บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างดินในป่าชายเลน บริเวณตำบลกำพวน อำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง โดยลงพื้นที่สุ่มเก็บตัวอย่างดินในป่าชายเลน จำนวน 70 ตัวอย่าง แล้วนำมาแยกแอคติโนมัยซิส โดยวิธี spread plate ตามวิธีของ Tortora et al. (1986) แล้วนำมาคัดแยกด้วยอาหาร Humic acid vitamin agar Starch casein agar และ Yeast malt agar ศึกษาลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่าง และลักษณะเซลล์ โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร Humic acid vitamin agar ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว หรือสีเทา หรือสีครีม จนถึงสีเหลือง ผิวหน้าโคโลนีคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หรือขรุขระคล้ายหนังสัตว์หรือผ้ากำมะหยี่ บนอาหาร Starch casein agar เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาว ครีมจนถึงสีเหลือง บนอาหาร Yeast malt agar เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีขาว สีเทา สีครีมจนถึงสีเหลือง มีผิวหน้าโคโลนีคล้ายผงฝุ่นแป้ง หรือขรุขระคล้ายหนังสัตว์ พบว่า สามารถคัดแยกแอคติโนมัยซิส ได้ทั้งสิ้น 39 ไอโซเลต แล้วนำมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Seed medium (Yeast extract-malt broth, pH 7.3) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน นำมากรองแยกเซลล์ออกโดยผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งโดยใช้เครื่อง evaporation จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 และ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยวิธี agar diffusion (Lorian, 1980) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผล Inhibition zoneและหาค่า Inhibition index ผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซิส พบว่า แอคติโนมัยซิส 16 ไอโซเลตสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 โดยมีค่า Inhibition zone และ Inhibition index และแอคติโนมัยซิส 31 ไอโซเลตสามารถยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 90028 โดยมีค่า Inhibition zone และ Inhibition index และมีแอคติโนมัยซิส 8 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลตที่ RN 01, RN 03, RN 19, RN 20, RN 21, RN 24, RN 25 และ RN 26 และแอคติโนมัยซิสจำนวน 16 ไอโซเลต (93.75%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 โดยให้ค่า Inhibition index มากกว่าหรือ

เท่ากับ 20 มิลลิเมตร และแอคติโนมัยซิสจำนวน 1 ไอโซเลต (6.25%) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 โดยให้ค่า Inhibition index เท่ากับ 0 และแอคติโนมัยซิสจำนวน 31 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Candida albicans* ATCC 90028 (100%) โดยให้ค่า Inhibition index มากกว่าหรือเท่ากับ 20 มิลลิเมตร เมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อในระดับ Species โดยหาลำดับเบสของ 16s rRNA ยีน ทำได้โดยสกัด Genomic DNA ของแบคทีเรียและเพิ่มปริมาณ (Amplify) DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ แล้ววิเคราะห์ลำดับเบสของ 16s rRNA โดยการทำ DNA sequencing และนำลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST ผลการศึกษาพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 01 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces griseus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% homology) เท่ากับ 100% ลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย ติดสีแกรมบวก โคโลนีสีเทา ล้อมรอบด้วยเส้นใยสีขาวบนอาหาร SP-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 03 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces albus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 100% แสดงลักษณะโคโลนีสีเหลือง ไม่มีเส้นใยบนอาหาร SP-2 ดังแสดงในภาพที่ 4.9 และลักษณะเซลล์เป็นรูปท่อน มีเส้นสาย ติดสีแกรมบวก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 19 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces avermitilis* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 99% ลักษณะโคโลนีบนอาหาร SP-2 มีโคโลนีสีดำเทา มีเส้นใยสีขาวล้อมรอบ และลักษณะเซลล์เป็นรูปร่างกลม เซลล์เรียงตัวเป็นสายคล้ายลูกปัด ติสีแกรมบวก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 20 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces aminophilus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 99%ลักษณะโคโลนีบนอาหาร SP-2 มีโคโลนีสีเหลือง มีผงแป้งสีขาวและลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย ติดสีแกรมบวก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 26 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Microbispora rosea* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 100% ลักษณะโคโลนีบนอาหาร SP-2 มีโคโลนีสีสีส้ม มีผงแป้งสีขาวและลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย ติดสีแกรมบวก และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ RN 02 RN 04 RN 05 RN 06 RN 07 RN 08 RN 09 RN 10 RN 11 RN 13 RN 14 RN 16 RN 17 RN 20 RN 29 RN 30 RN 34 RN 37 RN 39 RN 41 RN 42 RN 43 RN 49 RN 50 RN 52 RN 55 RN 58 RN 61 RN 62 RN 64 RN 65 RN 67 และ RN 70 มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบส 16S rRNA ยีนของ *Streptomyces* sp. แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร SP-2 โคโลนีผิวย่นสีเหลือง ดังแสดงในภาพที่ 4.13 และลักษณะเซลล์ รูปร่างกลม เซลล์เรียงตัวเป็นสายคล้ายลูกปัด ติดสีแกรมบวก

