาณ 10-70% ของจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด จากความสามารถทนความแล้งได้ดี ทำให้สภาพดินแห้งแล้งจะพบแอคติโนมัยซีสเป็นอัตราส่วนสูงขึ้นจึงพบในดินเขตร้อนมากกว่าดินเขตอบอุ่น

สภาพที่เหมาะสมแก่การเจริญของแอคติโนมัยซีสได้แก่บริเวณทุ่งหญ้าธรรมชาติ ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ แต่ในดินที่ทำการเกษตรจะพบน้อย และไม่ค่อยพบในดินที่ค่อนข้างเป็นกรด ถึงแม้ว่าแอคติโนมัยซีสจะสร้างสปอร์ได้ แต่ลักษณะของแอคติโนมัยซีสไม่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้มากนัก ตัวอย่างเช่นมีการทดลองเพาะสปอร์ที่อุณหภูมิ 39 °C ไม่พบแอคติโนมัยซีสเจริญเลย ทำให้สรุปว่าสปอร์แอคติโนมัยซีสไม่สามารถได้มากกว่าเซลล์ปกติเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากลักษณะการเจริญที่ช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา ทำให้สภาพธรรมชาติจึงไม่สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ 2 ชนิดดังกล่าว แต่แอคติโนมัยซีสมีความสามารถพิเศษในการย่อยสลายสารประกอบที่ย่อยสลายยาก จึงพบว่าการเจริญมักจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลังจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เจริญลดน้อยลงแล้ว จากสภาพดังกล่าวทำให้สภาพที่เหมาะสมกับแอคติโนมัยซีสอยู่ในลักษณะที่ไม่ค่อยจะมี จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้เช่นดินที่ค่อนข้างเป็นด่างแห้งแล้งและอุณหภูมิสูง

2.3 การจัดกลุ่มของแอคติโนมัยซีส

แบ่งเป็น 8 กลุ่มดังนี้ ที่นิยมศึกษาในเรื่องของการสร้าง secondary metabolites ได้แก่ Sporostreptomycetes, Nocardioid form actinomycetes, Actinoplan

2.3.1 *Nocardioid form actinomycetes*

มีลักษณะที่ต่างกันอย่างหลากหลาย substrate mycelium จะแตกหักออกเป็นท่อนสั้นๆ

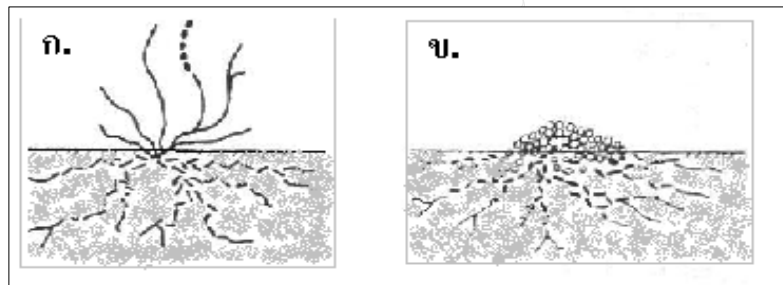
และบางสกุลสร้าง aerial hypha ที่ปลายมี arthrospore ประกอบด้วยสมาชิกสกุลต่างๆที่มี wall chemotypes แตกต่างกันหรือการมี mycolic acid เป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ หรือลักษณะอื่นๆ แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1 ผนังเซลล์มี mycolic acid เป็นองค์ประกอบ

กลุ่มย่อยที่ 2 Pseudonocardia และสกุลอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

กลุ่มย่อยที่ 3 Nocardioidees และ Terrabacter

กลุ่มย่อยที่ 4 Promicromonospora และสกุลอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

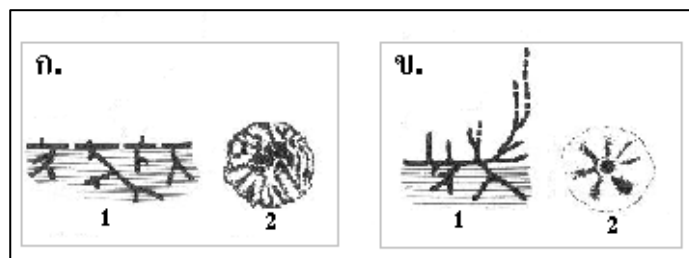


ภาพที่ 2.1 *Nocardioform actinomycetes*

ก. *Nocardia* spp. ที่ substrate mycelium แตกหักเป็นท่อนสั้นๆและมีการสร้าง aerial mycelium อย่างจำกัด บนปลาย mycelium จะมี arthrospore ต่อกันเป็นสาย

