บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการแยกแอกติโนมัยซีทีสจากตัวอย่างดินในพื้นที่ 7 อำเภอของจังหวัดน่าน จำนวน 15 ตัวอย่าง สามารถแยกแอกติโนมัยซีทีสได้ 61 สายพันธุ์ เมื่อนำแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลแอซิเตต และนำสารสกัดมาทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์โดยทดสอบด้วยวิธี Agar well พบว่ามีแอกติโนมัยซีทีสจำนวน 75.41 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ และจำนวน 24.59% เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยกลุ่มแอกติโนมัยซีทีสที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แบ่งเป็น กลุ่มยับยั้งแบคทีเรียและรา 6.56 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มยับยั้งแบคทีเรียอย่างเดียว 68.85 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ทราบว่าประชากรส่วนใหญ่ของแอกติโนมัยซีทีสที่แยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก

แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินจากโรงเรียนแม่จริม อำเภอแม่จริม จังหวัดน่าน เป็นสายพันธุ์ที่มีขอบเขตการยั้บยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบได้มากที่สุดถึง 6 ชนิด ได้แก่ *B. cereus* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *C. albicans* ATCC 10231 *S. cerevisiae* ATCC 5169 และออกฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อนกับ *A. niger* ATCC 6275 และยังออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดได้ในระดับสูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราทดสอบเพิ่มเติมโดยวิธี Dual culture โดยทำการทดสอบกับราทดสอบชนิดใหม่อีก 6 ชนิด ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช และทดสอบกับราชนิดเดิม คือ *A. niger* เพิ่มเติม ปรากฏผลการยับยั้งราทดสอบทั้ง 7 ชนิดเห็นผลได้อย่างชัดเจน คือราทดสอบไม่สามารถเจริญได้บริเวณรอบ ๆ โคโลนีของแอกติโนมัยซีทีส และเมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เปรียบเทียบระหว่างลักษณะราทดสอบในชุดควบคุมกับราทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยลักษณะเส้นใยส่วนปลายของโคโลนีราทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีการเจริญในลักษณะที่เส้นใยแผ่ออกไม่เต็มที่ เส้นใยมีลักษณะหงิกงอเป็นกระจุกรวมกันเนื่องจากถูกจำกัดพื้นที่ในการเจริญ เพราะแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 สร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งราทดสอบแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งออกมา ทำให้ราทดสอบไม่สามารถเจริญในบริเวณนี้ได้ เหตุผลที่การทดสอบด้วยวิธีนี้เห็นผลการยับยั้งได้อย่างชัดเจนเนื่องจาก การทดสอบด้วยวิธีนี้เป็นการเพาะเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ร่วมกับราทดสอบโดยตรง ทำให้สารทุกชนิดที่แอกติโนมัยซีทีสผลิตออกมาสามารถแพร่ไปในวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้งหมดซึ่ง

รวมไปถึงสารปฏิชีวนะที่ผลิตออกมาด้วย แต่การทดสอบด้วยวิธี Agar well เป็นการนำสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบซึ่งปัจจัยต่าง ๆ ในการสกัด เช่น ตัวทำละลาย วิธีการ หรือระยะเวลาในการสกัด อาจมีผลทำให้สูญเสียสารบางชนิดไประหว่างการสกัด ซึ่งอาจจะเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบก็ได้ ดังนั้นการจะสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสเพื่อนำไปใช้ จึงต้องมีการหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารสกัดออกมามีฤทธิ์การยับยั้งในระดับสูงที่สุด

อาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ ในงานวิจัยนี้พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะต่อการสร้างสารปฏิชีวนะของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 คือ SSB รองลงมาคือ MEB และ ISP2 ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB SCYB และ NB ไม่ช่วยกระตุ้นให้แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์นี้สร้างสารปฏิชีวนะ

จากการทดสอบเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารปฏิชีวนะจากสายพันธุ์นี้ ทำให้ทราบว่า เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด รองลงมาคือ เอททิลแอซิเตต ส่วนเฮกเซน ไม่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ออกมาได้เลย และเมื่อศึกษาดูความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะพบว่า การเจริญของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์นี้ 4 วันแรกเป็นระยะ log phase จากนั้น เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากวันที่ 4 เป็นต้นไป การสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรียทดสอบส่วนใหญ่ สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 4 สำหรับสารยับยั้ง *E coli* เริ่มสร้างหลังวันที่ 4 เป็นต้นไป และจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงประมาณวันที่ 10 ซึ่งมีปริมาณสูงสุดและจะคงที่เรื่อยไป การที่สารปฏิชีวนะสร้างออกมาในช่วงระยะ stationary phase แสดงว่า สารปฏิชีวนะที่สร้างเป็นสาร secondary metabolite

จากข้อมูลที่ศึกษาทั้งหมดทำให้ทราบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้สูง คือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Soluble Starch Broth (SSB) ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงอย่างน้อย 10 วัน และใช้ตัวทำละลาย เมทานอล ในการสกัดสาร จากที่ Gesheva และคณะ (2004) เคยรายงานไว้ว่าการใช้แลกโทส หรือ กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส เติมแอมโมเนียมซัคซิเนต เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมจากแหล่งเดิมคือกากถั่วเหลือง เติมแร่ธาตุที่จำเป็นในปริมาณน้อย ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเป็น 6 เท่า จากอาหารสูตรเดิม เมื่อพิจารณาจากสูตรอาหาร SSB (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) พบว่า นอกจากแป้ง และ สารสกัดจากยีสต์แล้ว ก็ยังมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส และมีสารประกอบของแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมจากแหล่งไนโตรเจนหลักคือ สารสกัดจากยีสต์ ในสูตรอาหารอีกด้วย ซึ่งในงานวิจัยนี้ให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามชนิดของอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารปฏิชีวนะยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสอีกด้วย

จากการแยกสารปฏิชีวนะเบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ปรากฏตำแหน่งของสารออกมา 4 ตำแหน่ง มีค่า Rf เท่ากับ 0.38 0.43 0.51 และ 0.82 เมื่อนำแผ่น TLC ที่แยกสารได้ไปทดสอบหาตำแหน่งของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่าบริเวณของ Rf 3 ตำแหน่ง เท่านั้น คือ 0.38 0.43 0.51 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ โดยยับยั้ง *B. cereus* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *C. albicans* ATCC 10231 *S. cerevisiae* ATCC 5169 และ *A. niger* ATCC 6275 จากการทดลองนี้สารที่แยกได้ยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจาก การใช้ TLC ในการแยกสาร ยังมีข้อจำกัดอีกหลายประการ เช่น ถ้าสารสกัดที่ได้มีสารหลายชนิดที่มีสมบัติใกล้เคียงกันมาก ๆ เช่น มีขั้วใกล้เคียงกันมาก การใช้วิธีนี้จะไม่สามารถแยกสารแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการแยกสารสกัดในขั้นตอนนี้เป็นเพียงการแยกสารขั้นต้นเท่านั้น ต้องการแยกสารในส่วนที่เป็นสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ออกจากสารอื่น ๆ ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ดังจะเห็นได้จากผลคือ สามารถแยกสารที่ตำแหน่ง Rf เท่ากับ 0.82 ซึ่งไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบออกไปได้ จากการแยกสารในระบบนี้ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเอททิลแอซิเตตและเมททานอลในอัตราส่วน 3:2 จึงสามารถดึงสารส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ขึ้นมาจากจุดเริ่มต้นได้ แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะในส่วนนี้เป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างสูง เพราะต้องให้เมทานอลถึง 40 เปอร์เซ็นต์ จึงจะสามารถแยกพาสารขึ้นมากับตัวชะได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น คือ เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่สกัดสารปฏิชีวนะออกมาได้มากที่สุด และเอททิลแอซิเตตให้ผลรองลงมา ในขณะที่เฮกเซน ซึ่งเป็นสารขั้วต่ำไม่สามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ออกมาได้เลย ดังนั้นการจะแยกสารให้ได้ผลชัดเจนกว่านี้ จำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น การแยกสารโดยใช้คอลัมภ์ที่บรรจุด้วย ซิลิกาเจล และทำการแปรผันอัตราส่วนของตัวชะ จะทำให้ประสิทธิภาพการแยกสารสกัดได้ดีขึ้น อาจทำให้ได้สารสกัดที่บริสุทธิ์เลยก็เป็นได้

