บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ของจุลินทรีย์ในครั้งนี้แบ่งได้เป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคที่สำคัญทั้งสายพันธุ์ที่ไว และดื้อยาหลายชนิดของโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 กิโลดาลตันที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วว่าเป็นสารออกฤทธิ์ที่เชื้อแอคติโนมัยซิสในดิน ที่แยกได้ ณ ศูนย์การศึกษาฯ ไอโซเลท A67/204 ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อดี ผลการศึกษาเมื่อเทียบกับ nisin ที่เป็นตัวควบคุมผลบวกต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* 25 ไอโซเลท เชื้อ *Enterococcus faecalis* 26 ไอโซเลท และเชื้อ *Escherichia coli* 26 ไอโซเลท พบว่าโปรตีนที่สกัดได้นี้มีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งเชื้อได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.11±2.45, 9.05±2.86 และ 24.64±7.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ nisin ที่เท่ากับ 31.85±6.96, 31.25±10.83 และ 43.27±15.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ขณะที่เชื้อทดสอบอีก 2 กลุ่มซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดและเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลคือเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Acinetobacter baumannii* พบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อทั้ง 2 ของสารสกัดโปรตีนดังกล่าวออกฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกับ nisin โปรตีนนี้จะได้นำไปจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคทางโปรติโอมิคต่อไป ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคที่สำคัญทั้งสายพันธุ์ที่ไว และดื้อยาหลายชนิดของโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 กิโลดาลตันที่สกัดได้จากระบบการเพาะเลี้ยงซินไบโอติกระหว่างเชื้อ *Lactobacillus fermentum* LF16 กับอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมผงเห็ดระโงกขาวป่นเป็นสารปรีไบโอติก ผลการศึกษาเมื่อเทียบกับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สกัดจากการเพาะเลี้ยงแลคโตบาซิลลัสที่ไม่เติมผงเห็ดระโงกขาวป่นในอาหารเพาะเลี้ยงต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* 25 ไอโซเลท เชื้อ *Enterococcus faecalis* 26 ไอโซเลท และเชื้อ *Escherichia coli* 26 ไอโซเลท พบว่าโปรตีนที่สกัดได้นี้มีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งเชื้อได้มีค่าเท่ากับ 6.31±1.94, 8.04±0.43 และ 13.22±6.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สกัดจากการเพาะเลี้ยงแลคโตบาซิลลัสที่ไม่เติมผงเห็ดระโงกขาวป่นในอาหารเพาะเลี้ยงที่เท่ากับ 25.84±10.78, 32.45±9.81 และ 31.25±13.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนเชื้อทดสอบอีก 2 กลุ่มซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อยาในระดับสูง และเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาลคือเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Acinetobacter baumannii* พบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อทั้ง 2 ของสารสกัดโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โปรตีนที่สกัดได้จากระบบซินไบโอติกนี้จะได้นำไปจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคทางโปรติโอมิคต่อไปเช่นกัน

Abstract

The present study of medical advantage of microorganisms was divided into 2 parts. First part, low molecular weight protein (<10 kDa) which produced from soil actinomyces isolates A67/204 was carried out to determine the antimicrobial activity against the sensitive and multidrug resistant strains of important pathogens. This actinomyces isolate was previously selected from soil in Haripunchai Education Center of Chiang Mai university as the potent strain. The results demonstrated that the average minimal inhibitory concentrations of the tested protein extract against 25, 26 and 26 isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* were 8.11±2.45, 9.05±2.86 and 24.64±7.87 mg/ml. They exhibited the significant difference of average minimal inhibitory concentrations of nisin which were 31.85±6.96, 31.25±10.83 and 43.27±15.50 mg/ml, respectively. But two other tested bacteria namely *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* which are multidrug resistant and important nosocomial pathogens. Results showed the antimicrobial activities against two later pathogens were not differed among the tested protein and nisin. This tested protein should be carried out to the further proteomic study. Second part, low molecular weight protein (<10 kDa) which produced from synbiotic culture of *Lactobacillus fermentum* LF16 in the presence with wild-edible mushroom granule as the prebiotic was determined the antibacterial activity. This mushroom was collected from Haripunchai Education Center of Chiang Mai university. The results demonstrated that the average minimal inhibitory concentrations of the protein extracted from the lactobacillus culture in the presence of mushroom granule against 25, 26 and 26 isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* were 6.31±1.94, 8.04±0.43 and 13.22±6.54 mg/ml. They exhibited the significant difference to the average minimal inhibitory concentrations of the lactobacillus culture in the absence of mushroom granule which were 25.84±10.78, 32.45±9.81 and 31.25±13.26 mg/ml, respectively. But two other tested bacteria namely *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* which are multidrug resistant and important nosocomial pathogens. Results showed the antimicrobial activities against two later pathogens were not differed. This synbiotic protein should be carried out to the further proteomic study.

บทที่ 1
บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีจำนวนพืชสมุนไพร และจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ผลิตเป็นยาสมุนไพร เครื่องสำอาง อาหารเสริม และเครื่องดื่มบำรุงสุขภาพ กันอย่างกว้างขวาง ขณะที่มีอีกหลายชนิดซึ่งยังมิได้มีข้อมูลในการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคในร่างกายมนุษย์ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้กล่าวคือ ต้องทราบว่าสารสำคัญในการออกฤทธิ์ที่ต้องการคือสารใด สารดังกล่าวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญอย่างไร รวมทั้งมีความเป็นพิษ หรือก่อโรคหรือไม่ ความอเนกประสงค์ของจุลินทรีย์เป็นที่ทราบกันดีอยู่นานแล้ว แต่ยังมีประโยชน์เชิงวิทยาศาสตร์ชีวภาพอีกหลายข้อที่ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการวิจัยเพื่อเพิ่มมูลค่าของจุลินทรีย์เศรษฐกิจเพื่อนำมาใช้ประโยชน์เชิงการแพทย์ต่อไป

แอคติโนมัยซิสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณกวานีนและไซโทซีนในจีโนมสูง (55-78 เปอร์เซ็นต์) สมาชิกส่วนใหญ่สามารถสร้างเส้นใย และรงควัตถุที่มีสีต่างๆ กัน โดยทั่วไปดำรงชีพแบบอิสระในแหล่งดิน แหล่งน้ำ บทบาทที่สำคัญประการหนึ่งของแอคติโนมัยซิส คือความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านแบคทีเรีย รา ไวรัสและสารต้านมะเร็ง เป็นต้น โดยสัดส่วน 2 ใน 3 ของสารปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันผลิตโดย เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซิส

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยก และเก็บรวบรวมแอคติโนมัยซิสจากดินจากป่าในบริเวณศูนย์การศึกษาหริภุญชัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดลำพูน
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซิสในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

แอคติโนมัยซิส

1. ลักษณะโดยทั่วไปของแอคติโนมัยซิส

แอคติโนมัยซิสเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในคลาส *Actinobacteria* ใน Subclass *Actinobacteridae* และถูกจัดไว้อยู่ในอันดับ *Actinomycetales* ปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 40 แฟมิลี่ และมากกว่า 200 สกุล เป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณกวานีน และไซโทซีนในจีโนมอยู่ในช่วงร้อยละ 55-78 (Rakshanya *et al*., 2011)

แอคติโนมัยซิสมีรูปร่างที่หลากหลาย คือมีรูปร่างตั้งแต่ทรงกลมไปจนถึงรูปท่อน หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน (pleomorphic) มีรูปร่างเป็นเส้นสายที่แตกแขนงหรือหักเป็นท่อน สมาชิกส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่สร้างเส้นใย 2 ชนิด คือเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ยกเว้น *Sporichthya* ที่สร้างเฉพาะเส้นใยอากาศ แอคติโนมัยซิสมีการสร้างสปอร์ได้ทั้งบนเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศ หรือสร้างบนเส้นใยชนิดใดชนิดหนึ่ง บางชนิดมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่าโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือโคนิเดีย (conidia) ไปจนถึงสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้และอยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ (sporangia) สามารถแบ่งกลุ่มแอคติโนมัยซิสตามรูปร่าง และการเรียงตัวของสปอร์ได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ

1. กลุ่มที่สร้างสปอร์เดี่ยว หรือสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายสั้นๆ
2. กลุ่มที่สร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว
3. กลุ่มที่สร้างสปอร์อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์
4. กลุ่มที่สร้างสปอร์อื่นๆ

โคโลนีที่มีลักษณะอ่อนนิ่มและร่วนเกิดจากเส้นใยแตกหักเป็นรูปท่อนหรือทรงกลม โคโลนีของแอคติโนมัยซิสหลายสกุล เช่น *Streptomyces* จะปกคลุมไปด้วยเส้นใยอากาศที่ห่อหุ้มด้วยชั้นของผิวที่เป็นไฮโดรโฟบิค (hydrophobic) และเจริญขึ้นสู่ด้านบน ในระยะเริ่มแรกเส้นใยอากาศมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีต่างๆ เมื่อเริ่มมีการสร้างสปอร์ ทำให้เห็นโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือคล้ายกำมะหยี่ (Basavaraj *et al*., 2010) สีของเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศมีตั้งแต่สีขาว สีน้ำตาล สีเหลือง สีชมพู สีส้ม สีดำ สีเทา สีม่วง สีแดง เป็นต้น บางชนิดสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำแพร่ออกมาในอาหารและมีสีต่างๆ กัน เช่น สีเหลือง สีส้ม สีเทา สีน้าตาล สีชมพู เป็นต้น เส้นใยที่แตกกิ่งก้านสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากเพาะเลี้ยงผ่านไป 24 ชั่วโมง และจะเห็นเป็นโคโลนีในวันที่ 3-4 ของการเจริญ ในขณะที่เส้นใยอากาศจะใช้เวลา 7-14 วันจึงจะเจริญเต็มที่ และในบางชนิดอาจใช้เวลานานถึง 1 เดือน แอคติโนมัยซิสที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีลักษณะการเจริญเป็นกลุ่มก้อน (pellet) เนื่องจากการงอกของสปอร์และการพันกันแน่นของเส้นใย แอคติโนมัยซิสมีค่า generation time ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เจริญได้ในอาหารที่มีค่า

aw (water activity) เท่ากับ 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และอาจมากถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ในบางสกุล เจริญได้ดีในช่วง pH 6.5-8.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส แต่มีบางพวกที่เป็น thermophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 50-65 องศาเซลเซียส เช่น ในดินปุ๋ยคอกและปุ๋ยหมัก

2. องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์

ในปี 1956 Cummins and Harris ได้แบ่งกลุ่มแอคติโนมัยซิสตามชนิดขององค์ประกอบทางเคมีที่ผนังเซลล์ไว้ทั้งหมด 8 กลุ่ม โดยมีชนิดของ 2,6-diaminopimelic acid (DAP) เป็นส่วนประกอบของเปปติโดไกลแคน DAP มี 2 ชนิด คือ LL-DAP และ *meso*-DAP ซึ่งพบในกลุ่มผนังเซลล์ชนิดที่ 1 และกลุ่มผนังเซลล์ชนิดที่ 2-4 ตามลาดับ ไม่พบ DAP ในกลุ่มผนังเซลล์ชนิดที่ 5-6 แต่พบกรดอะมิโน Lysine นอกจากนี้ยังมี Ornithine, Aspartic acid, Diaminobutylic acid (DAB) เป็นต้น

เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ในแอคติโนมัยซิสประกอบด้วย N-acetyl glucosamine (NAG) เชื่อมกับ N-acetyl muramic acid (NAM) ด้วยพันธะ β-(1,4)- glycosidic ได้เป็นสาย glycan tetrapeptide แต่ละสายจะมาเชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ที่เป็น interpeptide bridge ระหว่าง L-diamino acid กับ D-Ala ซึ่งความแตกต่างระหว่างแอคติโนมัยซิสที่มีผนังเซลล์จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1-4 พบว่าในกลุ่มที่ 1 มี glycine bridge เป็นตัวเชื่อมระหว่าง LL-DAP กับ D-Ala กลุ่มที่ 2-4 ไม่พบกรดอะมิโนใน interbridge ที่เชื่อมระหว่าง *meso*-DAP กับ D-Ala โดยกลุ่มที่ 2 มี glycine เป็นตัวเชื่อมระหว่าง NAM กับ D-Glu ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ 1, 3 และ 4 ที่มี L-Ala เป็นตัวเชื่อมระหว่าง NAM กับ D-Glu

3. ชนิดและการกระจายตัวของแอคติโนมัยซิส

แอคติโนมัยซิสส่วนใหญ่พบอยู่ในดิน และยังพบอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ปุ๋ยหมัก น้ำ โคลน ทราย และตะกอนใต้ทะเล เจริญได้ดีในดินที่มีสภาพ พีเอช เป็นกลาง พบทั้งในเขตร้อนและอบอุ่น ดินในเขตร้อนมักพบว่ามีปริมาณเชื้อมากกว่าเขตอบอุ่น การกระจายตัวของแอคติโนมัยซิส โดยทั่วไปมักขึ้นกับลักษณะทางกายภาพ พีเอช และอินทรีย์วัตถุในดิน มักพบว่าดิน 1 กรัม มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5-10^8 เซลล์ ในดินที่มีลักษณะเป็นด่าง และแห้ง จะพบปริมาณมากกว่าในดินที่เป็นกรดและเปียก ปกติแล้วเชื้อแอคติโนมัยซิสจะกระจายตัวอยู่มาก ตั้งแต่ผิวดิน จนลึกประมาณ 10 เซนติเมตร และลดลงตามความลึก จนถึงประมาณ 1 เมตร โดยส่วนใหญ่เชื้อนี้จะเป็นพวกที่ชอบเจริญในอุณหภูมิปานกลาง (Mesophile) เจริญที่ 25-30 องศาเซลเซียส แต่พบพวกที่ชอบเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูง (Thermophile) ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส ในดิน ปุ๋ยคอก และปุ๋ยหมัก Hayakawa และคณะ (2004) พบว่าการกระจายตัวและชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซิส ขึ้นกับชนิดของดิน ปริมาณฮิวมัส พีเอช และลักษณะของกรดฮิวมิก โดยทั่วไปเชื้อแอคติโนมัยซิสที่พบ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็น Streptomyces พบว่ามี Microbispora และ Streptosporangium ในดินที่มีกรดฮิวมิกสูง Saccharomonospora พบในดินที่มีฮิวมัสต่ำ ส่วนเชื้อ Dactylosporangium, Microtetraspora, Saccharomonospora และ Micromonospora พบมากใน

ดินจากป่าบนภูเขา, ป่าในที่ราบ, ดินที่มีการทำการเกษตร และดินที่เป็นทุ่งหญ้า นอกจากนี้มีแอคติโนมัยซิสหลายชนิดที่สามารถเจริญได้ในดินที่มีสภาพเป็นเกลือสูงรวมถึงสามารถเจริญได้ในดินตะกอนจากท้องทะเลลึก (Jensen และคณะ 1991)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต้องพิจารณาในการจำแนกเป็นสกุล (Holt และคณะ, 1994) ได้แก่

1. เส้นใย (Mycelium) แอคติโนมัยซิสมีการสร้างเส้นใยชู (aerial mycelium) และ เส้นใยราบ (substrate mycelium) หรือสร้างทั้งสองแบบ และเชื้อแอคติโนมัยซิสปกตินั้นสร้างเส้นใยราบ บางเชื้อสร้างเฉพาะ aerial hyphae (พบน้อย) บางเชื้อเส้นใยจะอยู่ในลักษณะ vesicle และไม่สร้างสปอร์ หรือสร้างสปอร์ บางครั้งเส้นใยอาจจะแข็งแรงหรือแตกหักได้ ถ้ามีการแตกหักเกิดขึ้นสิ่งหนึ่งที่จะต้องนำมาพิจารณาคือ รูปทรงของส่วนที่แตกหัก และการเคลื่อนที่

2. โคนิเดีย โดยทั่วไปหมายถึงสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) และไม่มี chlamydospores หรือ sporangiospores แอคติโนมัยซิสสามารถสร้างโคนิเดีย ได้หลายแบบ

2.1 โคนิเดียเดี่ยว ๆ (single conidia) มักพบโดยทั่วไป บางชนิดจะมีเอ็นโดสปอร์ (endospores) แบบเดียวกับแบคทีเรียอื่นที่สามารถทนความร้อนได้ดี บางชนิดมีเอ็นโดสปอร์แบบที่ทนความร้อนไม่ได้ บางชนิดอาจมีการสร้าง terminal vesicle ทำให้เกิดความสับสนกับลักษณะของสปอร์ได้ ความแตกต่างของเชื้อนั้นยังมีอีกมากมายเช่นสร้าง single vesicle เมื่อมีการเจริญภายใต้สภาวะกดดัน

2.2 โคนิเดียแบบคู่ (pairs of conidia) คู่ของโคนิเดียที่มีการเรียงตัวตามยาว สร้างอยู่เฉพาะบนเส้นใยชูเท่านั้น

