บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผล

1. การแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ สายพันธุ์นกหยิบ พวงมณี และกระปุกทองดี ด้วยวิธี Surface sterile

1.1 สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท โดยได้จากพันธุ์พวงมณี จำนวน 7 ไอโซเลท และจากพันธุ์กระปุกทองดีจำนวน 3 ไอโซเลท แต่ไม่สามารถแยกได้จากพันธุ์นกหยิบ

1.2 ในพันธุ์พวงมณีแยกเชื้อได้จากส่วนกิ่ง จำนวน 4 ไอโซเลท ใบ 2 ไอโซเลท และราก 1 ไอโซเลท ส่วนพันธุ์กระปุกทองดีได้จากส่วนต่าง ๆ ส่วนละ 1 ไอโซเลท

2. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

2.1 การยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรีย

2.1.1 มีเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท 1 ไอโซเลท คือ PM-R01 มีฤทธิ์ยับยังจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรียได้ ด้วยวิธีขีดขวาง (Confrontation test) โดยมีระยะยับยั้งเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 เฉลี่ยเท่ากับ 14.33 ± 2.33 mm และมีระยะยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เฉลี่ยเท่ากับ 13.00 ± 1.00 mm

2.1.2 สารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1,024 µg/ml ด้วยวิธี Broth microdilution

2.1.3 เมื่อนำสารแขวนลอยของเชื้อต่าง ๆ ที่สัมผัสสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ที่ความเข้มข้น 1,024 µg/ml มาทำการ Streak plate พบโคโลนีของเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 เฉลี่ย 2.67 ± 0.58 โคโลนี และของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เฉลี่ย 21.00 ± 4.36 โคโลนี

2.1.4 สารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,024 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98.20

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2.2 การยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มเชื้อราไฟทอปธอราที่ก่อโรคในทุเรียน

2.2.1 มีเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท 1 ไอโซเลท คือ KP-R01 มีฤทธิ์ยับยังเชื้อราไฟทอปธอราได้ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมในจานเพาะเชื้อเดียวกัน (Dual culture) โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเชื้อไฟทอปธอราสายพันธุ์ L04, M01 และ R01 เท่ากับ 66.7, 61.2 และ 58.9 ตามลำดับ

2.2.2 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 ยังสามารถยับยั้งเชื้อราไฟทอปธอราได้ที่ร้อยละ 33.3 ด้วยวิธีการประกบจานเพาะเชื้อซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากการสร้างสารระเหยของเชื้อแอคติโนมัยซีท นอกจากนั้นสปอร์ที่มีชีวิตของเชื้อแอคติโนมัยซีทยังสามารถยับยั้งเชื้อราได้ โดยมีร้อยละการยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ L04, M01 และ R01 เป็น 98.3, 98.0 และ 98.0 ตามลำดับ และเชื้อนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ Cellulase บนอาหาร Carboxy methyl cellulose agar ได้ มีบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อแอคติโนมัยซีทเฉลี่ยเท่ากับ 4.00 ± 0.06 mm

3. การระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

3.1 เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 สามารถระบุได้ว่าอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* หรือ *S. ardesiacus* NRRL B-1773 (Type strain) ที่ร้อยละ 99.65

3.2 เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท KP-R01 สามารถระบุได้ว่าอยู่ในจีนัส *Streptomyces* และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces lucensis* JCM 4490 (Type strain) ที่ร้อยละ 99.20

อภิปรายผล

ปัจจุบันการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกำลังเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบทางการแพทย์อย่างมาก หากไม่สามารถควบคุมหรือชะลอการเกิดเชื้อดื้อยาได้จะเหมือนย้อนไปสู่ยุคก่อนการค้นพบยาปฏิชีวนะ (Pre-antibiotic era) อีกครั้ง จึงมีความจำเป็นอย่างมากที่จะต้องหาแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ เพื่อแก้ปัญหาการดื้อยา แอคติโนมัยซีทจัดเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นอย่างมาก เพราะสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด จากการสร้างสารเมแทโบไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในจุลินทรีย์อื่น ๆ แล้ว แอคติโนมัยซีทถือเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีการสร้างสารเหล่านี้เป็นจำนวนมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 จำนวนสารทุติยภูมิ (โดยประมาณ) ที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