ข. *Rhodococcus* spp. ซึ่ง substrate mycelium จะแตกหักเป็นท่อนสั้นๆอย่างรวดเร็ว เซลล์ที่เกิดจากการแตกหักจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นรูปกลมและโคโลนีประกอบด้วยกลุ่มของ coccoid cell

ที่มา: งามนิจ นนทโส , 2537



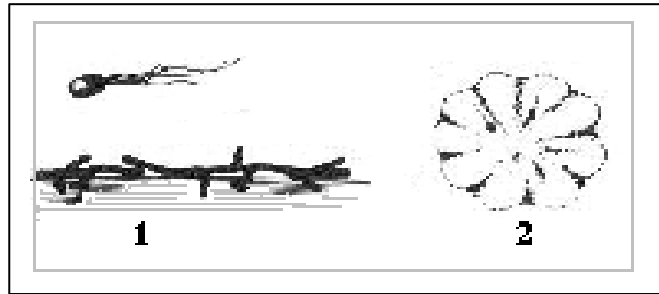
ภาพที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีและ mycelium ของ สกุล *Nocardia*

ก. มีเฉพาะ substrate mycelium (1) และโคโลนีคล้ายหนังสัตว์ (2)

ข. มี aerial mycelium บนปลาย mycelium จะมี arthro spore ต่อกันเป็นสายและ substrate mycelium

ที่มา: งามนิจ นนทโส , 2537

2.3.2 **สกุลต่างๆที่สร้าง multiculocular sporangia** substrate mycelium จะแบ่งตามยาวและตามขวางหลายระนาบ จึงทำให้ได้สปอร์ค่อนข้างกลม เคลื่อนที่ได้ เช่น สกุล *Dermatophilus* หรือเคลื่อนที่ไม่ได้ เช่น สกุล *Frankia*



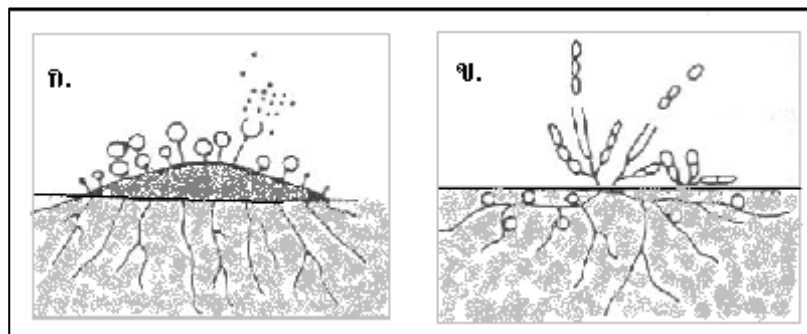
ภาพที่ 2.3 ลักษณะสกุล *Dermatophilus*

1. มีเฉพาะ substrate mycelium และ motile spore
2. โคลนีผิวเรียบคล้ายโคลนีแบคทีเรียทั่วไป แต่แข็งกว่าเนื่องจากไม่สร้าง aerial mycelium

ที่มา: งามนิจ นนทโส, 2537

2.3.3 *Actinoplanetes*

Substrate mycelium ไม่แตกหักเป็นท่อนๆ อาจสร้าง aerial mycelium บ้างเล็กน้อยหรือไม่สร้างและสร้าง motile spore ภายใน sporangium หรือสร้าง non motile spore เดี่ยวๆ เช่น สกุล *Micromonospora* หรืออาจสร้างสปอร์ต่อกันสปอร์ต่อกันเป็นสายผนังเซลล์มี mesoDAP และ glycine เป็นองค์ประกอบ และ whole cell hydrolysates มี arabinose, xylose เป็นองค์ประกอบ

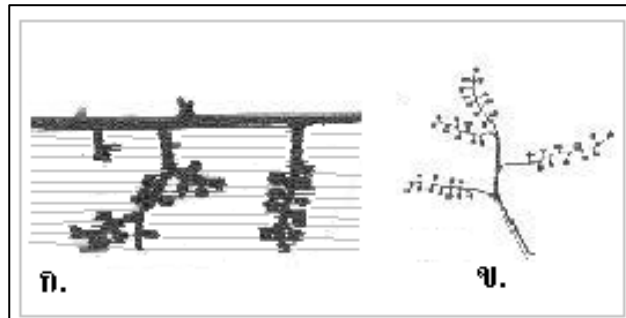


ภาพที่ 2.4 *Actinoplanetes*

ก. *Actinoplanes* spp. สร้างอับสปอร์รูปร่างกลม(globose sporangium)บนผิวของโคโลนีและปลดปล่อยสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (Motile spore)