อภิปรายผลการวิจัย

จากการคัดแยกและจัดจำแนกแอคติโนมัยซิสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินป่าชายเลน ในตำบลกำพวน อำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิสที่คัดแยกได้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค แล้วนำมาคัดแยกแอคติโนมัยซิสด้วยอาหาร Humic acid vitamin agar Starch casein agar และ Yeast malt agar ศึกษาลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่าง และลักษณะเซลล์ ผลการศึกษาพบว่า คัดแยกแอคติโนมัยซิสได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลต เมื่อนำไอโซเลตทั้งหมดมาตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า แอคติโนมัยซิส 31 ไอโซเลตสามารถยับยั้ง *Candida albicans* แอคติโนมัยซิส 16 ไอโซเลตสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และมีแอคติโนมัยซิส 8 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้ง 2 ชนิด เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแอคติโนมัยซิสที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า แอคติโนมัยซิสที่แยกได้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA เหมือนกับ *Streptomyces griseus* (100%) *Streptomyces albus* (100%) *Streptomyces avermitilis* (99%) *Streptomyces* sp. (100%) *Streptomyces aminophilus* (99%) และ *Microbispora rosea* (100%) โดยพบว่า แอคติโนมัยซิสจำนวน 33 ไอโซเลต เป็นสกุล *Streptomyces* sp. และแอคติโนมัยซิสอีก 6 ไอโซเลต เป็นสกุล *Streptomyces griseus Streptomyces albus Streptomyces avermitilis Streptomyces aminophilus* และ *Microbispora rosea* การศึกษาที่ผ่านมาของทายาท ศรียาภัย และคณะในปี พ.ศ. 2557 ซึ่งแยกและระบุชนิดของแอคติโนมัยซิสจากดินป่าชายเลน ในจังหวัดสตูล เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์และการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทั้งราและแบคทีเรียในภาคการเกษตร สามารถคัดแยกแอคติโนมัยซิสได้จำนวน 90 สายพันธุ์ โดยแอคติโนมัยซิส จำนวน 14 (15.5 %), 14 (15.5 %), 18 (20.0 %) และ 2 (2.2%) สายพันธุ์ แสดงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเนส ไซแลนเนส ซีเอ็มซีเอส และอาวิเซลเลส ตามลำดับ แอคติโนมัยซิสจำนวน 10 ไอโซเลท (11.1%) สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ และผลการระบุชนิดโดยใช้ลำดับเบสของยีนในช่วง 16S rDNA พบเชื้อแอคติโนมัยซิสจำนวน 9 ไอโซเลต เป็นสกุล *Streptomyces* และอีก 1 ไอโซเลต เป็นสกุล *Micromonospora*

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า แอคติโนมัยซิสที่แยกและจัดจำแนกได้ส่วนใหญ่เป็น *Streptomyces* sp. สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งพบว่าแอคติโนมัยซิสที่พบในดินส่วนใหญ่เป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุด โดยสามารถพบประชากรของเชื้อ *Streptomyces* ในดินมากถึง 96 % (Kim et al., 1998;

Hayakawa, 2008) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วในปัจจุบันว่ามีการใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยซิสในทางอุตสาหกรรมยาสำหรับผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อซึ่งอยู่ใน genus Streptomyces นั้น มีอยู่หลายชนิด ได้แก่ streptomycin, spectinomycin, neomycin, tetracycline, chlorotetracycline, erythromycin, clindamycin, nystatin, amphoteracin B และchloramphenical เป็นต้น (Madigan et al, 2009) และในการศึกษาครั้งนี้ พบเชื้อแอคติโนมัยซิสอีก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Streptomyces griseus Streptomyces albus Streptomyces avermitilis Streptomyces aminophilus* และ *Microbispora rosea* ซึ่งสามารถสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *Candida albicans* และ *Staphylococcus aureus* ได้ ที่ผ่านมามีนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากแอคติโนมัยซิสเหล่านี้ อาทิ การใช้ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์หรือมูลวัว ในการลดการเกิดโรครากขาวของยางพารา (วศินี อินศฤงคาร และปฏิมาพร ปลอดภัย, 2559) *Streptomyces albus* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งสามารถย่อยสลายพลาสติกชีวภาพ Polybutylene succinate (PBS) ได้ (ลักษมี ศุกระกาญจนะ, 2556) ส่วน *Streptomyces avermitilis* พบว่า ถูกนำมาสังเคราะห์ยา Ivermectin ใช้รักษาและป้องกันโรคตาบอดจากพยาธิและโรคเท้าช้าง ส่วน *Streptomyces aminophilus* นั้น มีการศึกษาพบว่าสามารถย่อยสลาย 1,3-dinitrobenzene ได้ (Arora & Bae, 2014) สำหรับ *Microbispora rosea* นั้น จัดเป็น non-streptomycetes ซึ่งเป็นแอคติโนมัยซิสที่หายาก มีอยู่ประมาณ 100 สกุล และมีความหลากหลายทางด้านรูปร่าง นิเวศวิทยา และสายวิวัฒนาการ (Miyadoh, 1997) อย่างไรก็ดี จากงานวิจัยนี้ได้แอคติโนมัยซิสที่พบได้ยากในดินทั่วไปหลายชนิด ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยอื่น และอาจจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ศึกษาเพิ่มเติม เพื่อประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ และทางการเกษตรและอุตสาหกรรมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มการศึกษาศักยภาพในการผลิตเอนไซม์และการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชของแอคติโนมัยซิสที่แยกได้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ต่อไป

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากแอคติโนมัยซิสที่แยกได้ต่อไป