แหล่งที่สร้าง	สารแอนติไบโอติก	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ	รวมทั้งหมด
แบคทีเรียอื่น ๆ	1400	240	1640
แอคติโนมัยซีท	7900	1220	9120

รา	2600	1540	4140

ที่มา : รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ (2549) : 2

การศึกษาการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดจันทบุรี ด้วยวิธีการ Surface sterile ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ศึกษาในพืชหลาย ๆ ชนิด เช่น ข้าว (Thanaboripat et al., 2015 : 680-684) แล้วนำไปวางบนอาหาร HV agar ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท เนื่องจากในอาหารมีส่วนประกอบของธาตุเหล็ก ที่ช่วยกระตุ้นให้เชื้อแอคติโนมัยซีทสร้างสปอร์ (สุจรรยา ฉายแสง, 2556 : 80) อีกทั้งยังเติมยาปฏิชีวนะ Nystatin ลงในอาหาร เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราและส่งเสริมให้เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้ง่ายขึ้น (ศรีสกุล ชนะพันธ์, 2553 : 71) พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทได้จากทุเรียนพันธุ์กระปุกทองดี 3 ไอโซเลท จากส่วนรากจำนวน 1 ไอโซเลท ลำต้น 1 ไอโซเลท และใบ 1 ไอโซเลท คัดแยกได้จากทุเรียนพันธุ์พวงมณี 7 ไอโซเลท จากส่วนรากจำนวน 1 ไอโซเลท ลำต้น 4 ไอโซเลท และใบ 2 ไอโซเลท แต่ไม่สามารถคัดแยกได้จากทุเรียนพันธุ์นกหยิบ เชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้รวม 10 ไอโซเลท และเพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกได้นั้นเป็น เชื้อเอนโดไฟท์ จึงต้องตรวจสอบโดยการนำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ใช้เป็นน้ำล้างครั้งที่ 3 จากวิธี Surface sterile ปริมาตร 200 µl มา Spread บนอาหาร ISP-2 agar และการนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาป้ายหรือกลิ้งบนอาหาร ISP-2 agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หากไม่พบเชื้อใด ๆ เจริญบนอาหารทดสอบ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นเป็นเชื้อกลุ่มเอนโดไฟท์จริง (Mingma et al., 2013 : 271-280) ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยคัดแยกชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทได้ในปริมาณที่น้อย ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางกายภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท เช่น แสง อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น รวมทั้งแหล่งพลังงานและธาตุอาหารของต้นพืชไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท ต่างกับงานวิจัยของ Taechowisan et al., (2003) : 381-385 ที่ทำการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากพืช 36 ชนิด พบว่าสามารถแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 330 ไอโซเลท โดยสามารถแยกได้จากราก 212 ไอโซเลท คิดเป็น 64.24% จากใบ 97 ไอโซเลท คิดเป็น 29.39% และ 21 ได้จากลำต้น คิดเป็น 6.36% แต่ในการวิจัยครั้งนี้สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทได้จากราก ใบ และลำต้น คิดเป็น 20%, 30% และ 50% ตามลำดับ ซึ่งงานวิจัยนี้แยกเชื้อได้น้อยอาจเป็นเพราะใช้ตัวอย่างพืชที่นำมาทำการแยกเชื้อมีปริมาณที่น้อยกว่า และไม่ได้ทำการบดตัวอย่างก่อนการแยกเชื้อเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mingma et al., (2013) : 271-280 จึงทำให้เชื้อออกจากเนื้อเยื่อพืชได้ยาก อาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ปริมาณเชื้อที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืชน้อย

เชื้อที่บริสุทธิ์นำไปทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 มีความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* TISTR 2372 ซึ่งอาจเป็นเพราะผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกที่ประกอบด้วยชั้น Peptidoglycan เพียงอย่างเดียวไม่มีความซับซ้อนทำให้สารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิที่เชื้อแอคติโนมัยซีทสร้างขึ้นผ่านเข้าไปได้ง่าย ขณะที่ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 28753

เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนประกอบด้วยชั้น Outer membrane, Periplasmic space และ Peptidoglycan จึงสามารถกั้นหรือขัดขวางไม่ให้สารเข้าสู่เซลล์ได้ (Madigan et al., 2009 : 78-84)

โดยผลทดสอบการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taechowisan et al., (2014) : 8-13 ศึกษาการแยกเชื้อเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากกระชาย มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC25932, *B. cereus* ATCC7064 และ *B. subtilis* ATCC6633

เมื่อนำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมาเพิ่มจำนวนเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร ISP-2 agar จำนวน 200 เพลต บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กระทั่งเชื้อสร้างสปอร์จนเต็มผิวหน้าอาหารและเลือกใช้สาร Ethyl acetate เป็นตัวทำละลายในการสกัด เนื่องจาก Ethyl acetate เป็นสารอินทรีย์ที่มีจุดเดือดอยู่ที่ 77.1 องศาเซลเซียส และมีคุณสมบัติเป็นสารขั้วกลางที่สามารถดึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้วกลาง สารขั้วสูงไม่มากและขั้วต่ำไม่มากออกมาได้ (อารมย์ จันทะสอน และคนอื่น ๆ, 2016: 124) จากนั้นทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MBC) *B. cereus* และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยวิธี Broth microdilution ซึ่งเป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสารสกัด การทดสอบนี้จะทำให้ทราบค่า MBC ของสารสกัดนั้นๆ วิธีการคือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสกัดในความเข้มข้นต่าง ๆ กันผสมอยู่และสังเกตการเจริญของเชื้อทดสอบ (ประสาทพร บริสุทธิ์เพชร, พิทัย กาญบุตร และสาทร พรตระกูลพิพัฒน์, 2551 : 91-101) จากการทดสอบค่า MBC ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 พบว่าที่ความเข้มข้น 1,024 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ 99.73% และ 97.90% ตามลำดับ ทั้งนี้สารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM–R01 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้น้อยกว่ายา Gentamicin เนื่องจากความเข้มข้นที่ 0.0625 µg/ml ของยา Gentamicin สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus*, และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ 100% ซึ่ง Gentamicin เป็นยาต้านจุลชีพที่จัดอยู่ในกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ กลไกการออกฤทธิ์ของอะมิโนไกลโคไซด์คือการยับยั้งไม่ให้อะมิโนอาซิล-ที-อาร์เอ็นเอ (Aminoacyl-tRNA) ไปเชื่อมต่อกับตำแหน่งจับบนไรโบโซม (Ribosome) 30S ของแบคทีเรีย และยากลุ่มนี้ยังเข้าจับกับไรโบโซม 70S อย่างสมบูรณ์ด้วย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตได้ (มาลิน จุลศิริ, 2540 : 46) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sengupta et al., (2015 : 1-17) ที่ได้ทำการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท SMS_SU21 จากการทดสอบกับเชื้อ *Vibrio cholerae* และ *S. aureus* พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้คือ 50 µg/ml และเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท SMS_SU13 จากการทดสอบกับเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้คือ 50 µg/ml เช่นกัน และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gos et al., (2017) : 1-17 ที่คัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทได้จากต้นพืชสมุนไพร *Vochysia divergens* ในประเทศบราซิล ได้ 10 ไอโซเลท ได้ทำการทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท LGMB491 กับเชื้อ *S. aureus* และ Methicillin

resistant *S. aureus* (MRSA) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้คือ 20 และ 40 µg/ml ตามลำดับ และค่า MBC ของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท LGMB491 ที่ทำการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* และ Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ได้คือ 5,000 µg/ml