2.3 โคนิเดียที่เรียงตัวเป็นสายสั้น ๆ (short chains of conidia) นับเป็นการยากที่จะบอกได้ว่าจะมีจำนวนสปอร์สักเท่าไรในสายสั้นนั้น แต่พิจารณาว่าถ้ามีการเรียงตัวของสปอร์ จำนวน 20 สปอร์ ก็จัดเป็นสายสั้นได้ อาจพบว่ามีหลายสกุลที่สร้างสายสปอร์ลักษณะนี้

2.4 โคนิเดียที่เป็นสายยาว (long chains of conidia) มีหลายสกุล ที่มีการสร้างสายสปอร์ลักษณะนี้ บางโคนิเดีย ที่มีการเรียงตัวติดกับเส้นใย และอาจเป็นสปอร์ที่มีการเคลื่อนที่ได้

3. Sporangia คือถุงที่บรรจุสปอร์ไว้ภายใน อาจเกิดบนผนังของเส้นใยชู ที่มีการพัฒนาขึ้น หรือบนผิวของโคโลนี ที่มี aerial hyphae สั้น ๆ หรือสร้างอยู่ในเนื้อวุ้น

4. โครงสร้างอื่น ๆ แอคติโนมัยซิสบางชนิดสามารถสร้างโครงสร้างที่มีลักษณะแปลกออกไป บางชนิดสร้างกลุ่มของสปอร์ ที่แกนของ hyphae การสร้างสปอร์แบบนี้เรียกว่า multilocular sporangia

แอคติโนมัยซิสหลายชนิดสร้างโครงสร้างกลมบน เส้นใยชู ซึ่งอาจไม่ใหญ่เท่าหยดน้ำมากนักลักษณะเป็นวงม้วนปิดวงกลม ในสายสปอร์ หรือโครงสร้างนี้อาจมี hyphae ฝังลงไปในโครงสร้างที่รูปร่างไม่คงตัว sclerotia เป็นโครงสร้างกลม สร้างใน Streptomycetes บางชนิด sclerotia จะไม่มีสปอร์อยู่ภายในแต่จะมีไขมันอยู่แทน การงอกอาจจะมีการสร้างจาก pseudosporangia

องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์

องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ที่ใช้เป็นคุณสมบัติร่วมกับสัณฐานวิทยาของเซลล์เพื่อการจัดจำแนก ในระดับสกุล ได้แก่

1. ชนิดของ diaminopimelic acid
2. ชนิดของน้ำตาล

องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ ทั้ง 2 อย่างนี้วิเคราะห์ภายหลังการไฮโดรไลซ์เซลล์ (whole cell hydrolysate) แล้วนำ มาแยกชนิดขององค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

แอคติโนมัยซิสถูกจัดจำแนกออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology จัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 26-33 โดยอาศัยหลักของสัณฐานวิทยา และลักษณะขององค์ประกอบทางเคมีในเซลล์และชนิดของกรดอะมิโนในผนังเซลล์และความคล้ายคลึงกันของ 16s RNA ในการจัดกลุ่ม ดังมีรายละเอียดในแต่ละกลุ่มดังต่อไปนี้

Nocardioform

Nocardioform คือกลุ่มแอคติโนมัยซิสที่มีเส้นสาย (mycelium) แตกหักแล้วได้โครงสร้างเป็นแท่งหรือกลม กลุ่มนี้ทุกตัวเป็นแกรมบวก และเป็นพวกต้องการอากาศในการเจริญ (ยกเว้น Oerskoviae ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ เมื่อมีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ) กลุ่มนี้มีผนังเซลล์เป็นแบบที่ 4 มี mycolic acid ซึ่งเหมือนกับ Corynebacteria และ Mycobacteria ยกเว้นในสกุล Nocardioides และ Intrasporangium มีผนังเซลล์ แบบที่ 1 (L-DAP และ glycine)

Actinomycetes with Multilocular Sporangia

แอคติโนมัยซิสกลุ่มนี้ใช้ลักษณะ multilocular sporangium เป็นหลักในการจำแนกระหว่างสกุล Geodermatophillus จะมีเส้นสายง่าย ๆ ยังไม่พัฒนามากนักทั้งหมดของ thullus จะสร้าง sporangium สกุล Dermatophillus เส้นสายจะมีการพัฒนาขึ้นมามีการสร้าง multilocular sporangium แบบยาว ส่วนสกุล Frankia การสร้าง sporangium และ filament จะสร้างทั้งบริเวณ intercalary swelling ตอนปลายหรือบนกิ่ง lateral branches ทั้ง 3 สกุลจะไม่พบการสร้างเส้นใยชู

Actinoplanetes

ในกลุ่ม Actinoplanetes ชื่อของกลุ่มมีความสัมพันธ์กับเชื้อส่วนมากที่มีถิ่นที่อยู่ คือในน้ำเพราะมีการเคลื่อนที่ได้ในน้ำช่วงหนึ่งของวงชีวิต ลักษณะสำคัญของกลุ่มนี้คือแกรมบวก non-acid fast และมีการเจริญโดยไม่มีการแตกหัก มีการแตกกิ่งและสร้าง septate hyphae เส้นใยชู มีการพัฒนาน้อย หรือจะเห็นเพียงบาง ๆ ในสกุล Micromonospora สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile spore) เกิดเดี่ยว ๆ ไม่มีก้าน หรือมีเพียงสั้น ๆ มักพบรวมเป็นกลุ่ม มีลักษณะกลม รูปไข่หรือวงรี ผนังหนาบางครั้งพบตุ่มหรือหนามที่ผนังพวก Actinoplanetes สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (motile spore) ใน sporangia หรือ spore vesicles ซึ่งมีการพัฒนาให้ไปอยู่ที่ส่วนปลายของ sporangiophore ทั้งขนาดสั้นและยาว สปอร์ มักถูกสร้างอยู่ใน sporangiophore ทั้งขนาดสั้นและยาว สปอร์ มักถูกสร้างอยู่ใน sporangial ที่ถูกปกคลุมด้วย

กิ่งก้านที่แตกหัก หรือบางทีก็เป็นเส้นใยเอง sporogenous hyphae ตรงหรือขดเป็นเกลียว ส่วนของ multisporous sporangia มีหลายรูปร่าง คือ cylindrical, bottle shaped, flask shaped campanulate, lobate, digitate, spherical, subspherical, ovoid, pyriform หรือ irregular (3-20 x 6-30 ไมโครเมตร)

Streptomycetes and related genera

ลักษณะที่สำคัญของกลุ่มนี้คือเส้นใยเป็นแบบ ไม่มีผนังกั้น มีเส้นใยชู เมื่อโตเต็มที่จะสร้างสปอร์เป็นลูกโซ่ มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป ติดสีแกรมบวก ผิวของโคโลนีมีลักษณะย่น ๆ เมื่ออายุมากขึ้น ที่ผิวหน้าของเส้นใยชู มีลักษณะคล้ายฝุ่นผง ซึ่งก็คือสปอร์ที่สร้างนั้นเอง

Maduromycetes

กลุ่มนี้เป็นพวกต้องการอากาศในการเจริญ เป็นแกรมบวก สร้าง branches substrate mycelium ที่ไม่มีสปอร์ แต่มีเส้นใยชูซึ่งสร้าง arthrospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้น หรือใน sporangia ที่มี 1 ถึงหลายสปอร์ ผนังเซลล์เป็นแบบที่ 3 ตัวเซลล์มีน้ำตาล madurose (3-O-methyl-D-galactose)

Thermomonospora and related genera

กลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญและสร้างสปอร์ สร้างเส้นใยเป็นกิ่ง บนเส้นใยชู ผนังเซลล์เป็นแบบที่ 3 ไม่มี mycolic acid มี menaquinone 9 หรือ 10 isoprene units (MK-9, MK-10)

บทบาทและความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยซิส

บทบาทของเชื้อแอคติโนมัยซิสที่สำคัญส่วนใหญ่จะเกิดจากเชื้อในสกุล *Streptomyces* เนื่องจากเป็นกลุ่มที่เจริญได้เร็วและมีปริมาณมากในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามเชื้อแอคติโนมัยซิสที่หายากยังเป็นกลุ่มที่น่าสนใจเนื่องจากความสามารถที่หลากหลาย บทบาทของเชื้อแอคติโนมัยซิสได้แก่

1. การย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ

เชื้อแอคติโนมัยซิสในธรรมชาติซึ่งส่วนใหญ่มีถิ่นที่อยู่อาศัยในดินมีความสามารถในการย่อยสลายองค์ประกอบของอินทรียวัตถุโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนประกอบของพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย ในช่วงที่มีอินทรียวัตถุในดินมากจะมีพวกแบคทีเรีย และเชื้อราเจริญอยู่มากและแอคติโนมัยซิสจะเจริญตามมาในภายหลังเพราะว่าเชื้อแอคติโนมัยซิสเจริญเติบโตได้ช้าและเจริญได้ดีก็ต่อเมื่อจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งได้ลดปริมาณลงแล้วคือในช่วงที่มีสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ทนทานต่อการย่อยสลายเหลืออยู่มาก แอคติโนมัยซิสที่มีหลายชนิดและหลายสายพันธุ์จะช่วยกันย่อยสลายสารพวกกรดอินทรีย์ น้ำตาลชนิดต่างๆ แป้ง ไขมัน และโปรตีน

1.1 การย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของพืชที่มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลกลูโคสที่เรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ **β**–1,4–glucosidic linkages ภายในสายประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่ 1,400 จนถึง

10,000 โมเลกุลแล้วแต่ชนิดของพืช เชื้อแอคติโนมัยซิสที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสพบเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* มากที่สุด และเชื้อแอคติโนมัยซิสชนิดอื่นๆ ได้แก่เชื้อ *Micromonospora, Streptosporangium, Nocardia* และ *Microbispora* นอกจากนี้ยังมีเชื้อ แอคติโนมัยซิสที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่อุณหภูมิสูงได้แก่เชื้อในสกุล *Thermomonospora* และ *Streptomycetes* ที่เจริญที่อุณหภูมิสูง

1.2 การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักอีกอย่างหนึ่งของพืชโดยสามารถแบ่งประเภทได้ตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไซแลน อะราแบน แมนแนน และกาแลกแตน เชื้อแอคติโนมัยซิสที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสมีด้วยกันหลายชนิด แต่ที่บทบาทมากที่สุด คือเชื้อสกุล *Streptomyces* และเชื้อแอคติโนมัยซิสชนิดอื่นๆ ได้แก่เชื้อ *Micromonospora, Streptosporangium, Nocardia* และ *Microbispora* เป็นต้น

1.3 การย่อยสลายลิกนิน

ลิกนินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชโดยต่ออยู่กับสายของน้ำตาลทำให้ผนังเซลล์ของพืชแข็งแรงทนทานต่อการย่อยสลาย การย่อยสลายลิกนินในธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นกิจกรรมของเชื้อราโดยเฉพาะเห็ดชนิดต่างๆ แต่ก็มีเชื้อแอคติโนมัยซิสบางชนิดเท่าซึ่งได้แก่เชื้อในสกุล *Streptomyces* และ *Micromonospora*

1.4 การย่อยสลายไคติน

ไคตินเป็นสารอินทรีย์ที่พบได้ทั่วไป โครงสร้างของไคตินประกอบด้วย N-acetylgluco samine ต่อกันเป็นสายยาว ในธรรมชาติพบว่าร้อยละ 90 ของไคตินจะถูกย่อยสลายโดยเชื้อแอคติโนมัยซิสที่มีบทบาทในการย่อยสลายไคตินมากที่สุดคือเชื้อในสกุล *Streptomyces* และ *Micromono spora* ตามลำดับ และความสามารถในการย่อยสลายไคตินของเชื้อแอคติโนมัยซิสนี้ยังถูกนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชอีกด้วย

1.5 การย่อยสลายแป้ง

แป้งเป็นองค์ประกอบที่พบได้ทั่วไปในพืช โครงสร้างของแป้งประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ α–1,4–glucosidic linkages และ α–1,6–glucosidic linkages เชื้อแอคติโนมัยซิส ส่วนใหญ่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยเชื้อแอคติโนมัยซิสที่พบว่าสามารถย่อยแป้งได้ดีได้แก่ *Streptomyces, Nocardia* และ *Micromonospora* เป็นต้น

1.6 การย่อยสลายโปรตีน

โปรตีนเป็นโครงสร้างหลักของสัตว์และพืช โครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน เรียงต่อกันเป็นสายยาว จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ รวมทั้งเชื้อแอคติโนมัยซิสด้วย โดยเฉพาะเชื้อ *Streptomyces* ส่วนการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้แก่พาราฟิน ฟีนอล สเตอรอยส์ และไพริมีดีนพบว่าเป็นกิจกรรมของเชื้อแอคติโนมัยซิสในสกุล *Nocardia* มากกว่าชนิด

อื่นๆ ส่วนเชื้อสกุล *Micromonospora* มีบทบาทในการย่อยสลาย ไคติน เซลลูโลส กลูโคไซส์ เพ็นโตแซน และลิกนิน

2. ความสามารถในการผลิตเอ็นไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม

แอคติโนมัยซิสสามารถผลิตเอ็นไซม์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมเช่น เชื้อที่สร้างเอ็นไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่สำคัญได้แก่ *Thermomonospora* ที่สามารถผลิตกลุ่มของเอ็นไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้แก่กลุ่ม exo glucanases และ endoglucanases ที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียส นอกจากเชื้อในกลุ่มนี้ก็ยังมีเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* หลายชนิดที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เชื้อที่สร้างเอ็นไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนโดยเชื้อที่สำคัญได้แก่ *Streptomyces* เช่น *S. flavogriseus* และ *S. lividans* เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเอ็นไซม์ที่ย่อยไซแลนที่ทำงานที่อุณหภูมิสูงจากเชื้อ *Thermo monospora* ที่มีการนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลไซโลสจากซังข้าวโพดเป็นต้น เชื้อที่สร้างเอ็นไซม์ที่ย่อยสลายไคตินโดยเชื้อที่สำคัญได้แก่ *S. griseus*, *S. antibioticus* และ *Amycolatopsis orientalis* เป็นต้นสามารถย่อยสลายไคตินได้เป็น chitobiose และ chitotrose งานวิจัยเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม เช่นการผลิตเอ็นไซม์ glucose isomerase หรือ D-xylose ketol-isomerase ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสเป็นตัวกระตุ้นในการผลิตเอ็นไซม์ชนิดนี้ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นน้ำตาลฟรุกโทสซึ่งเอ็นไซม์ชนิดนี้สามารถผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซิสหลายชนิด และที่มีการผลิตเป็นการค้าแล้ว โดยเชื้อ *Streptomycetes rubiginosus*, *S. bambergensis*, *S. violaceoniger* และเชื้อในกลุ่มของ *Ampullariella* sp. เป็นต้น การผลิต thermostable glucoamylase โดยเชื้อ *Streptosporangium* sp. เพื่อนำไปใช้ในการย่อยแป้งในอุตสาหกรรมทำการผลิตเอ็นไซม์โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร starch-Czapek เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอ็นไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ร้อยละ 100 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที การผลิต thermostable α-amylase โดยเชื้อ *Nocardiopsis* sp. เพื่อนำไปใช้ในการย่อยแป้งในอุตสาหกรรม ในการผลิตเอ็นไซม์จะทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร starch-Czapek เลี้ยงไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมงโดยเอ็นไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ร้อยละ 100 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และร้อยละ 50 ที่ 90 องศาเซลเซียส 10 นาที (Stamford *et al.*, 2001) และการศึกษาความสามารถในการย่อยสลาย 1,4-dioxane ที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมโดยเชื้อ *Amycolata* sp. CB 1190. สามารถกำจัด 1,4-dioxane 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของดิน ได้หมดภายใน 45 และ 26 วันตามลำดับ (Kelley *et al.*, 2001)

3. ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ได้

เชื้อแอคติโนมัยซิสบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เช่นมีรายงานที่บอกว่าเชื้อสกุล *Nocardia* บางสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 12 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลลูโลสที่ใช้ไปและยังมีเชื้อแอคติโนมัยซิสที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ คือ *Frankia* นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสามารถของเชื้อ *Streptosporangium* ที่แยกได้จากดินที่เป็นกรดในการละลายหิน

ฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ โดยเชื้อในกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดโดยการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งสามารถละลายหินฟอสเฟตได้ (Caroline *et al*, 1997)

4. ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

เชื้อแอคติโนมัยซิสเป็นจุลินทรีย์สำคัญที่สามารถผลิตสารเมทาโบไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดได้แก่ สารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส ที่มีความสำคัญต่อการแพทย์และเภสัชกรรม นอกจากนั้นยังสามารถผลิตสารฆ่าแมลง สารปราบวัชพืช รวมไปถึงสารต้านมะเร็ง และสารกดระบบภูมิคุ้มกัน จากข้อมูลของ Antibiotic Literature Database (ABL) รายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสร้างโดยจุลินทรีย์ทั้งหมด 23,000 ชนิด พบว่าผลิตมาจากเชื้อราร้อยละ 42, Streptomyces ร้อยละ 32.1, แบคทีเรียอื่นๆ ร้อยละ 10.8 และแอคติโนมัยซิสที่หายากร้อยละ 15.1 ถ้าพิจารณาเฉพาะ Antimicrobial ที่มีอยู่ 8,000 ชนิด พบว่าผลิตจาก Streptomyces ร้อยละ 45.6, เชื้อราร้อยละ 21.5, แบคทีเรียร้อยละ 16.9 และแอคติโนมัยซิสที่หายากร้อยละ 16 ซึ่งแบ่งเป็น Micromonosporaceae ร้อยละ 38.1, Pseudonocardiaceae ร้อยละ 15, Thermomonosporaceae ร้อยละ 14, Nocardia 11 Streptosporangiaceae ร้อยละ 6, Nocardioides ร้อยละ 2.6 และอื่นๆ อีกร้อยละ 13.3 (Lazzarini *et al.*, 2000) สารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อ แอคติโนมัยซิสสกุล *Streptomyces* หลายชนิดและหลายสายพันธุ์ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย เช่น ampicillin และ penicillin-N ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบต้า แลคแทมที่มีสมบัติยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย สารที่มีสมบัติต่อต้านเชื้อราได้แก่ nystatin, polyoxin และ anthracycline เป็นต้นโดย anthracycline นอกจากเป็นสารต่อต้านเชื้อราแล้วยังเป็นสารต่อต้านมะเร็งได้ด้วย โดยจะไปยับยั้งเอ็นไซม์ topoisomerase ชนิดที่ 2 ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได้ (Goodfellow *et al.*, 1988) สาร echinosporin ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง และยังมีผลต่อการยืดอายุของหนูทดลองที่ปลูกเซลล์มะเร็ง (Morimoto and Imai, 1985) สารที่มีสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงได้แก่สารในกลุ่ม macrolide เช่น avermectin สารฆ่าวัชพืช เช่น phosphinothricin สารกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) เช่น rapamycin และสารต่อต้านมะเร็ง เช่น limocrocin ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค (Goodfellow *et al.*, 1988) สารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซิสที่หายากประมาณ 1,000 ชนิด สร้างจาก *Micromonospora* 400 ชนิด, สร้างจาก *Nocardia* 270 ชนิด, สร้างจาก *Actinomadura* 170 ชนิด, สร้างจาก *Actinoplanes* 150 ชนิด, สร้างจาก *Saccharopolyspora* 50 ชนิด และ สร้างจาก *Streptosporangium* 40 ชนิด (Ruan, 1994) ที่สร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซิสที่หายากที่มีผลิตเป็นการค้าแล้วได้แก่ rifamycins ที่ผลิตจากเชื้อ *Amycolatopsis mediterranei* สาร Erythromycin จากเชื้อ *Saccharopolyspora erythraea* สาร Teicoplanin จากเชื้อ *Actinoplanes teichomyceticus* สาร Vancomycin จากเชื้อ *Amycolatopsis orientalis* และสาร Gentamicin จากเชื้อ *Micromonospora purpurea* (Lazzarini *et al.*, 2000) และได้มีการวิจัยและค้นพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ประมาณ 30 ชนิด

จากเชื้อแอคติโนมัยซิสในกลุ่ม *Actinoplanetes* และ *Maduromycetes* สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ นี้มีอยู่หลายชนิด เช่น semduramicin ซึ่งเป็นสารประกอบ polyether ที่พัฒนาและผลิตเป็นการค้าในประเทศอังกฤษ (Ruan, 1994) สารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากเชื้อ *Actinomadura pulvercea* sp. nov. no 6049 โดยสารประกอบดังกล่าวคือ FR-900405 และ FR-900406 เป็นสารที่มีซัลเฟอร์อยู่ในส่วนของโมเลกุล สามารถยับยั้งการเจริญของมะเร็งในหนูทดลองได้ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบรวมทั้งเชื้อราด้วย

จุลินทรีย์เศรษฐกิจที่สำคัญคือเห็ด และแบคทีเรียชั้นสูงบางชนิด ซึ่งมีการกระจายมากในเขตร้อน ปัจจุบันประเทศไทยพบเห็ดประมาณ 3,000 ชนิด และคาดว่าในประเทศจะมีเห็ดอยู่ไม่น้อย กว่าร้อยละ 50 ของชนิดเห็ดที่พบทั่วโลก โดยเฉพาะเห็ดในกลุ่ม Basidiomycota ที่มีจำนวนชนิดมาก และแบคทีเรียชั้นสูงที่ปะปนอยู่ในดินของป่าที่อุดมสมบูรณ์อีกจำนวนไม่น้อย โดยประโยชน์ของจุลินทรีย์เศรษฐกิจเหล่านี้ได้แก่การนำมารับประทาน การอนุรักษ์ และการพัฒนาค้นคว้าสารสำคัญเพื่อใช้ทางยา และการเกษตรในพื้นที่ป่าของศูนย์การศึกษายังไม่ได้ทำการศึกษาถึงจุลินทรีย์ดังกล่าวเลย จึงมีความสนใจในการสำรวจและเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์นี้ด้วย

วารุณี และคณะ (2547) ได้ศึกษาสำรวจรวบรวมข้อมูลความหลากหลายของเชื้อราในป่าภาคเหนือตอนบนมุ่งเน้นในชนิดที่กินได้และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ รวมถึงการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเห็ดในกลุ่มเอกโตไมคอไรซาที่ได้รับความนิยมในการรับประทาน 12 ชนิด จากนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกเห็ดเอกโตไมคอไรซา เห็ดห้า และเห็ดเผาะ เพื่อทำการศึกษาหาสภาพเหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตของเห็ดทั้งสองชนิด ในการศึกษาหาคุณค่าทางอาหารและทางเศรษฐกิจของเห็ดเอกโตไมคอไรซาที่กินได้ พบว่าโดยรวมแล้วเห็ดมีองค์ประกอบของโปรตีนร้อยละ 14.0-24.2 ไขมันร้อยละ 2.7-9.5 เส้นใยร้อยละ 8.3-16.8 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 41.6-65.1 ของน้ำหนักแห้ง มีองค์ประกอบของน้ำตาล คือ D-glucose, D-fructose, trehalose, D-mannose, D-arabinose, D-xylose, D-fucose, L-rhamnose และ D-galactose และพบองค์ประกอบของน้ำตาลแอลกอฮอล์ คือ mannitol, glycerol, myo-inositol, meso-erythritol, D-arabitol, dulcitol, xylitol และ D-sorbitol เห็ดเผาะหรือเห็ดถอบ เป็นเห็ดรับประทานได้ชนิดหนึ่งซึ่งพบทั่วไปในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยจะพบในต้นฤดูฝนเท่านั้น เห็ดเผาะเป็นเห็ดที่มีผู้นิยมรับประทานกันมากและมีราคาแพง เป็นเห็ดที่จัดอยู่ในอันดับ Lycoperdales วงศ์ Lycoperdaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Astrearus hygrometricus* โดยจะรับประทานเห็ดชนิดนี้ในขณะที่ยังอ่อนอยู่ เห็ดเผาะเป็นเห็ดที่ขึ้นอยู่ใต้ผิวดินเหมือนเห็ดโคน และมักจะพบในป่าที่เรียกว่า ป่าแพะ หรือป่าไม้เต็ง-รัง และพลวง โดยจะออกดอกในช่วงต้นฤดูฝนที่มีอากาศอบอ้าวอยู่หลายวันก่อนฝนตก ในภาคเหนือจะพบมากในช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน ดอกเห็ดที่พบอยู่ตามธรรมชาตินั้นจะโผล่ออกมาให้เห็นเพียงเศษหนึ่งส่วนสาม

จุลินทรีย์หลายชนิดมีกลไกต้านจุลชีพก่อโรคด้วยการสร้างและหลั่งสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญรวมถึงฆ่าจุลชีพก่อโรคต่างๆ ได้แก่ กรดแลคติก อาทิ การศึกษาของ Jin และคณะ (Jin et al., 1996)

ศึกษาแลคโตบาซิลลัสที่ผลิตกรดอินทรีย์ (organic acid) ต่างๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pullorum* และ *Salmonella typhimurium* เป็นต้น กรดอะซิติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (Drider et al., 2006) ซึ่งเป็นสารจำพวกโปรตีนที่แลคโตบาซิลลัสผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อยับยั้งการเจริญรวมถึงฆ่าแบคทีเรีย (Servin, 2004) พบว่าโปรตีนแบคเทอริโอซินจะมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้มากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิด โครงสร้าง ขนาดของโปรตีนและจุลชีพเป้าหมาย ในปี ค.ศ. 1993 Klaenhammer (Klaenhammer, 1993) ได้กำหนดชนิดของโปรตีนแบคเทอริโอซินได้ 3 class ได้แก่ class ที่ 1 bacteriocins ที่มีลักษณะเป็นสารเปปไทด์สายสั้นขนาดไม่เกิน 5 กิโลดาลตัน ภายในสายเปปไทด์ประกอบด้วย lanthionine และ β-methylanthionine เช่น Acidocin B ที่แยกได้จาก *L. acidophilus* M46 เป็นต้น class ที่ 2 bacteriocins ที่มีลักษณะเป็นสายเปปไทด์สายสั้น ขนาด 5-30 กิโลดาลตัน โดยไม่มี lanthionine และเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อน เช่น Plantaricin C ที่แยกได้จาก *L. plantarum* (Gonzalez et al, 1994) หรือ Curvaticin FS47 ที่แยกได้จาก *Lactobacillus curvatus* FS47 (Garver et al, 1994) เป็นต้น และ class ที่ 3 bacteriocins ที่มีลักษณะเป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ไม่ทนความร้อน ขนาดมากกว่า 30 กิโลดาลตัน เช่น Helveticin J ที่แยกได้จาก *L. helveticus* 481 (Joerger et al, 1986) กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินนั้น พบว่าออกฤทธิ์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย โดยใช้ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ไม่ละลายน้ำของเปปไทด์ (hydrophobic peptide) แทรกผ่านชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยแรงเคลื่อนที่ประจุบวกของกรดอะมิโน เรียกว่า proton motive force (PMF) ที่ทำให้เกิดรูช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย (Bruno et al, 1993) ทำให้แบคทีเรียเป้าหมายนั้นสูญเสียคุณสมบัติการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) โพแทสเซียมรั่วออกจากเซลล์ (potassium efflux) รวมถึงแบคทีเรียเป้าหมายสูญเสียพลังงานในการดำรงชีวิตและเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารพันธุกรรมทั้งดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน นอกจากนี้ยังมีกลไกในการแย่งเกาะพื้นผิวเนื้อเยื่อจากจุลชีพก่อโรค การแย่งใช้สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อก่อโรค (Forestier et al, 2001) อีกด้วย

Prebiotics

Prebiotics คือ สารหรือองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหารมีประโยชน์ คือช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตอย่างจำเพาะต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร prebiotics บางชนิดมีตำแหน่งจับจำเพาะสำหรับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) เช่น *Salmonella* และ *E. coli* ซึ่งต่อมาจะถูกกำจัดออกจากระบบทางเดินอาหารไปกับอุจจาระ ในขณะที่ prebiotics ชนิดอื่นๆ ก็กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli โดยการเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรีย ทำให้ลำไส้เกิดความสมดุลและยังช่วยเพิ่มการนำสารอาหารไปใช้ด้วย

ประเภทของ prebiotics

สารที่สามารถจัดเป็น prebiotics ได้นั้น จะต้องมีลักษณะอย่างน้อย 3 ประการ คือ สารนั้นจะต้องไม่ถูกย่อยหรือดูดซับในกระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็ก สารนั้นจะต้องจำเพาะกับแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ เช่น Bifidobacteria และการหมักของสารนั้น ควรมีการกระตุ้นที่เป็นประโยชน์ต่อ host ซึ่งสามารถแบ่งประเภทของ prebiotics ได้ดังนี้

1. Alcohol sugar

จัดเป็นคาร์โบไฮเดรททีมีดัชนีการสังเคราะห์โพลิเมอร์ (degree of polymerization) เพียง 1-2 ตัว ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น maltitol, sorbitol, isomalt, xylitol เป็นต้น ในบางครั้งจะเรียก alcohol sugar ว่า polyols สามารถเป็นสารให้ความหวานได้ โดยมีความหวานประมาณ 3 ใน 4 หรือครึ่งหนึ่งของน้ำตาลทั่วไป และยังดูดซับได้ช้าในลำไส้เล็กเมื่อเทียบกับน้ำตาล จึงทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ด้วย

2. Resistant starch

จัดเป็น polysaccharides ซึ่งจะไม่ถูกดูดซับในลำไส้เล็ก ประกอบด้วย amylase ประมาณร้อยละ 20-25

3. Non-starch polysaccharides (NSP)

เป็นสารที่ได้รับจากพืช เช่น pectin, cellulose, hemicellulose, guar และ xylan

4. Inulin

เป็นสาร polysaccharides ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหารพบในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด เช่น Chicory root เห็ด หัวหอม หัวกระเทียม กล้วย เป็นต้น

5. Sugar and Oligosaccharides

สำหรับ prebiotics ในกลุ่มนี้ จัดเป็น short-chain polysaccharide ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2 ถึง 20 หน่วย ตัวอย่างเช่น raffinose, stachyose, fructooligosaccharides (FOS) ซึ่งจัดเป็น non-digestible oligosaccharide นอกจากนี้ยังมี lactose, lactulose, galacto-oligosaccharide (GOS), soybean oligosaccharide, lactosucrose, isomalto-oligosaccharide, gluco-oligosaccharides, xylo-oligosaccharides และ palatinose ที่สามารถจัดเป็น prebiotics ได้ด้วย

6. Mucin glycoproteins

ถูกสร้างโดย goblet cells ที่อยู่ในเยื่อบุผิวลำไส้และเป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการหมักในลำไส้

7. Related mucopolysaccharides

ตัวอย่างเช่น chondroitin sulphate, heparin, pancreatic และ bacterial secretions ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีไว้สำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้

8. **Protein and peptides**

สารเหล่านี้สร้างขึ้นในอาหาร สร้างโดยการหลั่งของตับอ่อนหรือสร้างโดยแบคทีเรีย แต่จะมีปริมาณน้อยกว่าพวกคาร์โบไฮเดรท

ประโยชน์ของ Prebiotics

FOS และ inulin จะไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและในลำไส้เล็กของมนุษย์ เพราะมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β (2-1) แต่เอนไซม์ที่ใช้ย่อยในมนุษย์เช่น sucrase, maltase-isomaltase และ alphaglucosidase นั้น มีความจำเพาะสำหรับ β – glycosidic linkage ดังนั้น FOS จึงเป็น oligosaccharide ที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ อย่างไรก็ตาม FOS และ inulin จะถูกหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ให้เป็น short chain fatty acid (SCFA) ซึ่ง SCFA ที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้ pH ลดลงมีผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของ pathogenic bacteria นอกจากนี้ butyrate ที่เกิดขึ้นจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต หยุดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และช่วยเพิ่มการตายตามธรรมชาติของเซลล์ (apoptosis) ซึ่งคุณสมบัติทั้ง 3 นี้อาจมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดมะเร็งได้ และยังพบว่า FOS ช่วยให้มีการเพิ่มความเข้มข้นของ calcium และ magnesium ในลำไส้ใหญ่ ทำให้มีการดูดซับแร่ธาตุได้ดีขึ้นและยังทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นให้กับ epithelial cell ในลำไส้ที่สูงขึ้น จะช่วยให้เกิด insoluble bile หรือเกลือของกรดไขมัน ซึ่งจะช่วยลดอันตรายจากผลของ bile หรือกรดไขมันที่มีต่อเซลล์ในลำไส้ใหญ่ (colonocytes) ได้ และความเข้มข้นของ cation ที่สูงขึ้นในลำไส้ใหญ่นี้ อาจช่วยควบคุมอัตราการแบ่งตัวและการตายของเซลล์ (cell turnover) ได้ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า inulin ยังช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อีกด้วย

มีรายงานการใช้ prebiotics ในการช่วยลดความเป็นพิษต่อยีน (antigenotoxicity) ที่เกิดจากน้ำอุจจาระ (ทำให้เกิดการทำลายของ DNA) ว่า เมื่อมีการนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการบ่มเชื้อ probiotic ร่วมกับ prebiotic มาเลี้ยง HT29 human adenocarcinoma cells มีผลทำให้เซลล์นี้มีความต้านทานต่อน้ำอุจจาระได้มากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้ FOS, inulin, raftiline, raftilose และ actilight จะได้ผลดีที่สุดและได้ผลเล็กน้อยเมื่อ galactooligosaccharide และ maltodextrin

ในปัจจุบันพบว่า inulin มีประโยชน์ในการดูดซึมแร่ธาตุ มีผลช่วยลดไขมันในเลือด โดยมีรายงานการให้สารสกัดจาก chicory (ซึ่งเป็นแหล่งผลิต inulin) และ inulin กับหนู เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจาก chicory และหนูที่ได้รับ inulin มีปริมาณ HDL เพิ่มขึ้นและมีปริมาณ LDL ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้หนูกลุ่มที่ได้รับ inulin ร้อยละ 5 ยังมีปริมาณกรด propionic สูงกว่าด้วย