จากการทดสอบการสร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ของแอกติโนมัยซีทีสทั้งหมด 61 สายพันธุ์ มีสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งทำให้เซลล์มะเร็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าหรือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าให้การยับยั้งระดับสูง อยู่ 13 สายพันธุ์ โดยในจำนวนนี้แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบได้ทั้ง 6 ชนิด และให้ผลการยับยั้งในระดับสูงมาก ซึ่งเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากสายพันธุ์นี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ คุณสมบัติของการเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีนั้น ควรที่จะมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้แบบจำเพาะกับเซลล์ใดเซลล์หนึ่งและสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งตายแบบอะพอพโทซิส จากการทดสอบสามารถคัดเลือกได้แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินจากป่าชุมชน อำเภอสันติสุข จังหวัดน่าน โดยสายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในระดับสูง และจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat ATCCno.CRL-2063) โดยทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด

ขาวมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 12.77 เปอร์เซ็นต์ และสามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เข้าสู่โปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิส โดยมีเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิส 72.29 เปอร์เซ็นต์

ในการจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยศึกษาโครงสร้างจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่ใน สกุล *Streptomyces* แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยายังไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ถึงระดับสปีชีส์ได้ ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดยส่งตัวอย่างผลิตผลพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA และเมื่อนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีสทั้งสองสายพันธุ์มาเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ที่บันทึกไว้ใน GenBank DNA database พบว่าลำดับเบส 16S rRNA ของแอกติโนมัยซีตสายพันธุ์ Nan 2.4 และสายพันธุ์ Nan 6.2 คล้ายกับลำดับเบส 16S rRNA ของสกุล *Streptomyces* โดยมีระดับความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์เหมือนกันมากกว่า 1 สายพันธุ์ เนื่องจากยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ในแอกติโนมัยซีทีสสกุล *Streptomyces* มีลำดับเบสที่เป็นบริเวณอนุรักษ์อยู่มาก จึงทำให้พบหลายสายพันธุ์ที่ระดับความเหมือนเดียวกันนี้ ซึ่งการทำ Phylogenetic tree ทำให้ทราบได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้นว่า แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces olivogriseus* มากที่สุด และแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces platensis* มากที่สุด อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยายังคงมีความสำคัญและจำเป็นที่จะนำมาใช้ร่วมกันกับข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์ในการจำแนกและจัดลำดับความสัมพันธ์ระดับสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีทีส

จากการศึกษาและค้นคว้าหาข้อมูลเพิ่มเติมทราบว่า *Streptomyces platensis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ Platensimycin ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก มีรายงานว่า Platensimycin สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ติดเชื้อในหนูได้ โดยไม่มีพิษต่อหนู (Wang และคณะ, 2006) โดย Platensimycin จะเข้าไปยับยั้ง beta-ketoacyl synthases (FabF/B) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสร้างกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ในแบคทีเรีย (Manallack และคณะ, 2008)

ส่วนการศึกษาและค้นคว้าหาข้อมูลของ *Streptomyces olivogriseus* พบว่ามีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์นี้น้อยมาก มีเพียงการอ้างอิงในสิทธิบัตรถึงความสามารถในการสร้างสาร SS-70A และ B แต่ไม่มีการตีพิมพ์รายงานออกมา และยังไม่เคยมีรายงานถึงความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็งออกมาอีกด้วย