ข. *Dactylosporangium* spp. อับสปอร์มีรูปร่างเป็นแท่ง(Tabular sporangium) ภายในมี motile spore และสร้าง aleuriospore บน Substrate mycelium มีลักษณะกลม

ที่มา: งามนิจ นนทโส, 2537

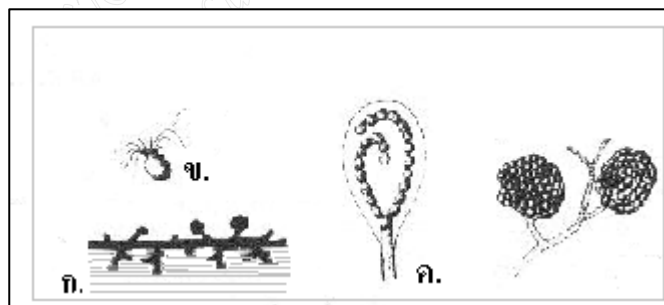


ภาพที่ 2.5 *Micromonospora*

ก. *Micromonospora* สร้างสปอร์ 1 อันบนปลาย substrate mycelium

ข. ภาพขยายของ Substrate mycelium

ที่มา: งามนิจ นนทโส, 2537



ภาพที่ 2.6 *Actinoplanes*

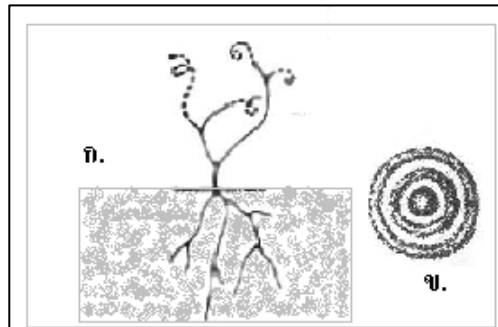
ก. ลักษณะ substrate mycelium และ aerial mycelium ของสกุล *Actinoplanes*

ข. สปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (Motile spore) ค. ลักษณะ Sporangium และ motile spore ของสกุล

Actinoplanes

ที่มา: งามนิจ นนทโส, 2537

2.3.4 Streptomycetes และสกุลอื่น สมาชิกมีลักษณะต่างกันอย่างมากหลาย ผนังเซลล์มี L-DAP และ glycine เป็นองค์ประกอบ สร้าง substrate mycelium และ aerial mycelium ซึ่งที่ปลายมี conidia ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ *Streptomyces*, *Streptoverticillum* และสกุลที่ไม่สร้าง aerial mycelium หรือ สร้างเล็กน้อยสร้างสปอร์หลายรูปแบบ



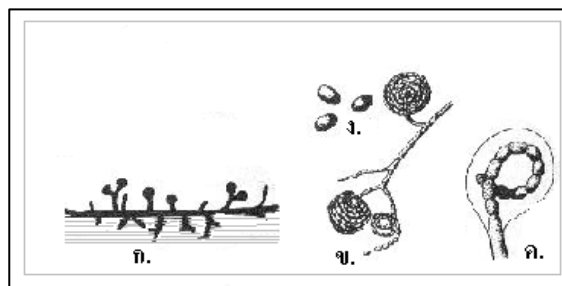
ภาพที่ 2.7 *Streptomyces*

ก. *Streptomyces* spp. สร้างสปอร์บน aerial mycelium เท่านั้น

ข. โคโลนีมีคล้ายขนสัตว์มีลักษณะไม่ต่อเนื่อง

ที่มา: งามนิจ นนทโส, 2537

2.3.5 Maduromycetes สร้าง substrate mycelium ที่ไม่แตกหักเป็นท่อน และสร้าง aerial mycelium ซึ่งสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสาย เช่น *Microbispora* ประกอบด้วย 2 สปอร์ Microtetraspore ประกอบด้วย 4 สปอร์ Actinomadura มีจำนวนสปอร์แตกต่างกันบนแต่ละสาย สปอร์ สกุลที่สร้าง motile spore ใน sporangium ได้แก่ Planobisspora, Planomonospora, Spirillospora และสกุล Streptosporangium สร้าง non motile spore ใน sporangium ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP และ cell hydrolysate ประกอบด้วย madurose

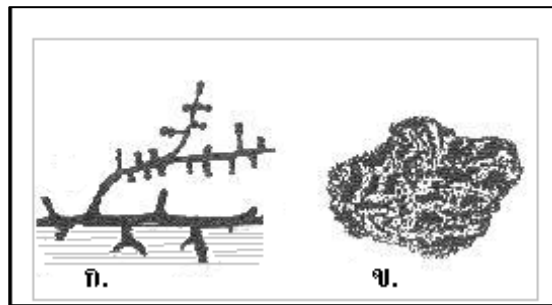


ภาพที่ 2.8 Streptosporangium

ก. ลักษณะ substratemycelium และ aerial mycelium ของสกุล Streptosporangium

ข. ลักษณะ Sporangium และ non motile spore ของสกุล Streptosporangium

ที่มา: งามนิจ นนทโส, 2537



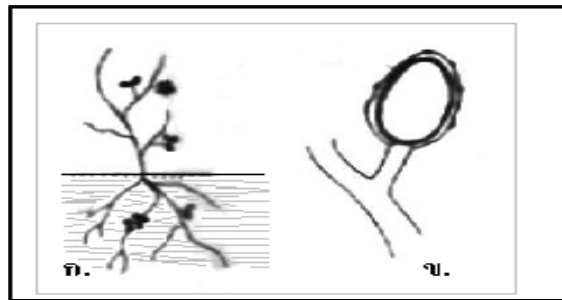
ภาพที่ 2.9 *Microbispora*

ก. *Microbispora* สร้างสปอร์ 2 อันบนปลาย aerial mycelium และไม่พบสปอร์ที่ Substrate mycelium

ข. โคโลนีของ *Microbispora*

ที่มา: งามนิจ นนทโส , 2537

2.3.6 *Thermomonospora* และสกุลอื่นๆที่คล้ายกัน สร้าง Substrate mycelium ที่ไม่แตกหักเป็นท่อนๆ สร้าง aerial mycelium สกุลที่สร้างสปอร์ 1 อัน ได้แก่ *Thermomonospora* และสร้างสปอร์เป็นสายได้แก่ *Norcardiopsis*, *Actinosynnema* หรือสร้างสปอร์ภายในโครงสร้างคล้าย Sporangium ได้แก่สกุล *Streptoallotrichus* ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso – DAP ไม่พบ amino acid และ sugar ใน whole cell hydrolysates



ภาพที่ 2.10 *Thermomonospora*

ก. *Thermomonospora* สร้าง aleuriospora บนทั้ง substrate mycelium และ aerial mycelium

ข. ภาพขยายของ aleuriospora

ที่มา: งามนิจ นนทโส, 2537

2.3.7 *Thermoactinomyces* ประกอบด้วยสกุลเดียวคือ *Thermoactinomyces* สร้าง substrate mycelium ที่ไม่แตกหักเป็นท่อนๆ สร้าง Aerial mycelium สกุลที่สร้างเอนโดสปอร์ 1 อันบนทั้ง substrate mycelium และ aerial mycelium เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermophile) ผนังเซลล์ประกอบด้วย meso-DAP ซึ่งไม่มี Amino acid และ sugar

2.3.8 สกุลอื่นๆ ประกอบด้วย 3 สกุลที่ไม่สามารถจัดไว้ในทั้ง 7 กลุ่ม ได้แก่ *Glycomyces*, *Kitasatosporangia*, *Saccharothrix*

2.4 ประโยชน์และโทษของแอคติโนมัยซีต

actinomycetes เป็นแบคทีเรียที่ลักษณะคล้ายเชื้อรา มีลักษณะเป็น prokaryotic cell เซลล์เป็นเส้นสาย (filament) คล้าย hypha ของเชื้อรา แต่มีขนาดเล็กและสั้นกว่า hypha มาก นอกจากนี้ยังสร้างสปอร์และอัสสปอร์รวมทั้งสร้าง aerial mycelium, substrate mycelium เช่นเดียวกับเชื้อราสมาชิกในพวก actinomycetes นี้มีความสำคัญต่อมนุษย์ บ้างก็ทำให้เกิดโรคแก่คน สัตว์ พืช แต่ที่เป็นประโยชน์เช่นย่อยสลายซากพืช, สัตว์ในดิน ทำให้ดินอุดมสมบูรณ์ และพวกที่สร้างสารปฏิชีวนะ สารฆ่าเชื้อรา สารต้านเนื้องอกเป็นต้น ประกอบด้วยหลายสกุล แต่ที่นิยมศึกษาในเรื่องของการสร้าง secondary metabolites ได้แก่ *Sporostreptomycetes*, *Norcardioform actinomycetes*, *Actinoplanete* โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* มีความสำคัญในการผลิตสารปฏิชีวนะที่ใช้ในทางการแพทย์ การเกษตรและอาหาร นอกจากนี้ยังมีความสำคัญ

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาการแยกและการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ โดยนำตัวอย่างดิน 20 ตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ 4 แหล่งในจังหวัดเชียงใหม่ มาแยกหาเชื้อแอคติโนมัยซีสได้ทั้งหมด 46 ไอโซเลต แล้วนำมาตรวจสอบผลยับยั้ง การเจริญกับแบคทีเรียทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี disc diffusion method จากทดสอบพบว่าไอโซเลต MH2-16 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*, *M. luteus* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าไอโซเลตอื่นๆ เมื่อนำไอโซเลต MH2-16 ตรวจสอบลักษณะทาง สัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces sp.* MH2-16 จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง

สารปฏิชีวนะของ *Streptomyces sp.* MH2-16 โดยแปรชนิดและความเข้มข้นขององค์ประกอบของสารอาหาร แปรความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิและความเร็วของเครื่องเขย่า พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย glucose 2.0%, peptone 1.0%, NaCl 0.4%, K_2HPO_4 0.005%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% และ CO_2 0.5% pH 9 ที่อุณหภูมิ 30°C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ระยะการเลี้ยงเชื้อ 6 วัน และในสภาวะเดียวกัน เชื้อสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ *M. luteus* ได้ดีที่สุด ที่ระยะเวลา การเลี้ยงเชื้อ 7 วัน (ดรุณี เทพปาน, 2541)

การศึกษาการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนส โดยได้ทำการทดลองเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากรากพืช ดินและเชื้อบริสุทธิ์จากภาคชีววิทยา จำนวน 249 ไอโซเลตพบว่ามีแอคติโนมัยซีสจำนวน 38 ไอโซเลตที่สามารถผลิตmannase ได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย locust bean gum 1%(w/v) แล้วทดสอบด้วยวิธี gel diffusion assay ที่ประกอบด้วย Phyta gel 0.7% (w/v) พบว่าสายพันธุ์ E2/22 ซึ่งบ่งบอกชนิดว่าเป็น *Streptomyces sp.* สามารถผลิต mannose ได้สูงที่สุด เมื่อเพาะกล้าเชื้อ 3.85% ในอาหารเหลวที่

(นลิน วงศ์ขัตติยะ, 2541)

การได้ศึกษาการแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีสจากดินในถ้ำน้ำลอด จังหวัดแม่ฮ่องสอน ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของฟังไจ โดยแยกแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของฟังไจโดยใช้ดินจากถ้ำน้ำลอด จ.แม่ฮ่องสอน จำนวน 32 ตัวอย่าง สามารถแยกแอคติโนมัยซีสที่แยกได้นำมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยวิธี paper disc diffusion แล้ว คัดเลือกเชื้อที่เกิดวงใส ยับยั้งเฉพาะ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ EC19 เท่านั้น ซึ่งแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์นี้ มีการเปลี่ยนแปลงยีนที่ควบคุมการสร้างโคตินที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ จึงทำให้การสร้างผนังเซลล์ผิดปกติ แต่ไม่สามารถยับยั้งยีสต์สายพันธุ์ SS553 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ปกติได้ พบว่าแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ JA122 เท่านั้นที่ให่วงใสในการยับยั้งเชื้อยีสต์ ทดสอบสายพันธุ์ EC19 ขนาด 15 มิลลิเมตร เพื่อนำไปทดสอบหาองค์ประกอบของผนังเซลล์ด้วยวิธี Thin-layer chromatograph จะเป็นแบบ LL-diaminopimelic acid (LL-DAP) และประกอบด้วย L-aspartic acid, glutamic acid และ alamine มีการเรียงตัวของสปอร์เป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ จึงจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหาร SUG medium เพื่อหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อได้ดีคือ 8.0% D-mannitol และ 0.1% maltextract โดนอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมคือ 27 °C และ 8.0 ตามลำดับ เชื้อจะสร้างสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด ในวันที่ 8 จากการนำน้ำเลี้ยงที่ผ่านการสกัดด้วย dichloromethane มาทำ Thin-layer chromatograph เพื่อศึกษาผลการยับยั้งของสารปฏิชีวนะ โดยวิธี Bioautograph พบว่ามีแถบที่มี R_f อยู่ในช่วง 0.50-0.73 เมื่อนำสารสกัดที่ทำให้มีความบริสุทธิ์บางส่วน ไปหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ GC-MS พบว่าปรากฏ 10 พีค และสารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบได้ทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อนำแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* และ *Klbsilla pneumoniae* มาใช้เป็นเชื้อ

(จิรพรรณ ใจอินผล, 2545)

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์
Nakhon Sawan Rajabhat University