นอกจากนี้ inulin ยังมีแคลอรี่ต่ำ และมีความหวานน้อย จึงมีการนำมาใช้กับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้เพราะ inulin ไม่ถูกดูดซึมจึงไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดและอาจนำมาผลิตเป็นสารอาหารลดความอ้วนได้อีกด้วย

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

การศึกษาที่ 1 การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซิสในดินที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพได้

1. คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสในดินเพื่อค้นหาสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพเพื่อนำสารที่ได้มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

จากการเก็บตัวอย่างดินในแต่ละพื้นที่สำรวจขนาด 4 ตารางเมตร จำนวน 120 พื้นที่ จากนั้นแยกหิน กรวด ตะกอนใหญ่ออก นำมาตัวอย่างดินแห้งมาละลายในอัตราส่วน 1 กรัมต่อน้ำปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร รอให้ตกตะกอนดิน และทราย ก่อนนำส่วนน้ำมากรองบนแผ่นเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน ชะล้างเชื้อบนแผ่นเมมเบรน และเจือจางลง 10000 เท่า (10^4) ก่อนนำ 100 ไมโครลิตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch-casein-nitrate-agar medium ที่ผสม cyclohexamide ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะภายใต้สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเจริญเป็นโคโลนีแล้วจึงนำแต่ละโคโลนีมาย้อมแกรมเพื่อตรวจหาเซลล์แอคติโนมัยซิส และเก็บรักษาในอาหารเก็บรักษาเชื้อที่มี glycerol ณ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษา

2. เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิสแต่ละสายพันธุ์ที่เก็บมาได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract-glucose broth ภายใต้สภาวะ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาแยกเซลล์ออกเพื่อนำน้ำเพาะเลี้ยงมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

ทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) โดยการหยดน้ำเพาะเลี้ยงทดสอบลงใน stainless steel cup ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่ตั้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่กระจายเชื้อด้วยไม้ปลายพันสำลีทั่วจานเพาะเลี้ยง

บ่มเพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.1 ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*

เชื้อทดสอบได้แก่เชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน ATCC 25923 และเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่อีก 24 ไอโซเลท

ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อเพื่อจำแนกเชื้อออกเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา (MSSA) และสายพันธุ์ที่ดื้อยาเมธิซิลลิน (MRSA) ด้วยวิธี agar-disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar

การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อนี้ใช้ยาทดสอบคือ

Cefoxitin	30 ไมโครกรัม
Vancomycin	30 ไมโครกรัม
Erythromycin	15 ไมโครกรัม

Clindamycin 2 ไมโครกรัม

ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบ inhibition zone กับตารางแปลผลความไวต่อยาดังข้างล่าง

ตาราง 3.1 การแปลผลความไวต่อยาของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ยาทดสอบ	**ปริมาณยา**	**ขอบเขตการยับยั้ง (มิลลิเมตร)**		
		ไว	**กึ่งดื้อ**	**ดื้อ**
Cefoxitin (FOX)	30 ไมโครกรัม	≥ 22	-	≤ 21
Vancomycin (VAN)	30 ไมโครกรัม	≥ 15	-	≤ 14
Erythromycin (E)	15 ไมโครกรัม	≥ 23	14-22	≤ 13
Clindamycin (CL)	2 ไมโครกรัม	≥ 21	15-20	≤ 14

3.2 ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis*

เชื้อทดสอบได้แก่เชื้อ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน ATCC 29212 และเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่อีก 24 ไอโซเลท

ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อเพื่อจำแนกเชื้อออกเป็น *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด ด้วยวิธี agar-disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar

การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อนี้ใช้ยาทดสอบคือ

Penicillin 10 ยูนิต

Vancomycin 30 ไมโครกรัม

Levofloxacin 5 ไมโครกรัม

Gentamicin 120 ไมโครกรัม

ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบ inhibition zone กับตารางแปลผลความไวต่อยาดังข้างล่าง

ตาราง 3.2 การแปลผลความไวต่อยาของเชื้อ *Enterococcus faecalis*

ยาทดสอบ	**ปริมาณยา**	**ขอบเขตการยับยั้ง (มิลลิเมตร)**		
		ไว	**กึ่งดื้อ**	**ดื้อ**
Penicillin (P)	10 ยูนิต	≥ 15	-	≤ 14
Vancomycin (VAN)	30 ไมโครกรัม	≥ 17	15 – 16	≤ 14
Levofloxacin (LEV)	5 ไมโครกรัม	≥ 17	14 - 16	≤ 13
Gentamicin (C)	120 ไมโครกรัม	≥ 10	7 – 9	≤ 6

3.3 ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Escherichia coli*

เชื้อทดสอบได้แก่เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน ATCC 25922 และเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่อีก 24 ไอโซเลท

ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อเพื่อจำแนกเชื้อออกเป็นเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และสายพันธุ์ที่ดื้อยาจากการสร้าง beta lactamase ชนิดออกฤทธิ์ขยาย (extended-spectrum beta lactamase หรือ ESBL) ด้วยวิธี agar-disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar

การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อนี้ใช้ยาทดสอบคือ

Amoxicillin/Clavulanic acid 20/10 ไมโครกรัม

Cefotaxime 30 ไมโครกรัม

Ceftazidime 30 ไมโครกรัม

Imipenem 10 ไมโครกรัม

ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบ inhibition zone กับตารางแปลผลความไวต่อยาดังข้างล่าง

ตาราง 3.3 การแปลผลความไวต่อยาของเชื้อ *Escherichia coli*

ยาทดสอบ	**ปริมาณยา**	**ขอบเขตการยับยั้ง (มิลลิเมตร)**		
		ไว	**กึ่งดื้อ**	**ดื้อ**
Amoxicillin/ Clavulanic acid (AMC)	20/10 ไมโครกรัม	≥ 18	14 - 17	≤ 13
Cefotaxime (CTX)	30 ไมโครกรัม	≥ 23	15 - 22	≤ 14
Ceftazidime (CAZ)	30 ไมโครกรัม	≥ 18	15 - 17	≤ 14
Imipenem (IMP)	10 ไมโครกรัม	≥ 16	14 - 15	≤ 13

3.4 ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

เชื้อทดสอบได้แก่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน ATCC 27853 และเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่อีก 24 ไอโซเลท

ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อเพื่อจำแนกเชื้อออกเป็นเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด ด้วยวิธี agar-disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar

การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อนี้ใช้ยาทดสอบคือ

Colistin	10 ไมโครกรัม
Piperacillin/tazobactam	100/10 ไมโครกรัม
Ceftazidime	30 ไมโครกรัม
Meropenem	30 ไมโครกรัม

ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบ inhibition zone กับตารางแปลผลความไวต่อยาดังข้างล่าง

ตาราง 3.4 การแปลผลความไวต่อยาของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

ยาทดสอบ	**ปริมาณยา**	**ขอบเขตการยับยั้ง (มิลลิเมตร)**		
		ไว	**กึ่งดื้อ**	**ดื้อ**
Colistin (CT)	10 ไมโครกรัม	≥ 11	-	≤ 10
Piperacillin/ tazobactam (PTZ)	100/10 ไมโครกรัม	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Ceftazidime (CAZ)	30 ไมโครกรัม	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Meropenem (MEM)	10 ไมโครกรัม	≥ 19	16 - 18	≤ 15

3.5 ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

เชื้อทดสอบได้แก่เชื้อ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน ATCC 25922 และเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่อีก 24 ไอโซเลท

ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อเพื่อจำแนกเชื้อออกเป็นเชื้อ *Acineto bacter baumannii* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด ด้วยวิธี agar-disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar

การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อนี้ใช้ยาทดสอบคือ

Meropenem	10 ไมโครกรัม
Piperacillin/tazobactam	100/10 ไมโครกรัม
Ceftazidime	30 ไมโครกรัม
Amikacin	30 ไมโครกรัม

ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบ inhibition zone กับตารางแปลผลความไวต่อยาดังข้างล่าง

ตาราง 3.5 การแปลผลความไวต่อยาของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

ยาทดสอบ	**ปริมาณยา**	**ขอบเขตการยับยั้ง (มิลลิเมตร)**		
		ไว	**กึ่งดื้อ**	**ดื้อ**
Meropenem (MEM)	10 ไมโครกรัม	≥ 16	14 - 15	≤ 13
Piperacillin/ tazobactam (PTZ)	100/10 ไมโครกรัม	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Ceftazidime (CAZ)	30 ไมโครกรัม	≥ 21	18 - 20	≤ 17
Amikacin (AK)	30 ไมโครกรัม	≥ 17	15 - 16	≤ 14

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี agar dilution เทียบกับสารสกัดแบคเทอริโอซินจากเชื้อแลคโตบาซิลลัส เจนเซนนิไอ สายพันธุ์ cmu011 ที่ได้ศึกษาแล้วว่าแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และอาหารเหลว tryptic soy broth (TSB) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก และลบ ตามลำดับ นำน้ำเพาะเลี้ยงปราศจากเชื้อมาเจือจางทุกๆ 2 เท่าแล้วด้วยอาหารเหลว TSB มากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง ก่อนหยดเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ลงบนจานดังกล่าว บ่มเพาะที่อุณหภูมิที่เหมาะสม อ่านผลการเจริญเป็นโคโลนีของเชื้อ บันทึกผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถเชื้อทดสอบได้ (Minimal Bactericidal Concentration)

การศึกษาที่ 2 การพัฒนาสูตรผงเห็ดระโงกขาวป่นแห้ง เป็นสารอาหารสำคัญของเชื้อแลคโตบาซิลลัสเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลลัส

ขั้นตอนการศึกษา

1. บดดอกเห็ดให้ละเอียด แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นอีกครั้งเพื่อให้ได้ขนาดของเห็ดที่เล็กจนละเอียดที่สุด นำไป autoclave แล้วนำสารแขวนลอยที่ได้พร้อมตะกอนมาเติมในสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลลัส
2. เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลลัสในสูตรอาหารดั้งเดิม และสูตรอาหารใหม่ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดโปรตีนด้วยวิธีการแยกผ่านแผ่นกรองขนาดกรองโปรตีนขนาด 10 กิโลดาลตัน
3. เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านจุลชีพระหว่างการเลี้ยงแลคโตบาซิลลัสในสูตรอาหารดั้งเดิม กับสูตรอาหารที่มีส่วนผสมเห็ดอยู่ด้วย คัดเลือกสภาวะที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพดีที่สุด เช่นเดียวกันกับในการศึกษาที่ 1 มาศึกษาอิทธิพลของส่วนผสมเห็ดในสูตรอาหารต่อฤทธิ์ต้านจุลชีพ

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การศึกษาที่ 1 การศึกษาจุลินทรีย์ในดินที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพได้

จากการศึกษาปีที่ผ่านมา ได้สำรวจจุลินทรีย์ในดิน ผลการศึกษาพบความหลากหลายของ แอคติโนมัยซิสในดินเป็นจำนวนมาก สามารถคัดแยกไอโซเลทของเชื้อนี้ได้ถึง 18,325 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อก่อโรคในคน การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิดคือ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, และ *A. baumannii* สายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน ATCC 25922, 27853, 10031, 19606 ตามลำดับ ผลการทดสอบปรากฏดัง**ตาราง 4.1**

ตาราง 4.1 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซิสที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค 4 ชนิด (จากทั้งหมด 18,325 ไอโซเลท)

เชื้อแอคติโนมัยซิส	**จำนวนเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้ง**	**ร้อยละของจำนวนเชื้อ**
ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*	16,420	89.60
ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa*	13,445	73.37
ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *K. pneumoniae*	12,641	68.98
ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. baumannii*	17,325	94.54
ที่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 4 ชนิด	11,987	65.41

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซิสทั้ง 11,987 ไอโซเลท มาเปรียบเทียบฤทธิ์แล้วพบอยู่ 4 ไอโซเลทที่แสดงฤทธิ์ได้สูงสุด คือ A12/145, A22/236, A42/136 และ A67/204 โดยพบต่อไปว่าไอโซเลท A67/204 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบได้เป็นที่น่าพอใจที่สุด

สำหรับการทดสอบคุณลักษณะของสารต้านแบคทีเรียก่อโรคนี้ พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำเพาะเลี้ยงสูญเสียไป เมื่อนำน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ แอคติโนมัยซิสไอโซเลทนี้มาผสมกับ NaOH และเมื่อผสมกับเอ็นไซม์โปรติเอสที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ โปรติเนส และทริปซิน (**ตาราง 4.2**) แสดงว่าสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อนี้น่าจะเป็นสารประกอบโปรตีนที่ออกฤทธิ์ได้ดีในสภาวะกรด ดังนั้นจึงได้ดำเนินการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และกำจัดเกลือออก เพื่อที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์คงเหลืออีกครั้งดังแสดงใน**ตาราง 4.3**

ตาราง 4.2 การศึกษาคุณลักษณะของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิส ไอโซเลท A67/204 ต่อเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ทดสอบ U226

สภาวะทดสอบ	**ขนาดของขอบเขตการยับยั้ง (มิลลิเมตร)**
ปกติ	26
pH 4	27
pH 5	25
pH 6	25
pH 7	23
pH 8	16
pH 9	9
pH 10	7
60°ซ	25
70°ซ	25
80°ซ	26
90°ซ	25
100°ซ	25
121°ซ	25
โปรติเนส	8
ทริปซิน	8

ตาราง 4.3 เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ และโปรตีนสกัดจากน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิส ไอโซเลท A67/204 ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 4 ชนิด

สาร	**ขนาดของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร)**			
	E.coli	*P.aeruginosa*	*K. pneumoniae*	*A.baumannii*
น้ำเพาะเลี้ยง	26	22	24	25
โปรตีนสกัด	24	18	23	23

จาก**ตาราง4.3** พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียลดลงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำเพาะเลี้ยงกับโปรตีนสกัด ซึ่งอาจสรุปได้ว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียส่วนใหญ่มาจากโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิส โปรตีนสกัดหยาบ และสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิส โปรตีนสกัดหยาบ และสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำไปศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค พบว่าสารทดสอบทั้ง 3 แสดงฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงผลดังต่อไปนี้

1. ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าเชื้อ MSSA และ MRSA นี้มีรูปแบบของ antibiogram ดัง **ตาราง 4.4**

ตาราง 4.4 จำนวน และร้อยละของไอโซเลททดสอบของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

Antibiograms	จำนวน (ร้อยละ) ของไอโซเลท
MSSA (FOX^{S}VAN^{S}E^{S}CL^{S})	11 (44.00)
MRSA (FOX^{R}VAN^{S}E^{S}CL^{R})	11 (44.00)
MRSA (FOX^{R}VAN^{S}E^{R}CL^{R})	3 (12.00)

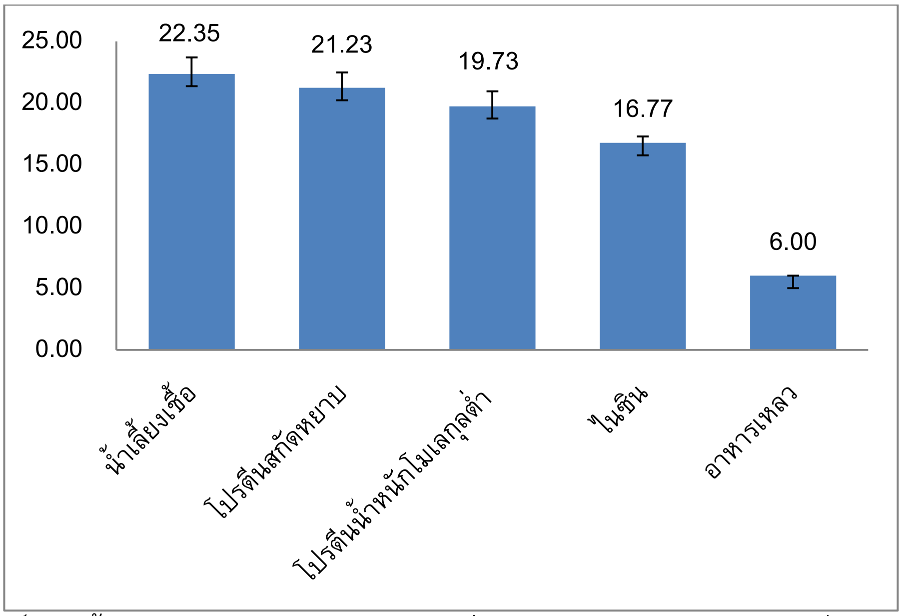
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ MSSA และ MRSA ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับสาร nisin และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แสดงผลดัง**ตาราง 4.5**

ตาราง 4.5 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ			Nisin	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	โปรตีนสกัดหยาบ	โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ		
ATCC 25923	24	23	21	17	6
MSSA 01	22	22	22	17	6
MSSA 02	23	22	21	16	6
MSSA 03	24	22	19	17	6
MSSA 04	25	22	21	17	6
MSSA 05	22	21	20	17	6
MSSA 06	23	22	19	16	6
MSSA 07	22	22	21	16	6
MSSA 08	23	22	21	17	6
MSSA 09	24	23	19	16	6
MSSA 10	23	22	21	17	6
MSSA 11	24	23	22	17	6
MRSA E^{S}01	21	19	19	17	6
MRSA E^{S}02	20	20	20	17	6

เชื้อทดสอบ	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ			Nisin	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	โปรตีนสกัดหยาบ	โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ		
MRSA E^{S}03	21	19	19	16	6
MRSA E^{S}04	22	20	19	17	6
MRSA E^{S}05	21	21	19	17	6
MRSA E^{S}06	20	20	19	17	6
MRSA E^{S}07	20	19	19	16	6
MRSA E^{S}08	22	20	18	17	6
MRSA E^{S}09	23	22	19	16	6
MRSA E^{S}10	21	20	19	17	6
MRSA E^{S}11	23	21	19	18	6
MRSA E^{R}01	22	22	18	17	6
MRSA E^{R}02	23	21	18	17	6
MRSA E^{R}03	23	22	21	17	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังรูป



ภาพ 4.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เฉลี่ย หน่วยเป็นมิลลิเมตร $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากภาพพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบ และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านเชื้อนี้เกิดจากโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำของเชื้อแอคติโนมัยซิส ไอโซเลท A67/204 เป็นหลัก และให้ผลดีกว่า nisin ซึ่ง

เป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อซึ่งเป็นที่ทราบกันอยู่แล้ว และในการศึกษานี้ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก เมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำแสดงในตาราง 4.6 พบว่ามีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ nisin

ตาราง 4.6 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**	**nisin**
ATCC 25923	7.81	15.62
MSSA 01	7.81	31.25
MSSA 02	3.90	31.25
MSSA 03	7.81	31.25
MSSA 04	7.81	31.25
MSSA 05	7.81	31.25
MSSA 06	7.81	31.25
MSSA 07	3.90	31.25
MSSA 08	7.81	31.25
MSSA 09	7.81	31.25
MSSA 10	7.81	31.25
MSSA 11	7.81	31.25
MRSA E^S01	7.81	31.25
MRSA E^S02	7.81	31.25
MRSA E^S03	7.81	31.25
MRSA E^S04	7.81	31.25
MRSA E^S05	7.81	31.25
MRSA E^S06	7.81	31.25
MRSA E^S07	7.81	31.25
MRSA E^S08	7.81	31.25
MRSA E^S09	15.62	62.50
MRSA E^S10	7.81	31.25
MRSA E^S11	7.81	31.25
MRSA E^R01	7.81	31.25
MRSA E^R02	7.81	31.25
MRSA E^R03	15.62	31.25
เฉลี่ย	**8.11$\pm$2.45**	**31.85$\pm$6.96**

2. ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis*

ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าเชื้อ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา (EF) และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา (EF M) นี้มีรูปแบบของ antibiogram ดังตาราง 4.7

ตาราง 4.7 จำนวน และร้อยละของไอโซเลททดสอบของเชื้อ *Enterococcus faecalis*

Antibiograms	**จำนวน (ร้อยละ) ของไอโซเลท**
EF ($P^S VAN^S LEV^S C^S$)	13 (48.39)
EF M ($P^R VAN^S LEV^R C^R$)	13 (51.61)

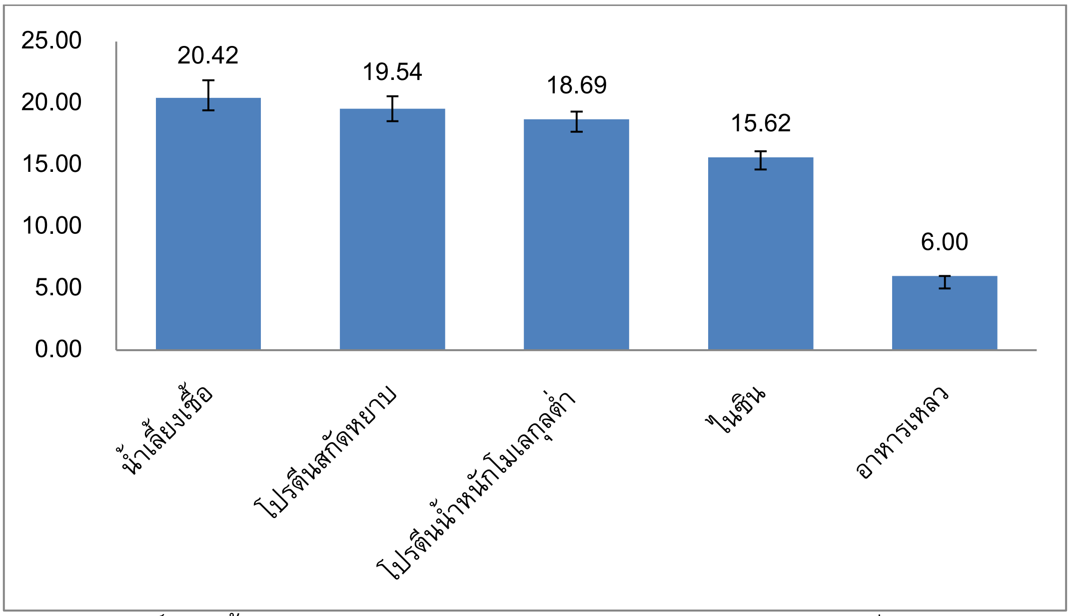
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และ เชื้อ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับสาร nisin และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แสดงดังตาราง 4.8

ตาราง 4.8 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	**ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ**			**Nisin**	**อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว**
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	**โปรตีนสกัดหยาบ**	**โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**		
ATCC 29212	22	21	20	16	6
EF 01	21	19	19	15	6
EF 02	22	19	19	15	6
EF 03	19	19	19	15	6
EF 04	23	22	20	15	6
EF 05	22	20	19	16	6
EF 06	22	20	19	16	6
EF 07	22	21	19	16	6
EF 08	23	20	19	16	6
EF 09	21	21	19	16	6
EF 10	20	19	19	16	6
EF 11	19	18	18	15	6
EF 12	18	18	18	16	6
EF M 01	20	19	19	16	6
EF M 02	19	18	18	16	6
EF M 03	21	20	18	16	6
EF M 04	21	21	19	15	6

เชื้อทดสอบ	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ			Nisin	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	โปรตีนสกัดหยาบ	โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ		
EF M 05	20	19	18	16	6
EF M 06	19	19	18	15	6
EF M 07	19	19	18	16	6
EF M 08	19	19	19	16	6
EF M 09	19	19	18	16	6
EF M 10	19	19	18	15	6
EF M 11	20	20	19	15	6
EF M 12	20	19	18	16	6
EF M 13	21	20	19	15	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังรูป



ภาพ 4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* หน่วยเป็นมิลลิเมตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากรูปพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบ และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านเชื้อนี้เกิดจากโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำของเชื้อแอคติโนมัยซิส ไอโซเลท A67/204 เป็นหลัก และให้ผลดีกว่าnisin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อซึ่งเป็นที่ทราบกันอยู่แล้ว และในการศึกษานี้ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก เมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* ได้ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แสดงใน**ตาราง 4.9** พบว่ามีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ nisin

ตาราง 4.9 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**	**nisin**
ATCC 29212	7.81	15.62
EF 01	7.81	31.25
EF 02	8.81	31.25
EF 03	7.81	15.62
EF 04	7.81	31.25
EF 05	7.81	31.25
EF 06	15.62	31.25
EF 07	7.81	31.25
EF 08	7.81	31.25
EF 09	7.81	15.62
EF 10	7.81	31.25
EF 11	7.81	31.25
EF 12	15.62	31.25
EF M 01	7.81	31.25
EF M 02	7.81	31.25
EF M 03	7.81	31.25
EF M 04	7.81	31.25
EF M 05	7.81	31.25
EF M 06	7.81	31.25
EF M 07	15.62	15.62
EF M 08	7.81	31.25
EF M 09	15.62	62.50
EF M 10	7.81	31.25
EF M 11	7.81	31.25
EF M 12	7.81	62.50
EF M 13	7.81	31.25
เฉลี่ย	**9.05±2.86**	**31.25±10.83**

3. ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Escherichia coli*

ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา (EC) และสายพันธุ์ที่ดื้อยาจากการสร้าง beta lactamase ชนิดออกฤทธิ์ขยาย (EC ESBL) มีรูปแบบ antibiogram ดังตาราง 4.10

ตาราง 4.10 จำนวน และร้อยละของไอโซเลททดสอบของเชื้อ *Escherichia coli*

Antibiograms	**จำนวน (ร้อยละ) ของไอโซเลท**
EC ($AMC^{S}CTX^{S}CAZ^{S}IMP^{S}$)	13 (51.61)
EC ESBL ($AMC^{S}CTX^{R}CAZ^{R}IMP^{S}$)	13 (48.39)

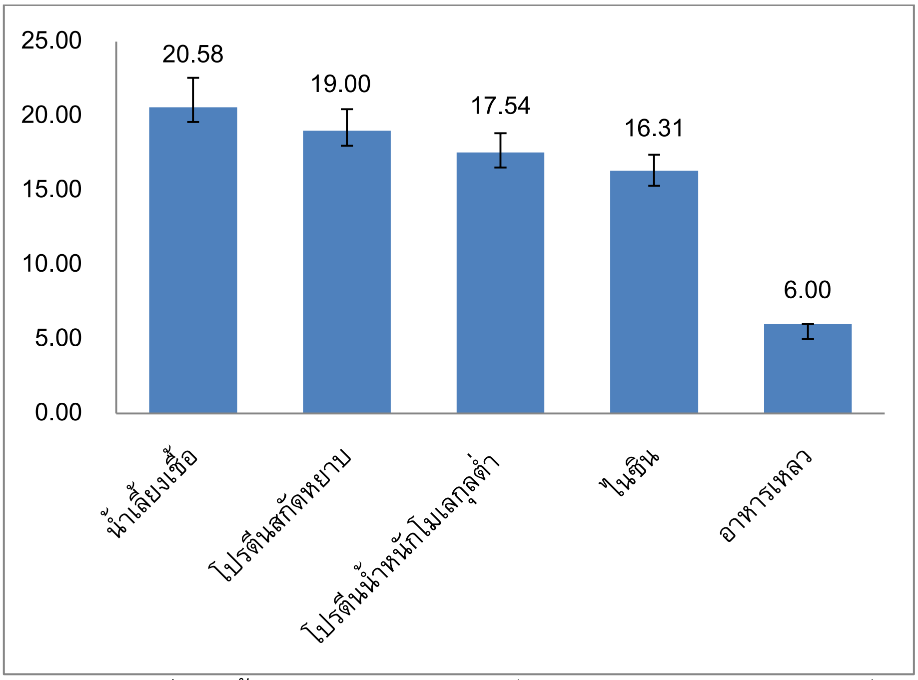
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และ เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่ดื้อยาจากการสร้าง ESBL ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับสาร nisin และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แสดงในตาราง 4.11

ตาราง 4.11 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	**ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ**			**Nisin**	**อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว**
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	**โปรตีนสกัดหยาบ**	**โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**		
ATCC 25922	24	22	19	20	6
EC 01	24	20	18	18	6
EC 02	23	20	18	16	6
EC 03	24	21	19	17	6
EC 04	22	20	19	16	6
EC 05	22	19	18	15	6
EC 06	21	19	18	16	6
EC 07	21	20	19	17	6
EC 08	23	21	19	17	6
EC 09	22	21	19	17	6
EC 10	21	20	18	16	6
EC 11	20	19	19	15	6
EC 12	22	20	18	15	6
EC ESBL 01	20	19	18	17	6
EC ESBL 02	19	19	18	16	6
EC ESBL 03	19	18	17	16	6
EC ESBL 04	20	18	17	16	6

เชื้อทดสอบ	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ			Nisin	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	โปรตีนสกัดหยาบ	โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ		
EC ESBL 05	19	18	17	16	6
EC ESBL 06	18	18	17	17	6
EC ESBL 07	18	17	17	17	6
EC ESBL 08	18	17	16	16	6
EC ESBL 09	18	17	17	16	6
EC ESBL 10	19	17	15	15	6
EC ESBL 11	19	17	15	16	6
EC ESBL 12	20	19	15	15	6
EC ESBL 13	19	18	16	16	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังภาพ



ภาพ 4.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* เฉลี่ย หน่วยเป็นมิลลิเมตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากภาพพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบ และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านเชื้อนี้เกิดจากโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำของเชื้อแอคติโนมัยซิส ไอโซเลท A67/204 และให้ผลดีกว่า nisin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อซึ่งเป็นที่ทราบกันอยู่แล้ว และยังไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อ nisin ด้วยซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวก เมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ได้ของสารสกัดโปรตีน

น้ำหนักโมเลกุลต่ำแสดงใน**ตาราง 4.12** พบว่ายังมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ nisin

ตาราง 4.12 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**	**nisin**
ATCC 25922	15.62	31.25
EC 01	15.62	31.25
EC 02	15.62	31.25
EC 03	31.25	62.50
EC 04	15.62	62.50
EC 05	15.62	31.25
EC 06	31.25	62.50
EC 07	15.62	62.50
EC 08	15.62	31.25
EC 09	15.62	31.25
EC 10	31.25	31.25
EC 11	15.62	31.25
EC 12	15.62	31.25
EC ESBL 01	31.25	62.50
EC ESBL 02	31.25	31.25
EC ESBL 03	31.25	31.25
EC ESBL 04	31.25	62.50
EC ESBL 05	31.25	31.25
EC ESBL 06	31.25	62.50
EC ESBL 07	31.25	31.25
EC ESBL 08	31.25	62.50
EC ESBL 09	15.62	31.25
EC ESBL 10	31.25	62.50
EC ESBL 11	31.25	31.25
EC ESBL 12	31.25	62.50
EC ESBL 13	31.25	31.25
เฉลี่ย	**24.64±7.87**	**43.27±15.50**

4. ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา (PA) และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา (PA M) นี้มีรูปแบบของ antibiogram ดัง**ตาราง 4.13**

ตาราง 4.13 จำนวน และร้อยละของไอโซเลททดสอบของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiograms	**จำนวน (ร้อยละ) ของไอโซเลท**
PA ($CT^{S}PTZ^{S}CAZ^{R}MEM^{S}$)	20 (80.00)
PA M ($CT^{S}PTZ^{R}CAZ^{R}MEM^{S}$)	5 (20.00)

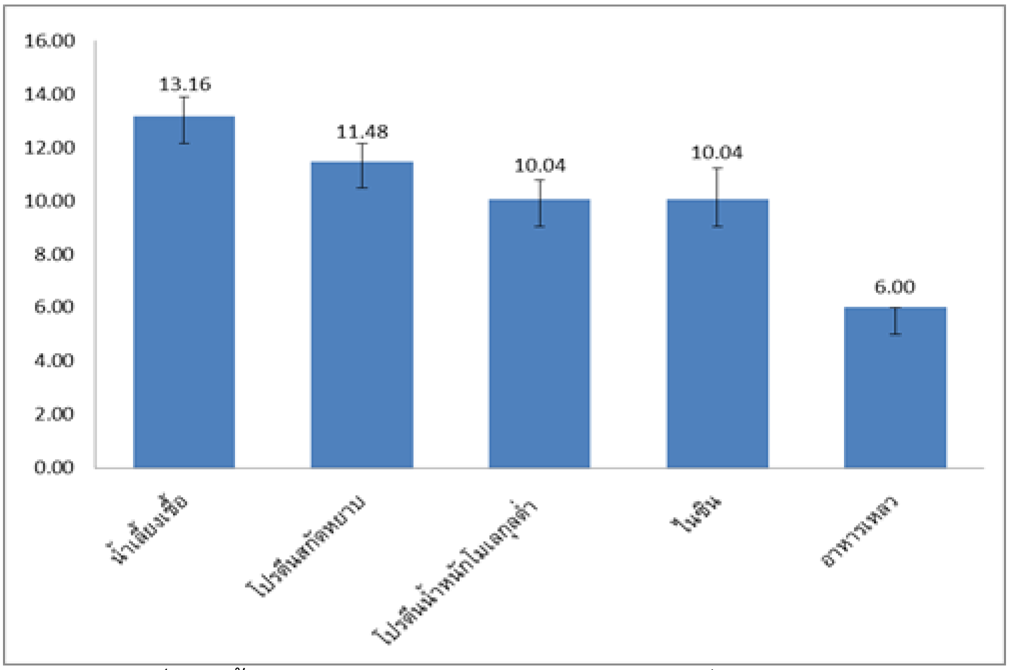
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับสาร nisin และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แสดงใน**ตาราง 4.14**

ตาราง 4.14 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	**ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ**			**Nisin**	**อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว**
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	**โปรตีนสกัดหยาบ**	**โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**		
ATCC 27853	14	12	11	12	6
PA 01	13	11	10	10	6
PA 02	13	11	10	11	6
PA 03	14	11	10	10	6
PA 04	13	11	10	9	6
PA 05	14	12	9	9	6
PA 06	14	12	9	10	6
PA 07	14	12	9	9	6
PA 08	13	13	9	9	6
PA 09	12	11	10	9	6
PA 10	14	12	10	10	6
PA 11	13	12	10	14	6
PA 12	14	12	10	10	6
PA 13	12	12	9	9	6
PA 14	12	12	11	10	6
PA 15	14	12	11	9	6
PA 16	13	11	11	11	6

เชื้อทดสอบ	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ			Nisin	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	โปรตีนสกัดหยาบ	โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ		
PA 17	13	11	11	10	6
PA 18	14	10	10	10	6
PA 19	12	12	10	9	6
PA M 01	12	11	9	10	6
PA M 02	13	11	10	10	6
PA M 03	13	11	10	9	6
PA M 04	13	11	11	11	6
PA M 05	13	11	11	11	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังรูป



ภาพ 4.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เฉลี่ย หน่วยเป็นมิลลิเมตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากภาพพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบและโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อ nisin ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวกด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำแสดงใน**ตาราง 4.15** พบว่ายังมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ nisin

ตาราง 4.15 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**	**nisin**
ATCC 27853	250	500
PA 01	500	500
PA 02	250	500
PA 03	500	500
PA 04	500	500
PA 05	500	500
PA 06	250	500
PA 07	500	500
PA 08	500	500
PA 09	500	500
PA 10	250	250
PA 11	500	500
PA 12	500	500
PA 13	500	500
PA 14	500	500
PA 15	1000	1000
PA 16	500	500
PA 17	500	500
PA 18	500	500
PA 19	500	500
PA M 01	500	500
PA M 02	1000	1000
PA M 03	500	500
PA M 04	500	500
PA M 05	1000	1000
เฉลี่ย	520.00$\pm$203.10	550.00$\pm$176.78

5. ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าเชื้อ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา (AB) และสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา (AB M) นี้มีรูปแบบของ antibiogram ดังตาราง 4.16

ตาราง 4.16 จำนวน และร้อยละของไอโซเลททดสอบของเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

Antibiograms	**จำนวน (ร้อยละ) ของไอโซเลท**
AB ($MEM^S PTZ^S CAZ^S AK^R$)	12 (48.00)
AB M ($MEM^R PTZ^R CAZ^R AK^R$)	13 (52.00)

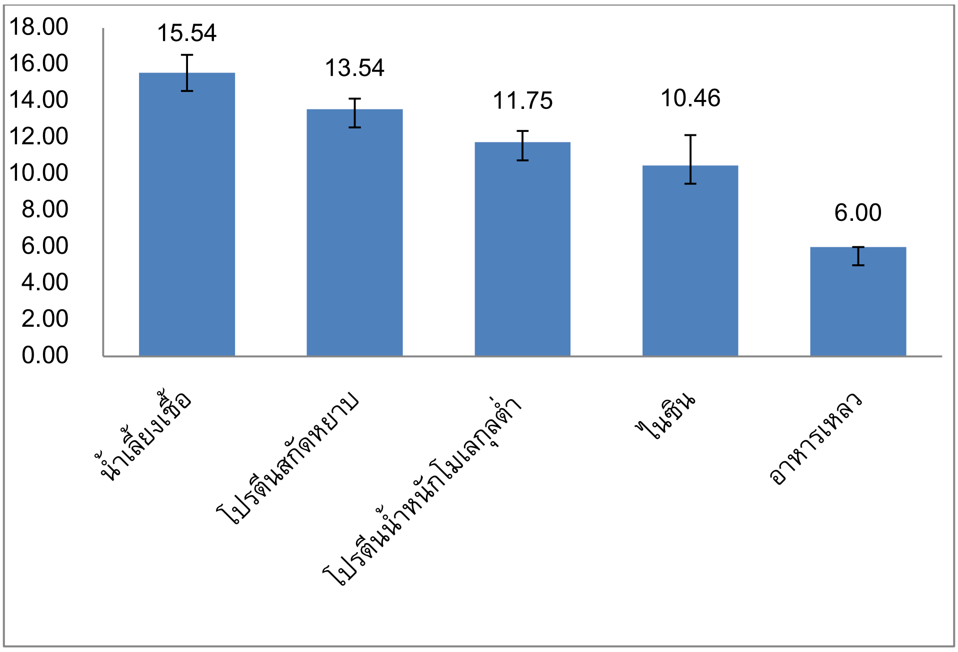
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และ เชื้อ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับสาร nisin และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ดังแสดงในตาราง 4.17

ตาราง 4.17 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	**ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ**			Nisin	**อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว**
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	**โปรตีนสกัดหยาบ**	**โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**		
ATCC 19606	17	15	11	12	6
AB 01	16	14	10	9	6
AB 02	17	14	12	9	6
AB 03	16	14	13	11	6
AB 04	15	14	12	10	6
AB 05	16	14	12	10	6
AB 06	16	14	12	14	6
AB 07	17	14	11	10	6
AB 08	16	14	12	9	6
AB 09	17	14	12	9	6
AB 10	15	13	12	9	6
AB 11	16	14	12	10	6
AB 12	17	15	12	12	6
AB M 01	14	13	11	10	6
AB M 02	15	14	12	9	6
AB M 03	15	13	12	12	6
AB M 04	15	13	13	12	6
AB M 05	16	13	11	10	6

เชื้อทดสอบ	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ			Nisin	อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
	น้ำเลี้ยงเชื้อ	โปรตีนสกัดหยาบ	โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ		
AB M 06	14	13	12	10	6
AB M 07	15	13	12	10	6
AB M 08	14	13	12	11	6
AB M 09	15	13	12	11	6
AB M 10	16	13	12	11	6
AB M 11	14	13	12	11	6
AB M 12	15	13	12	11	6
AB M 13	16	13	11	9	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังภาพ



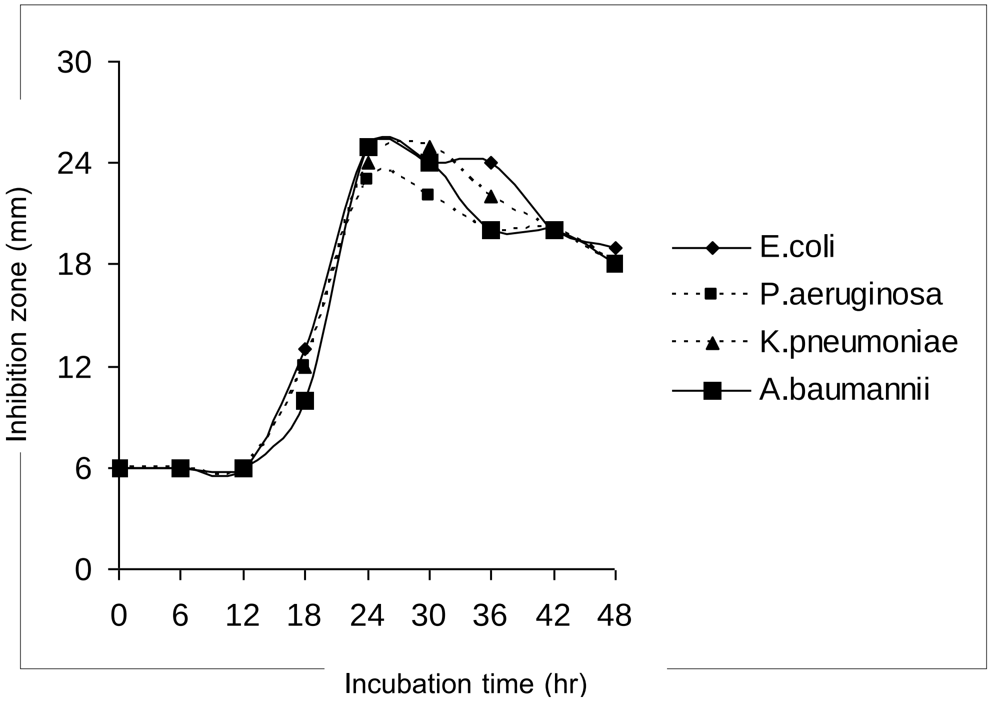
ภาพ 4.5 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii* เฉลี่ย หน่วยเป็นมิลลิเมตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากภาพพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบและโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อ nisin ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวกด้วย รวมทั้งความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ได้ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่แสดงใน**ตาราง 4.18** ยังไม่พบค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ nisin ด้วย

ตาราง 4.18 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii* แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**	**nisin**
ATCC 19606	125	250
AB 01	250	250
AB 02	250	250
AB 03	250	250
AB 04	250	250
AB 05	250	250
AB 06	500	500
AB 07	250	250
AB 08	250	250
AB 09	250	250
AB 10	250	250
AB 11	500	500
AB 12	500	500
AB M 01	250	500
AB M 02	250	250
AB M 03	250	250
AB M 04	500	500
AB M 05	500	500
AB M 06	250	250
AB M 07	250	250
AB M 08	500	500
AB M 09	250	250
AB M 10	500	500
AB M 11	250	500
AB M 12	250	500
AB M 13	500	500
เฉลี่ย	**322.12±123.35**	**355.57±125.96**

พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซิส ไอโซเลท A67/204 เป็นไอโซเลทที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเฉลี่ยในเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อนำน้ำเพาะเชื้อที่บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมาทำการทดสอบ ซึ่งสารต้านแบคทีเรียทดสอบอาจถูกปลดปล่อยออกมาก่อนหน้านี้ได้ ผลการทดสอบพบว่าเวลาที่เชื้อสามารถปล่อยสารต้านแบคทีเรียมาในน้ำเพาะเชื้อได้ดีคือ ณ เวลา 24 ชั่วโมงของการบ่มเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นระยะ log phase ของการเจริญของไอโซเลทนี้ ดังภาพ 4.6



ภาพ 4.6 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบ 4 ชนิด ของน้ำเพาะเชื้อแอคติโนมัยซิส ไอโซเลท A67/204 ณ เวลาต่างๆ ของการบ่มเพาะเชื้อแอคติโนมัยซิส

ผลการวิจัย และอภิปรายผลการศึกษาที่ 2 การประยุกต์ใช้เห็ดระโงกขาว เป็นสารอาหารสำคัญของเชื้อแลคโตบาซิลลัส เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลลัส

จากผลการศึกษาในปีที่ผ่านมาถึงการใช้ผงบดละเอียดของเห็ดเป็นแหล่งอาหารของเชื้อแลคโตบาซิลลัสซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดี และเป็นที่นิยมในปัจจุบัน พบว่าระบบการเพาะเลี้ยงของเชื้อ LF16 หรือ *Lactobacillus fermentum* สายพันธุ์ MDCM16 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับผงของเห็ดระโงกขาวในร้อยละ 15 ของผงเห็ด เป็นระบบเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมทำให้เชื้อแลคโตบาซิลลัสทั้ง 2 ชนิดเพิ่มการเจริญมากขึ้นกว่าที่ไม่มีการผสมผงเห็ดลงไป

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคเพิ่มเติมในแต่ละชนิดของแบคทีเรียทดสอบซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีอุบัติการณ์ดื้อยาหลายชนิด พบว่าระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลลัสดังกล่าวกับเห็ดนี้สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าระบบที่ไม่มีการผสมเช่นกันดังตาราง 4.19

ตาราง 4.19 ค่าเฉลี่ยของฤทธิ์ยับยั้งของการเพาะเลี้ยงเชื้อ LF16 กับผงเห็ดร้อยละ 15 เปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงโดยไม่มีส่วนผสมของผงเห็ด ที่มีต่อแบคทีเรียก่อโรคชนิดละ 15 ไอโซเลท

ระบบ	**ขนาดเฉลี่ยของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร)**			
	E.coli	*P.aeruginosa*	*K.pneumoniae*	*A.baumannii*
LF16 กับผงเห็ด	26.93	24.33	28.53	25.40
LF16กับกลูโคส	20.13	22.20	19.40	20.06
ผงเห็ด	8.00	6.00*	6.00*	6.00*

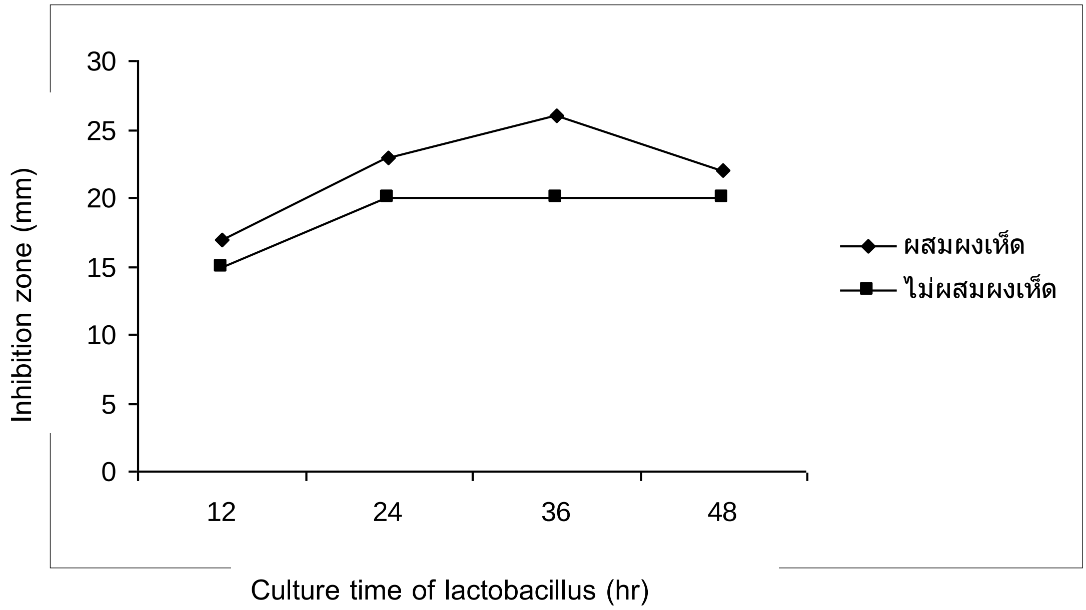
* เส้นผ่าศูนย์กลางของ stainless cup เท่ากับ 6 มิลลิเมตร
ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นตัวควบคุมผลบวก

เมื่อนำระบบการเพาะเลี้ยงนี้มาศึกษาในปริมาตรที่เพิ่มมากขึ้น (semi-large scale) ในสภาวะที่หล่อเลี้ยงด้วย CO_2 ในอัตราส่วนหลายแบบ พบว่าในอัตราส่วนของผงเห็ด และกลูโคสที่ 10:5 เป็นอัตราส่วนที่ระบบการเพาะเลี้ยงผลิตน้ำเพาะเลี้ยงที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุด ดังตาราง 4.20 จึงได้เลือกสภาวะนี้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษา โดยคาดได้ว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัสจะเลือกใช้น้ำตาล กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้พลังงานก่อนแล้วจึงสร้างเอ็นไซม์เพื่อมาย่อยเห็ดและนำไปใช้ได้ต่อไป

ตาราง 4.20 ระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อ LF16 กับผงเห็ดระโงกขาว และ/หรือน้ำตาลกลูโคส ในอัตราส่วนต่างๆ ที่แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ทดสอบ ATCC 25922

ระบบการเพาะเลี้ยง	**ขอบเขตการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ต่อเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ทดสอบในอัตราส่วนของส่วนผสมระหว่างเห็ดและกลูโคส**			
	0:15	**5:10**	**10:5**	**15:0**
LF16 กับส่วนผสม (เห็ด:กลูโคส)	21	21	26	23
LF16 ที่ไม่มีส่วนผสมของผงเห็ด (MRS broth : กลูโคส)	21	19	21	16

เมื่อนำเชื้อแลคโตบาซิลลัสมาเพาะเลี้ยงในอายุการเจริญที่แตกต่างกัน ร่วมกับผงเห็ดระโงกขาวและน้ำตาลกลูโคส ในอัตราส่วน 10:5 นั้นพบว่าการเตรียมแลคโตบาซิลลัสที่อายุการเจริญ 36 ชั่วโมง สามารถผลิตน้ำเพาะเลี้ยงที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ทดสอบ ATCC 25922 ได้ดีที่สุด ดังแสดงในภาพ 4.7 และยังพบต่อไปว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัสนี้ต้องใช้เวลา 24 ชั่วโมง จึงจะสามารถผลิตน้ำเพาะเลี้ยงที่มีฤทธิ์ได้ แต่จะแสดงฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงไปแล้ว 48 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพ 4.7



ภาพ 4.7 ผลของอายุการเจริญของแลคโตบาซิลลัสที่มีต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบ *E.coli* สายพันธุ์ทดสอบ ATCC 25922 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับผงเห็ดระโงกขาว และน้ำตาลกลูโคส ในอัตราส่วน 2:1

เมื่อพิจารณาถึงผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบ พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัสเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิทดสอบ 18, 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส แต่ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแสดงออก ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุด และพบต่อไปว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแสดงออกได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 3-6 ดังแสดงใน**ภาพ 4.7** พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำเพาะเลี้ยงสูญเสียไป เมื่อนำน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อนี้มาผสมกับ NaOH และเมื่อผสมกับเอ็นไซม์โปรติเอสที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ โปรติเนส และทริปซิน (**ตาราง 4.21**) แสดงว่าสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อนี้น่าจะเป็นสารประกอบโปรตีนที่ออกฤทธิ์ได้ดีในสภาวะกรด

ตาราง 4.21 การศึกษาคุณลักษณะของน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ LF16 ร่วมกับผงเห็ดระโงกขาว ในอัตราส่วน 2:1 ต่อเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ทดสอบ ATCC 25922