เมื่อนำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทนาน 7 วัน โดยอาศัยวิธี Slide culture และนำมาศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อสร้างเส้นใยขนาดเล็กสร้างสปอร์เป็นสายยาวโค้งงอ เรียงตัวแบบ Whorls และมีแขนงแบบ Umbels เรียกว่า Verticillati สร้าง Aerial mycelium ลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวแต่เมื่อมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเทา สร้างรงควัตถุ สีเหลือง ลักษณะการเจริญของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทบนผิวหน้าอาหาร ลักษณะผิวหน้าโคโลนียับย่น ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทจะมีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี (Miyadoh, 1993 : 100-106)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อเอนโดไฟติคแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,522 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank และ EzBioCloud พบว่าสามารถจัดเชื้อนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces* และจากการสร้างและวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไอโซเลท PM-R01 ร่วมกับเชื้อใกล้เคียงที่เป็นเชื้อต้นแบบ (Type strain) แต่ละชนิดด้วยโปรแกรม MEGA พบว่าเชื้อไอโซเลท PM-R01 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *S. diastaticus* subsp. *ardesiacus* หรือ *S. ardesiacus* NRRL B-1773 (Type strain) ที่ร้อยละ 99.65 ส่วนเชื้อไอโซเลท KP-R01 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,461 นิวคลีโอไทด์ สามารถจัดเชื้อนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces* เช่นกัน และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *S. lucensis* JCM 4490 (Type strain) ที่ร้อยละ 99.20 อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA นี้ยังไม่สามารถระบุหรือยืนยันได้ว่าเชื้อที่แยกได้นี้จัดอยู่ในสปีชีส์ใด เนื่องจากแม้ว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไอโซเลท PM-R01 มีความคล้ายคลึงถึงร้อยละ 99.65 แต่เชื้อไอโซเลทนี้อาจเป็นแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ เพราะด้วยยีน 16S rRNA มีขนาดเพียงประมาณ 1,500 นิวคลีโอไทด์ ในขณะที่ขนาดจีโนมของเชื้อต้นแบบคือ *Streptomyces* มีขนาดจีโนมทั้งหมดอยู่ที่ประมาณ 8,000,000 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งการศึกษายีน 16S rRNA ถือว่าครอบคลุมพื้นที่จีโนมเพียงร้อยละ 0.018 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเท่านั้น ดังนั้นหากต้องการผลที่แม่นยำควรมีการศึกษาด้วยวิธี DNA-DNA hybridization เพิ่มเติมซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติเรื่องการจับคู่ของจีโนมอย่างจำเพาะของดีเอ็นเอทั้งหมด (Kawamura et al.,1998 : 2038-2042) ซึ่งผู้ศึกษาไม่ได้ทำเทคนิคนี้เนื่องจากข้อจำกัดด้านงบประมาณที่สูงและเครื่องมือไม่อำนวยจึงทำการศึกษาได้เพียงการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA เท่านั้น

หลังจากทำการสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทหลังจากทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว พบว่าเชื้อมีลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ตรงกันกับเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ปรากฏในหนังสือ Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 5 The Actinobacteria กล่าวคือเชื้อไอโซเลท PM-R01 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *S. ardesiacus* NRRL B-1773 คือมีลักษณะโคโลนีของเชื้อนี้เมื่ออายุน้อยมีสีเหลือง มีการสร้าง Substrate

mycelium เป็นสีเหลืองและขาว และ Aerial mycelium เป็นสีเทา ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีเส้นสายสปอร์เรียงตัวแบบ Whorls และมีแขนงแบบ Umbels ที่เรียกว่า Verticillati ส่วนเชื้อไอโซเลท KP-R01 โคโลนีของเชื้อนี้เมื่ออายุน้อยมีสีเหลืองอ่อน มีการสร้าง Substrate mycelium เป็นสีเหลืองอ่อน และ Aerial mycelium เป็นสีขาว ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีเส้นใยหงิกงอ เส้นสายสปอร์เรียงตัวเป็นสายที่มีส่วนปลายม้วนงอ (Goodfellow et al., 2012 : 1618-1678) จากผลการเทียบเคียงชนิดของเชื้อที่ได้ พบว่ามีความแตกต่างไปจากงานวิจัยการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแบคทีเรียจากเปลือกของผลทุเรียนของ Suhandono et al. (2014) : 161-169 ที่ทำการคัดแยกเชื้อได้จำนวน 16 ไอโซเลท แบ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียหลายกลุ่มและหนึ่งในนั้นที่เป็นกลุ่มของแอคติโนมัยซีท 3 ไอโซเลท ซึ่งผลจากการศึกษาลำดับของยีน 16S rRNA พบว่าเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกับ *Gordonia terrae, Brachybacterium rhamnosum และ Kocuria kristinae* ไม่พบกลุ่มของ *Streptomyces* ซึ่งแตกต่างจากการวิจัยในครั้งนี้ที่เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces*