สภาวะทดสอบ	**ขนาดของขอบเขตการยับยั้ง (มิลลิเมตร)**
ปกติ	24
pH 4	22
pH 5	24
pH 6	24
pH 7	22
pH 8	12
pH 9	6
pH 10	6
60℃	24
70℃	24
80℃	24
90℃	24
100℃	24
121℃	24
Proteinase	9
Trypsin	9

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำเลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลลัสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเห็ดเป็น ปรีไบโอติก โปรตีนสกัดหยาบ และสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลลัสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเห็ดป่นเป็นปรีไบโอติก โปรตีนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น และสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น ไปศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค พบว่าสารทดสอบทั้ง 3 แสดงฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงผลดังต่อไปนี้

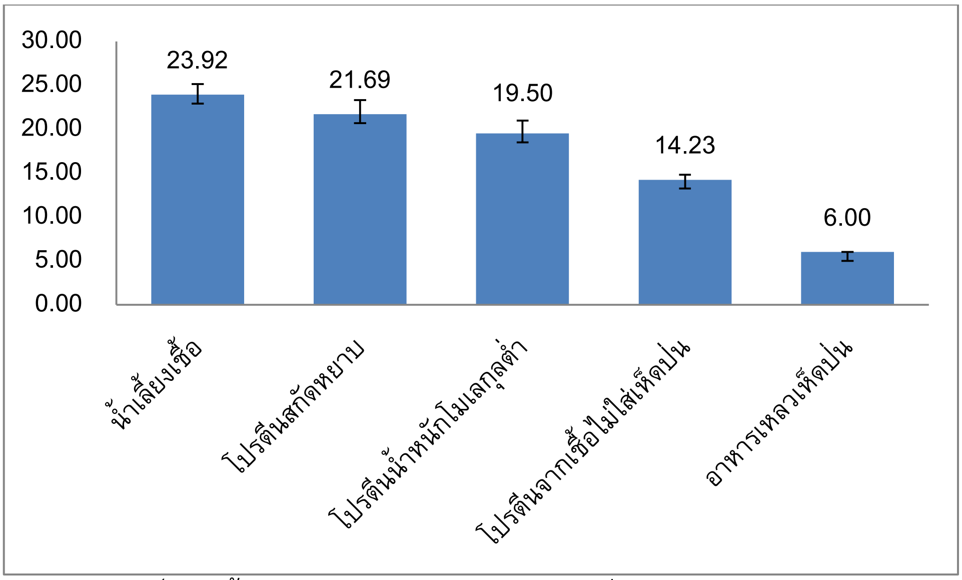
1. **ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus***

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ MSSA และ MRSA ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น และอาหารเหลวที่เติมเห็ดป่น ไม่มีเชื้อ แสดงผลดัง**ตาราง 4.22**

ตาราง 4.22 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	**ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ**			**โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น**	**อาหารเหลวที่เติมเห็ดป่น ไม่มีเชื้อ**
	น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารที่เติมเห็ดป่น	**โปรตีนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**	**โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**		
ATCC 25923	27	25	22	15	6
MSSA 01	24	24	21	14	6
MSSA 02	26	24	20	14	6
MSSA 03	25	24	20	15	6
MSSA 04	24	21	18	14	6
MSSA 05	24	22	19	14	6
MSSA 06	25	22	18	14	6
MSSA 07	23	21	18	15	6
MSSA 08	24	21	18	14	6
MSSA 09	22	21	18	14	6
MSSA 10	24	21	18	15	6
MSSA 11	23	21	18	14	6
MRSA E^S01	23	19	19	14	6
MRSA E^S02	23	21	19	15	6
MRSA E^S03	23	18	18	14	6
MRSA E^S04	25	23	22	15	6
MRSA E^S05	24	22	21	14	6
MRSA E^S06	22	21	20	14	6
MRSA E^S07	22	19	18	14	6
MRSA E^S08	23	21	19	15	6
MRSA E^S09	25	23	18	14	6
MRSA E^S10	24	22	21	14	6
MRSA E^S11	24	22	20	15	6
MRSA E^R01	24	21	21	13	6
MRSA E^R02	24	22	21	13	6
MRSA E^R03	25	23	22	14	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังภาพ



ภาพ 4.8 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เฉลี่ย หน่วยเป็นมิลลิเมตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากภาพพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบ และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของฤทธิ์สารทดสอบทั้ง 3 ต่อโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านเชื้อนี้เกิดจากโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำของเชื้อแลคโตบาซิลลัส ในอาหารที่เติมเห็ดป่นจริง เมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำในภาวะที่เติมเห็ดป่นในอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงใน**ตาราง 4.23** พบว่ามีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น

ตาราง 4.23 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่นเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น	สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น
ATCC 25923	3.90	15.62
MSSA 01	3.90	15.62
MSSA 02	3.90	15.62
MSSA 03	7.81	31.25
MSSA 04	7.81	31.25
MSSA 05	7.81	31.25
MSSA 06	7.81	31.25

ตาราง 4.23 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่นเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น**
MSSA 07	3.90	15.62
MSSA 08	7.81	31.25
MSSA 09	7.81	31.25
MSSA 10	7.81	31.25
MSSA 11	7.81	15.62
MRSA E^{S}01	7.81	31.25
MRSA E^{S}02	7.81	31.25
MRSA E^{S}03	7.81	31.25
MRSA E^{S}04	3.90	15.62
MRSA E^{S}05	3.90	15.62
MRSA E^{S}06	7.81	31.25
MRSA E^{S}07	7.81	31.25
MRSA E^{S}08	7.81	31.25
MRSA E^{S}09	7.81	62.50
MRSA E^{S}10	3.90	15.62
MRSA E^{S}11	7.81	31.25
MRSA E^{R}01	3.90	15.62
MRSA E^{R}02	3.90	15.62
MRSA E^{R}03	3.90	15.62
เฉลี่ย	6.31±1.94	25.84±10.78

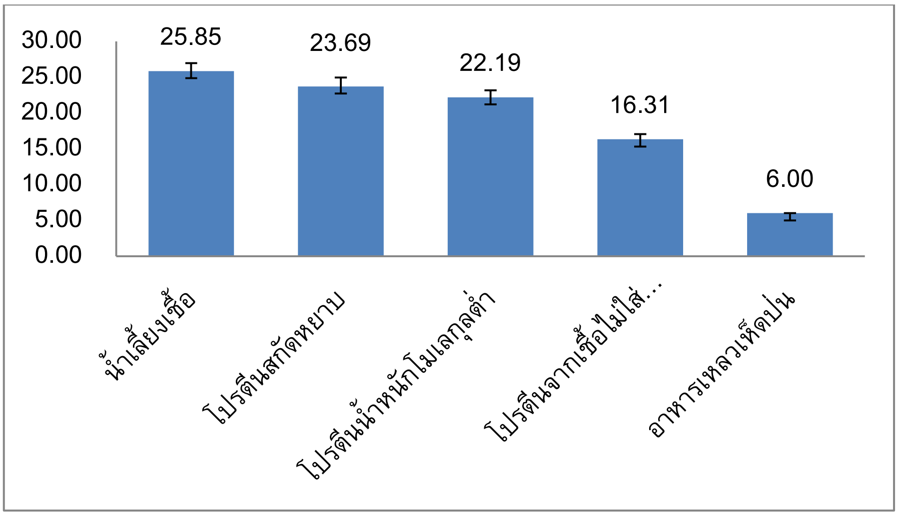
2. ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis*

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และ เชื้อ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น และอาหารเหลวที่เติมเห็ดป่นไม่มีเชื้อ แสดงดัง**ตาราง 4.24**

ตาราง 4.24 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ			โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น	อาหารเหลวที่เติมเห็ดป่น ไม่มีเชื้อ
	น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารที่เติมเห็ดป่น	โปรตีนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น	โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น		
ATCC 29212	28	26	24	17	6
EF 01	25	24	23	16	6
EF 02	26	24	23	15	6
EF 03	27	25	23	16	6
EF 04	26	24	22	17	6
EF 05	27	25	23	16	6
EF 06	26	25	22	15	6
EF 07	26	25	23	16	6
EF 08	27	25	23	17	6
EF 09	25	25	24	16	6
EF 10	25	24	22	17	6
EF 11	24	22	22	16	6
EF 12	24	22	22	17	6
EF M 01	27	24	22	16	6
EF M 02	26	23	22	17	6
EF M 03	28	25	23	16	6
EF M 04	27	25	22	17	6
EF M 05	26	23	21	16	6
EF M 06	25	23	21	17	6
EF M 07	25	22	22	15	6
EF M 08	25	23	23	16	6
EF M 09	25	23	21	17	6
EF M 10	25	22	21	15	6
EF M 11	26	22	21	17	6
EF M 12	25	23	21	17	6
EF M 13	26	22	21	17	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังภาพ



ภาพ 4.9 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* หน่วยเป็นมิลลิเมตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากภาพพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. faecalis* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบ และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของฤทธิ์สารทดสอบทั้ง 3 ต่อโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านเชื้อนี้เกิดจากโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำของเชื้อแลคโตบาซิลลัส ในอาหารที่เติมเห็ดป่นจริง เมื่อศึกษาถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* ได้ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำในภาวะที่เติมเห็ดป่นในอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงใน**ตาราง 4.25** พบว่ามีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น

ตาราง 4.25 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่นเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น**
ATCC 29212	7.81	15.62
EF 01	7.81	31.25
EF 02	8.81	31.25
EF 03	7.81	15.62
EF 04	7.81	31.25
EF 05	8.81	31.25
EF 06	8.81	31.25
EF 07	7.81	31.25

ตาราง 4.25 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่นเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น**
EF 08	7.81	31.25
EF 09	7.81	31.25
EF 10	7.81	31.25
EF 11	7.81	31.25
EF 12	7.81	31.25
EF M 01	7.81	31.25
EF M 02	7.81	31.25
EF M 03	7.81	31.25
EF M 04	8.81	31.25
EF M 05	7.81	31.25
EF M 06	7.81	31.25
EF M 07	8.81	62.50
EF M 08	7.81	31.25
EF M 09	8.81	31.25
EF M 10	7.81	31.25
EF M 11	7.81	31.25
EF M 12	7.81	62.50
EF M 13	7.81	31.25
เฉลี่ย	**8.04±0.43**	**32.45±9.81**

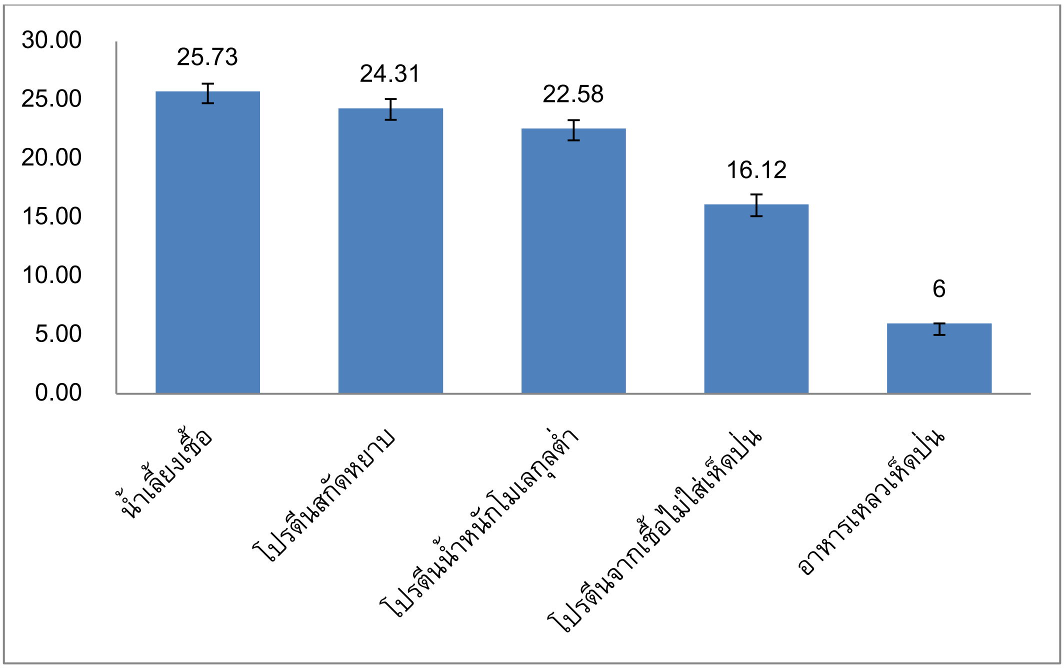
3. ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli*

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และ เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่ดื้อยาจากการสร้าง ESBL ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น และอาหารเหลวที่เติมเห็ดป่น ไม่มีเชื้อ แสดงใน **ตาราง 4.26**

ตาราง 4.26 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ			โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น	อาหารเหลวที่เติมเห็ดป่น ไม่มีเชื้อ
	น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารที่เติมเห็ดป่น	โปรตีนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น	โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น		
ATCC 25922	27	26	24	16	6
EC 01	27	25	24	17	6
EC 02	26	26	24	18	6
EC 03	27	25	22	16	6
EC 04	26	25	23	17	6
EC 05	26	25	22	16	6
EC 06	26	25	22	16	6
EC 07	25	25	22	16	6
EC 08	26	25	22	17	6
EC 09	25	24	23	17	6
EC 10	26	24	22	18	6
EC 11	26	24	22	16	6
EC 12	26	24	23	16	6
EC ESBL 01	26	24	23	17	6
EC ESBL 02	25	24	22	15	6
EC ESBL 03	25	24	23	16	6
EC ESBL 04	25	24	23	16	6
EC ESBL 05	25	24	22	16	6
EC ESBL 06	25	23	22	15	6
EC ESBL 07	26	23	23	15	6
EC ESBL 08	25	23	22	15	6
EC ESBL 09	26	24	22	16	6
EC ESBL 10	25	24	22	15	6
EC ESBL 11	26	24	23	16	6
EC ESBL 12	25	24	22	15	6
EC ESBL 13	26	24	23	16	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังภาพ



ภาพ 4.10 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* เฉลี่ย หน่วยเป็นมิลลิเมตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากภาพพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบ และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของฤทธิ์สารทดสอบทั้ง 3 ต่อโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น และพบว่าสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำในภาวะที่เติมเห็ดป่นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่นแสดงใน**ตาราง 4.27**

ตาราง 4.27 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่นเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น**
ATCC 25922	7.81	15.62
EC 01	7.81	15.62
EC 02	15.62	31.25
EC 03	7.81	62.50
EC 04	7.81	62.50
EC 05	15.62	31.25
EC 06	7.81	31.25
EC 07	7.81	31.25
EC 08	7.81	31.25
EC 09	15.62	31.25
EC 10	7.81	31.25
EC 11	7.81	31.25
EC 12	15.62	31.25
EC ESBL 01	7.81	15.62
EC ESBL 02	15.62	31.25
EC ESBL 03	15.62	31.25
EC ESBL 04	7.81	15.62
EC ESBL 05	15.62	31.25
EC ESBL 06	15.62	15.62
EC ESBL 07	15.62	31.25
EC ESBL 08	7.81	15.62
EC ESBL 09	15.62	31.25
EC ESBL 10	31.25	31.25
EC ESBL 11	15.62	31.25
EC ESBL 12	15.62	62.50
EC ESBL 13	31.25	31.25
เฉลี่ย	13.22±6.54	31.25±13.26

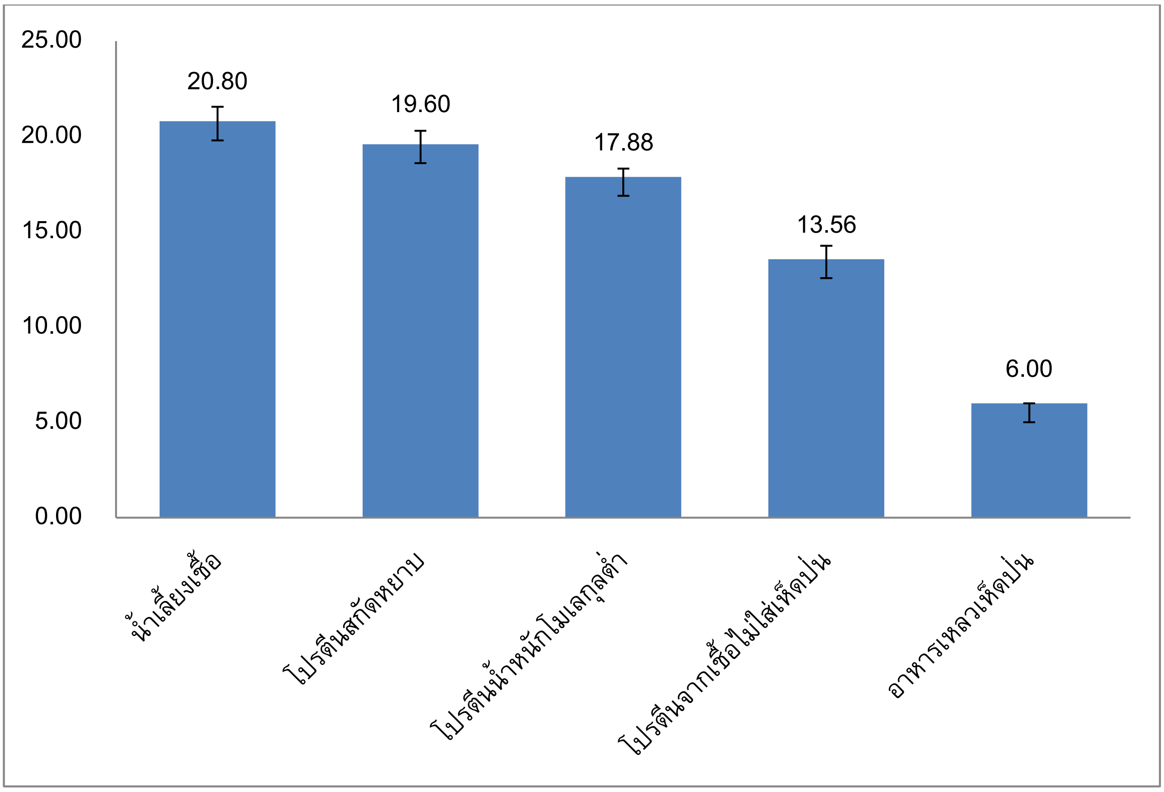
4. ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และ เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น และอาหารเหลวที่เติมเห็ดป่น ไม่มีเชื้อ แสดงในตาราง 4.28

ตาราง 4.28 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ			โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น	อาหารเหลวที่เติมเห็ดป่น ไม่มีเชื้อ
	น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารที่เติมเห็ดป่น	โปรตีนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น	โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น		
ATCC 27853	21	20	18	14	6
PA 01	20	20	18	14	6
PA 02	21	19	18	15	6
PA 03	20	18	18	13	6
PA 04	21	20	18	14	6
PA 05	20	20	18	13	6
PA 06	21	20	19	13	6
PA 07	21	19	18	14	6
PA 08	20	19	18	13	6
PA 09	21	19	18	13	6
PA 10	20	19	18	12	6
PA 11	20	19	18	13	6
PA 12	21	19	18	14	6
PA 13	20	20	17	13	6
PA 14	21	19	18	13	6
PA 15	20	20	18	14	6
PA 16	21	20	18	15	6
PA 17	22	20	17	14	6
PA 18	21	20	18	14	6
PA 19	23	21	17	14	6
PA M 01	21	21	18	13	6
PA M 02	20	20	18	14	6
PA M 03	21	19	18	14	6
PA M 04	22	19	18	13	6
PA M 05	21	20	17	13	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังภาพ



ภาพ 4.11 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เฉลี่ย หน่วยเป็นมิลลิเมตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากภาพพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบ และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของฤทธิ์สารทดสอบทั้ง 3 ต่อโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น และพบว่าสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำในภาวะที่เติมเห็ดป่นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่นแสดงในตาราง 4.29

ตาราง 4.29 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่นเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น**
ATCC 27853	62.5	250
PA 01	62.5	250
PA 02	125	250
PA 03	125	500
PA 04	125	250
PA 05	125	500
PA 06	125	250
PA 07	125	250
PA 08	62.5	125
PA 09	125	250
PA 10	125	125
PA 11	125	250
PA 12	125	250
PA 13	62.5	125
PA 14	125	250
PA 15	250	250
PA 16	125	500
PA 17	62.5	125
PA 18	125	125
PA 19	125	250
PA M 01	125	250
PA M 02	250	500
PA M 03	250	500
PA M 04	125	125
PA M 05	500	500
เฉลี่ย	142.50±91.14	280.00±136.36

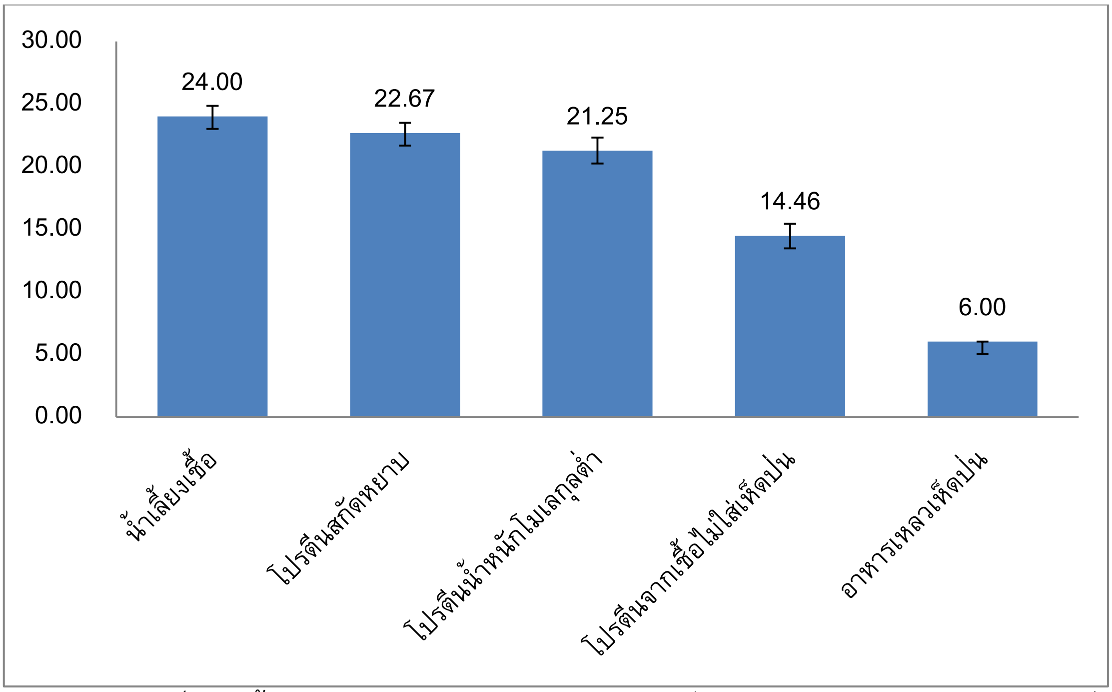
5. ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii*

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และ เชื้อ *Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายชนิด ของสารทดสอบทั้ง 3 ด้วยวิธี agar-disc diffusion เทียบกับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น และอาหารเหลวที่เติมเห็ดป่น ไม่มีเชื้อ ดังแสดงในตาราง 4.30

ตาราง 4.30 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii* แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ

เชื้อทดสอบ	**ขอบเขตการยับยั้งเชื้อ (มิลลิเมตร) ของ**			**โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น**	**อาหารเหลวที่เติมเห็ดป่น ไม่มีเชื้อ**
	น้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารที่เติมเห็ดป่น	**โปรตีนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**	**โปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**		
ATCC 19606	24	23	23	16	6
AB 01	23	23	22	15	6
AB 02	24	22	21	15	6
AB 03	24	22	21	15	6
AB 04	25	23	22	14	6
AB 05	24	23	23	16	6
AB 06	25	23	21	15	6
AB 07	23	22	20	16	6
AB 08	24	24	23	14	6
AB 09	25	24	21	15	6
AB 10	24	23	21	15	6
AB 11	25	22	20	14	6
AB 12	24	22	21	15	6
AB M 01	24	22	20	15	6
AB M 02	25	23	21	13	6
AB M 03	24	22	22	15	6
AB M 04	25	23	21	14	6
AB M 05	25	24	23	14	6
AB M 06	24	24	22	15	6
AB M 07	22	21	20	13	6
AB M 08	23	23	21	14	6
AB M 09	24	22	20	13	6
AB M 10	23	22	20	15	6
AB M 11	24	22	20	14	6
AB M 12	23	22	21	13	6
AB M 13	25	23	22	13	6

สามารถสรุปเป็นกราฟได้ดังภาพ



ภาพ 4.12 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii* เฉลี่ย หน่วยเป็นมิลลิเมตร ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากภาพพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *A. baumannii* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ โปรตีนสกัดหยาบ และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของฤทธิ์สารทดสอบทั้ง 3 ต่อโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น และพบว่าสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำในภาวะที่เติมเห็ดป่นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่นแสดงใน**ตาราง 4.31**

ตาราง 4.31 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่นเทียบกับในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น แสดงค่าในรูปของ MBC หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เชื้อทดสอบ	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเห็ดป่น**	**สารสกัดโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่เติมเห็ดป่น**
ATCC 19606	62.5	125
AB 01	62.5	125
AB 02	31.25	62.5
AB 03	62.5	125
AB 04	62.5	125
AB 05	62.5	62.5
AB 06	125	125
AB 07	125	125
AB 08	62.5	62.5
AB 09	62.5	125
AB 10	62.5	125
AB 11	62.5	62.5
AB 12	62.5	250
AB M 01	250	250
AB M 02	125	125
AB M 03	125	125
AB M 04	125	250
AB M 05	125	125
AB M 06	125	125
AB M 07	125	125
AB M 08	125	125
AB M 09	62.5	125
AB M 10	125	125
AB M 11	125	125
AB M 12	125	125
AB M 13	125	125
เฉลี่ย	99.76±45.09	129.81±49.76

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาที่ 1 การศึกษาจุลินทรีย์ในดินที่สามารถสร้างสารต้านจุลชีพ

โดยปกติแล้วเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซิสซึ่งพบได้ทั่วไปในดิน และแหล่งธรรมชาติอื่นๆ ต่างมีคุณสมบัติที่ทนทานต่อความเครียดของสิ่งแวดล้อม ทำให้อาศัยอยู่ในธรรมชาติได้ดี และได้มีผู้วิจัยจำนวนมากที่ศึกษาถึงเชื้อกลุ่มนี้ในดินจากแหล่งต่างๆ แต่มักศึกษาเพียงฤทธิ์ต้านเชื้อทั่วไป หรือเชื้อก่อโรคเบื้องต้น ทำให้การประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ที่เชื้อผลิตไม่สามารถนำไปใช้ต่อยอดได้ หรือสารที่ผลิตอาจมีกลไกการดื้อยาของเชื้อเช่นเดียวกันกับยาปฏิชีวนะทั่วไปทำให้ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจหาสารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ แต่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างไปจากยาปฏิชีวนะหรือมีโอกาสดื้อยาได้น้อย สารกลุ่มที่น่าสนใจนี้คือโปรตีนหรือเปปไตด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ (antimicrobial protein or peptide) ซึ่งพบว่าเชื้อกลุ่มนี้สามารถผลิตสารนี้ได้เช่นกัน

จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่ผ่านมาได้คัดกรอง และเลือกไอโซเลทของเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซิสที่ไม่เพียงแต่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน แต่ยังออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อก่อโรคที่สำคัญทางการแพทย์ ทั้งเชื้อก่อโรคที่ไว และดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายชนิด (multidrug resistance) โดยการศึกษานี้ได้สกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 กิโลดาลตันซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์เป้าหมายที่ผู้วิจัยสนใจศึกษา พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ให้ผลดีกว่าไนซินที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก ยกเว้นในกลุ่มเชื้อทดสอบ 2 กลุ่มที่เป็นเชื้อที่ดื้อยาในระดับสูง และเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล ได้แก่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่สารสกัดโปรตีนของเชื้อแอคติโนมัยซิสไอโซเลท A67/204 ออกฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกับ nisin อย่างไรก็ตามยังถือว่าโปรตีนดังกล่าวออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ดีแล้ว การศึกษาขั้นต่อไปจึงจะจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซิสไอโซเลทดังกล่าว และจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคทางโปรติโอมิค เพื่อนำไปเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนที่มีการอ้างไว้ในฐานข้อมูลโปรตีนก่อนหน้านี้แล้ว และระบุเป็นโปรตีนใหม่ หรือโปรตีนที่เคยมีรายงานไว้แล้วต่อไป

การศึกษาที่ 2 การประยุกต์ใช้เห็ดระโงกขาว และเหลืองเป็นสารอาหารสำคัญของเชื้อแลคโตบาซิลลัส เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลลัส

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัสเป็นเชื้อโปรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยการผลิตสารออกฤทธิ์ต่างๆ ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ผู้วิจัยได้เก็บรวบรวมเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียไว้จำนวนหนึ่ง ซึ่งเมื่อนำมาคัดกรองเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อที่มีสาเหตุจากโปรตีนหรือเปปไตด์ที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยได้คัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตโปรตีนดังกล่าวและมีฤทธิ์ดีที่สุดมาได้คือ *Lactobacillus fermentum* LF16 อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่าการใช้สารปรีไบโอติกซึ่งมักเป็นสารโพลิแซคคาไรด์ หรือโซ่น้ำตาลสายสั้นผสมกับเชื้อโปรไบโอติกของผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่างๆ เป็นที่นิยมกัน

มากขึ้น โดยเรียกการเตรียมระบบของโปรไบโอติกกับปรีไบโอติกว่าซินไบโอติก ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะใช้ผงเห็ดระโงกขาวป่นที่เตรียมไว้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อแลคโตบาซิลลัสไอโซเลทที่คัดเลือกไว้ ผลการศึกษาพบว่าระบบซินไบโอติกนี้ได้ผลเป็นที่น่าพอใจตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ เพิ่มการเจริญของเชื้อแลคโตบาซิลลัสได้ดีมากขึ้น สามารถเก็บเกี่ยวสารสกัดโปรตีนโมเลกุลต่ำที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแลคโตบาซิลลัสอย่างเดียว และพบต่อไปอีกว่าโปรตีนทดสอบนี้ออกฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคทั้งสายพันธุ์ไว และดื้อยาหลายชนิดได้ดีเช่นเดียวกันกับการศึกษาของแอคติโนมัยซิส ทั้งนี้ยังพบว่าโปรตีนนี้ให้ฤทธิ์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ผลิตจากเชื้อแลคโตบาซิลลัสไอโซเลทเดียวกันแต่ไม่เพาะเลี้ยงร่วมกับผงเห็ดระโงกขาว ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคเพิ่มขึ้นเมื่อนำเชื้อแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ทดสอบไปเพาะเลี้ยงร่วมกับผงเห็ดระโงกขาวซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติมจากกลูโคส ด้วยหลักการของเชื้อแลคโตบาซิลลัสที่เป็นเชื้อโปรไบโอติก น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน และผงเห็ดระโงกขาวป่นเป็นปรีไบโอติกของเชื้อ โดยฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้เป็นผลของสารสกัดโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่เรียกว่าแบคเทอริโอซินที่เชื้อแลคโตบาซิลลัสสามารถผลิตได้ การศึกษาในขั้นต่อไปจะจำแนกถึงชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคทางโปรติโอมิค เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนที่มีการอ้างไว้ในฐานข้อมูลก่อนหน้านี้แล้ว และระบุเป็นแบคเทอริโอซินใหม่หรือแบคเทอริโอซินที่เคยมีรายงานไว้แล้วต่อไป

บรรณานุกรม

วารุณี แสนหมี่ และคณะ. ความหลากหลายทางชีวภาพ พืชอาศัยและการเจริญของเชื้อราเอกโตมายคอไรซาในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2546.

Basavaraj NK, Chandrashekhara S, Shamarez AM, Goudanavar PS, Manvi FV. Isolation and morphological characterization of antibiotic producing actinomyces. *Tropical J Pharm Res* 2010;9:231-6

Bruno ME, Montville TJ. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:3003-10.

Caroline C. Rock phosphate solubility Streptosporangium isolates from casts of tropical earthworms. *Soil Biol Biochem* 1997;29:381-5

Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70:564–82.

Forestier C, De Champs C, Vatoux C and Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol.* 2001;152:167-73

González B, Arca P, Mayo B and Suárez JE. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:2158-63

Goodfellow M, William ST, Mordarshi M. Actinomycetes in biotechnology. Academic Press Limited, London. 1988.

Garver KI and Muriana IM. Purification and partial amino acid sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:2191-5

Hayakawa MM, Yoshida YY, Iimura YY. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *J Appl Microbiol* 2004;96:973-81

Jensen PR, Dwight R, Fenical W. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:1102-8

Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Ali MA, Jalaludin S. Antagonistic effects of intestinal lactobacillus isolates on pathogens of chicken. *Lett Appl Microbiol*. 1996;23:67-71

Joerger MC and Klaenhammer TR. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol* 1986;167:439-46

Kelly SL, Aitchison EW, Deshpande M, Schnoor JL, Alvarez PJJ. 2001. Biodegradation of 1,4-dioxane in planted and unplanted soil: effect of bioaugmentation with *Amycolata sp*. CB 1190. *Water Res* 35:3791-800

Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;12:39-85

Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential produces of new antibiotics. *Antonie van Leewenhoek* 2000; 78:399-405

Morimoto M, Imari R. Antitumor activity of echinosporin. *J Antibiotic* 1985;38:490-4

Rakshanya JU, Shenpagam SN, Devi DK. Antagonistic activity of actinomycetes isolates against human pathogen. *J Microbiol Biotech Res* 2011;1:74-9

Ruan JS. Rapid isolation and identification of actinomyces in UNESCO. Southeast asia regional training workship. Rapid method in microbiology and biotechnology. Dept. of Microbiology, Kasetsart Univesity. Bangkok, Thailand. 19-28 October. 1994

Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28:405-40.

Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB, Aranjo JM. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium sp*. Endophyte of maize leaves. *Bioresource Technol* 2002;83:105-9