จากการศึกษาวารสารวิจัยต่าง ๆ พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces ardesiacus* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้หลายชนิด ได้แก่ Urdamycins W, Urdamycins X, Urdamycin E, Urdamycinone E, Urdamycin A, Urdamycin B, Urdamycinone B, Grincamycin U, Urdamycin F, 6 - Hydroxyphenazine-1 - carboxamide, Methyl 6 - carbamoylphenazine-1 - carboxylate, Diastaphenazine, Izumiphenazine C, Germicidin A, Germicidin B, Germicidin D, Germicidin H, Isogermicidin A และ Isogermicidin B ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้ (Li, 2015 : 210-212; Hu, 2019 : 574-577; Anh et al., 2022 : 1-9; Qiaoling, 2022 : 2594-2609) ในขณะที่เชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces lucensis* ก็สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้หลายชนิด ได้แก่ Etruscomycin, Lucensomycin A, Lucensomycin B, Lucensomycin C, Lucensomycin D, Lucensomycin E, Lucensomycin F และ Lucensomycin G ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราบางชนิดได้เช่นกัน (Biggio P., & Lostia A. 1962 : 585-588; Singh et al., 2006 : 5449-5452; Singh et al., 2008 : 2616-2619; Singh et al., 2009 : 345-352) จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เชื้อทั้งสองไอโซเลทที่แยกได้สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้

การวิจัยครั้งนี้เป็นแนวทางหนึ่งในการนำเนื้อเยื่อพืชที่เป็นเอกลักษณ์ในท้องถิ่นคือทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองมาแยกเชื้อ เพื่อให้ได้สารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิที่เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทสร้างขึ้นมาแล้วนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ จากผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 มีความสามารถในการต้านเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ ส่วนไอโซเลท KP-R01 มีความสามารถในการต้านเชื้อราไฟทอปธอราที่ก่อโรคในทุเรียนทั้งสามสายพันธุ์ คือ R01, M01 และ L04 ได้ จึงนับว่างานวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยที่มีประโยชน์ในระดับหนึ่ง การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นถึงการแยกเชื้อและการนำสารสกัดหยาบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทมาทดสอบ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ยังไม่โดดเด่นเท่าที่ควร โดยสารสกัดหยาบที่ดีควรให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อทดสอบต่ำกว่า 100 ug/ml การศึกษาต่อไปจึงควรทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ

แบคทีเรียหรือเชื้อราอื่น ๆ อีก หรือฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส เซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ เชื้อกลุ่มปรสิตต่าง ๆ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บางชนิดที่จะมีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้อื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α-glucosidase, α-amylase, Cyclooxygenase หรือ Nitric oxide synthase หรืออาจศึกษาถึงความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติ และควรทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีในสารสกัดหยาบ เพื่อให้ทราบถึงชนิดและโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ต่าง ๆ ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ด้านการแยกเชื้อ

1.1 ควรใช้ตัวอย่างชนิดของทุเรียนอื่น ๆ ที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองอีก เพราะในจังหวัดจันทบุรียังมีทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองอีกมาก

1.2 การเลือกใช้อาหารแยกเชื้อ ควรเพิ่มชนิดของอาหารแยกเชื้อเพราะอาจเหมาะสมกับเชื้ออื่น ๆ ได้

1.3 การบดตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทออกจากเนื้อเยื่อพืชได้ง่ายขึ้น

2. ด้านการสกัดสารออกฤทธิ์

2.1 ควรเพิ่มจำนวนชนิดของตัวทำละลายตามระดับความแรงของขั้ว ทั้งขั้วต่ำ ขั้วกลาง และขั้วสูง ซึ่งอาจได้สารออกฤทธิ์ที่หลากหลายและดีขึ้น

3. ด้านการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง

3.1 ควรเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบให้มากกว่าในการศึกษาครั้งนี้ สำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.2 ควรทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราชนิดอื่น ๆ ที่ต่างจากการศึกษาครั้งนี้

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี