รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การแยกและการจัดจำแนกจุลินทรีย์จากดินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

Isolation and Identification of active biological activities microorganisms from Soil

โดย

ดร. พรรณนภา เภาทอง

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2555

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน โดยเฉพาะ ดร. อภิชัย ศรีเพียร และ ดร.พัตรา สุนทรฐิติเจริญ อาจารย์คณะเทคนิคการแพทย์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้สละเวลาให้คำปรึกษาแนะนำ ปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมทั้งให้คำแนะนำทั้งในด้านทฤษฎีและปฏิบัติ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยรังสิต และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง ในการสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ และ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิตทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์, สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ประโยชน์ที่พึงได้รับจากรายงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้ทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของการวิจัยครั้งนี้

ดร.พรรณนภา เภาทอง

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ชื่อเรื่อง : การแยกและการจัดจำแนกจุลินทรีย์จากดินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
ผู้วิจัย : ดร.พรรณนภา เภาทอง สถาบัน: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีที่พิมพ์ : 2557 สถานที่พิมพ์: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ : สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต
จำนวนหน้างานวิจัย 120 หน้า คำสำคัญ: antimicrobial activity, bioactive enzyme, soil,
ลิขสิทธิ์ : ดร.พรรณนภา เภาทอง

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันงานด้านความหลากหลายทางชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในการค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากประชากรจุลินทรีย์ในระบบนิเวศดิน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยได้คัดแยกจุลินทรีย์ 477 ไอโซเลทจากดิน 100 ตัวอย่าง และทำคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเบื้องต้นด้วยเทคนิค cross streak, agar diffusion และ modified microdilution ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ ประกอบด้วย Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 10 สายพันธุ์ Methicillin-sensitivity Staphylococcus aureus (MSSA) 1 สายพันธุ์ Extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia. coli* (ESBL) 1 สายพันธุ์ *Samonella* Typhymurium, *Klebsiella pnuemoniae*, และยีสต์ก่อโรค 2 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ผลการทดลองพบว่า มีเชื้อ 4 ไอโซเลทสามารถผลิตสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ คือ ไอโซเลทที่ 23, 39, 277, และ 303 เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ต่างๆ เช่น ไคติเนส ไคโตซาเนส อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส เจลาติเนส และ ไลเปส ด้วยเทคนิค direct spot agar และตรวจสอบการสร้างเอ็นไซม์ที่เวลา 48 ชั่วโมง ด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น พบว่ามี 76 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ดี โดยมีการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส และเจลาติเนส มากที่สุด เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติตามลักษณะ colony, microscopic morphology และชีวเคมีสามารถจำแนกชนิดจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์น่าสนใจออกเป็น 5 กลุ่ม คือ gram positive bacilli with spore forming, gram positive coccobacilli, gram negative bacilli, gram varieble และ fungi ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินมีความสามารถในสร้างสารต้านจุลินทรีย์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Title: Isolation and Identification of active biological activities microorganisms from Soil.

Researcher: Pannapa Powthong Ph.D.

Institution: Faculty of Medical Technology, Rangsit University

Year of Publication: 2014 Publisher: Faculty of Medical Technology, Rangsit University

Sources: Research Institute No. of page: 120 pages

Keyword: antimicrobial activity, bioactive enzyme, soil

Copyright: Pannapa Powthong Ph.D.

ABSTRACT

Nowadays the study on biodiversity in soil ecosystems is a valuable strategy for the new finding of antimicrobial and bioactive compounds. The objective of this work was to isolate microorganisms and screen for potential antimicrobial from soil. A total of 477 isolates were isolated from 100 samples of soil. Preliminary screening was based on antimicrobial activity against 16 strains of pathogenic bacteria and fungi, including 10 strains of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and 1 strain of Methicillin-sensitivity *Staphylococcus aureus* (MSSA), extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia. coli* (ESBL), *Samonella* Typhymurium, *Klebsiella pnuemoniae*, *Candida albicans*, and *Cryptococcus neoformans* respectively by cross streak, agar diffusion and modified microdilution technique. There are 4 isolates, 23, 39, 277, and 303 showed particularly strong activity inhibitions against pathogenic bacteria and fungi. The selected microorganisms were then screened for bioactive enzyme including chitinese, chitosanese, amylase, cellulese, protease, gelatinase, and lipase production on different selective media for 48 hours by direct spot agar. The diameter hydrolysis zone were appeared and measured. The results revealed that there are 76 isolate showed particularly strong activities with a broad spectrum enzyme. In addition, most of them can produce amylase, cellulese, protease, and gelatinase. The selected microorganisms can be divided into 5 groups; gram positive bacilli with spore forming, gram positive coccobacilli, gram negative bacilli, gram variable and fungi. Our result indicated that the microorganisms from soil showed potential antimicrobial activity and bioactive compounds production.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(4)
สารบัญรูปภาพ	(6)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ดิน	4
2.2 จุลินทรีย์ในดิน	4
2.3 ความสำคัญของจุลินทรีย์ในดิน	7
2.4 Microbial metabolite	8
2.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ในดิน	10
2.6 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	11
2.7 ชนิดและบทบาทของเอนไซม์ที่เชื้อจุลินทรีย์สร้าง	17
2.8งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในดินที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	27
2.8 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่นำมาทดสอบ	29

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย 39

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 39

3.2.1 เครื่องมือ 39

3.2.2 อุปกรณ์ 40

3.2.3 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ 41

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี 41

3.2.5 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบ 42

3.3 วิธีการทดลอง 43

3.3.1 กลุ่มตัวอย่าง 43

3.3.2 การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย 43

3.3.3 การแยกเชื้อในกลุ่ม bacteria เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ทางชีวภาพ 44

3.3.4 การแยกเชื้อในกลุ่ม เชื้อรา ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ทางชีวภาพ 44

3.3.5 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่สามารถสร้างสารยับยั้ง เชื้อทดสอบได้โดยวิธี Cross streak method 44

3.3.6 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่สามารถสร้างสารยับยั้ง เชื้อทดสอบได้โดยวิธี Agar diffusion method 45

3.3.7 การทำ Extracellular filtration 46

3.3.8 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่สามารถสร้างสารยับยั้ง เชื้อทดสอบได้โดยวิธี Modified microdilution method 46

3.3.9 การทดสอบหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของ Extracellular Filtration จากไอโซเลตต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย ที่ใช้ทดสอบ 48

3.3.10 การทดสอบหาค่า Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของ Extracellular Filtration จากไอโซเลตต่างๆ ต่อเชื้อรา ที่ใช้ทดสอบ 49

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.11 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่สามารถสร้างenzyme ที่สนใจได้โดยวิธี direct agar spot method	49
3.3.12 การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่ผ่านการคัดเลือก	51
3.3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	52
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การแยกแหล่งที่มาของตัวอย่างดิน	53
4.2 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยวิธี Cross streak method	58
4.3 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยวิธี Agar diffusion method	65
4.4 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยวิธี modified microdilution	68
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอ็นไซม์	70
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	82
บรรณานุกรม	**90**
ภาคผนวก	**96**
ประวัติผู้วิจัย	**116**

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดินทั้งหมดที่นำมาใช้ในการทดลอง	53
4.2	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming โดยวิธี Cross streak method จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	59
4.3	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive coccobacilli โดยวิธี Cross streak method จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	61
4.4	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli โดยวิธี Cross streak method จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	62
4.5	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram variable โดยวิธี Cross streak method จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	63
4.6	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming โดยวิธี Agar diffusion จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	66
4.7	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive coccobacilli โดยวิธี Agar Diffusion จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	66
4.8	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli โดยวิธี Agar Diffusion จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	67
4.9	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน โดยวิธี modified microdilution จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	69
4.10	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	72

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.11	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive coccobacilli จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	76
4.12	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	77
4.13	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram variable bacilli จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	79
4.14	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของเชื้อราจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน	80
ภาคผนวกที่ 1	ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming ที่มีฤทธิ์ในการเชื้อทดสอบ และมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์	107
ภาคผนวกที่ 2	ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive coccobacilli ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์	110
ภาคผนวกที่ 3	ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์	111
ภาคผนวกที่ 4	ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram variable ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์	114
ภาคผนวกที่ 5	ผลการทำ Identification ของเชื้อรา ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์	115

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่		หน้า
3.1	แสดงวิธีการทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี modified microdilution	48
4.1	แสดงผล inhibition zone ที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเทคนิค Cross streak	64
4.2	แสดงผล inhibition zone ที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเทคนิค Agar Diffusion	68
4.3	Clear zone from chitozan agar	81
4.4	Clear zone from starch agar	81
4.5	Clear zone from cellulose agar	81
4.6	Clear zone from skim milk agar	81
4.7	Clear zone from gelatin agar	81
4.8	Clear zone from tween 20 agar	81
4.9	Clear zone from tween 80 agar	81

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	Acid
β	=	Bêta
BA	=	Blood agar
cm	=	Centimeter
C. neoformans	=	*Cryptococcus. neoformans*
C. albicans	=	*Candida. albicans*
CFU	=	Colony Forming Unit
Co.,Ltd	=	Company Limited
dl	=	Deciliter
°C	=	Degree celcious
E. coli	=	*Escherichia coli*
ESBL	=	Extended Spectrum Beta-Lactamase
et al.	=	and others
E.faecalis	=	*Enterococcus faecalis*
E. tarda	=	*Edwardsiella tarda*
ezn	=	enzyme
γ	=	Gamma
K	=	Alkaline
α	=	Alpha
K. pneumoniae	=	*Klebsiella pneumoniae*
LPS	=	lipopolysaccharide
Lactobacillus sp.	=	*Lactobacillus* species.
µm	=	Micrometer
µl	=	Microliter
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
MRSA	=	Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*
MIC	=	Minimum Inhibition Concentration

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

MBC	=	Minimum Bactericidal Concentration
MFC	=	Minimum Fungicidal Concentration
NaCl	=	Sodium Choride
nm	=	Nanometer
OD	=	Ornithine decarboxylase
%	=	Percent
P. aeruginosa	=	*Pseudomonas aeruginosa*
PBP	=	penicillin binding protein
PDA	=	Potato dextrose Agar
S. aureus	=	*Staphylococcus aureus*
S. rubidaea	=	*Serratia rubidaea*
S. typhi	=	*Salmonella* typhi
sp.	=	species
spp.	=	species
TSI	=	Triple Iron Sugar
TSB	=	Tryptic Soy Broth
VP	=	Voges-Proskauer
VRE	=	Vancomycin Resistant Enterococcus

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาของปัญหา

ปัญหาจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic-resistant pathogen) เริ่มมีขึ้น และเกิดการระบาดมากกว่า 20 ปี แต่เริ่มมีการตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวเมื่อประมาณ 5-10 ปีที่ผ่านมา จนปัจจุบันกลายเป็นปัญหาสำคัญในทางสาธารณสุขเนื่องจากไม่มียาปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมเชื้อดื้อยาได้ เชื้อดื้อยาสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่เป็นโรคทางด้านภูมิคุ้มกัน และยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลได้อีกด้วย เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะที่สำคัญได้แก่ *Cannida albicans*, *Cryptococcus neoforman*, vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) *E. faecium* และ *E.faecalis*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), carbapenem-resistant *Acinetobacter baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhi (Dalhoff 1994; Amyes and Thomson, 1995; Brown *et al*., 1996; Hiramatsu *et al*., 1997) จากปัญหาดังกล่าวทำให้ความต้องการสารต้านจุลินทรีย์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ เพิ่มสูงขึ้น จึงได้มีการคิดค้นหาตัวยาใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นเพื่อใช้ทดแทนตัวยาเดิม เช่น การหาสารสกัดจากพืชหรือจุลินทรีย์ต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลชีพก่อโรคและสารที่ได้ต้องมีความปลอดภัยต่อการบริโภค แหล่งสำคัญของสารดังกล่าวส่วนใหญ่มาจากพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรที่มีการใช้เพื่อการรักษาโรคติดเชื้อในทุกภูมิภาคทั่วโลกมาเป็นเวลานานกว่า 2,000 ปี (Samuelsson, 2004) ในปัจจุบันมีการใช้สารสกัดจากพืช ประมาณ 50% ของการผลิตของอุตสาหกรรมยา (Robbers *et al*., 1996)

ดินในพื้นที่แถบเขตร้อนชื้นของประเทศไทย นอกจากจะมีความสำคัญกับระบบนิเวศแล้วยังเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลชีพที่มีความสำคัญในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compound) ซึ่งมีความสำคัญทั้งทางการแพทย์และคุณค่าทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น ยาปฏิชีวนะ และเอนไซม์ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย ได้แก่ ใช้เป็นยารักษาโรคได้ในมนุษย์และสัตว์หรือแม้แต่ในด้านเกษตรกรรม เป็นต้น แม้ว่าจะมีการศึกษาจุลชีพในดินต่าง ๆ มีมากมาย แต่การค้นพบยาปฏิชีวนะชนิดใหม่กลับลดลง ในขณะที่เชื้อก่อโรคหลายชนิดพัฒนาเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องค้นหาเชื้อจุลชีพใหม่ๆ เพื่อเป็นแหล่งของยาปฏิชีวนะชนิดใหม่สำหรับการยับยั้งเชื้อโรคที่ดื้อยาและเชื้อฉวยโอกาสที่ใช้ในการรักษาโรคต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินแหล่งต่างๆ โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค คือ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)10 สายพันธุ์ Methicillin-sensitivity Staphylococcus aureus (MSSA) 1 สายพันธุ์ Extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia coli* (ESBL) 1 สายพันธุ์ *Samonella* Typhymurium, *Klebsiella pnuemoniae*, และยีสต์ก่อโรค 2 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* โดยวิธี cross streak และ agar diffusion ซึ่งเป็นวิธีตรวจกรอง และตรวจยืนยันด้วยวิธี modified microdilution รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจ เพื่อที่จะสามารถนำความรู้ความเข้าใจไปใช้เพื่อผลิตหรือปรับปรุงดัดแปลงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และนำไปพัฒนาสารต้านจุลชีพและเอนไซม์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินในแหล่งต่าง ๆ ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคที่พบบ่อย
2. ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพอื่น ๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ความสามารถในการการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ
3. เพื่อประเมินชนิดของเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินแหล่งที่มาต่างๆ โดยเก็บตัวอย่างดินจำนวน 100 ตัวอย่าง และนำมาแยกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค 16 สายพันธุ์ ประกอบด้วย Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 10 สายพันธุ์ Methicillin-sensitivity *Staphylococcus aureus* (MSSA) 1 สายพันธุ์ Extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia coli* (ESBL) 1 สายพันธุ์ *Samonella* Typhymurium, *Klebsiella pnuemoniae*, และยีสต์ก่อโรค 2 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* โดยวิธี cross streak และ agar diffusion ซึ่งเป็นวิธีตรวจกรอง และตรวจยืนยันด้วยวิธี modified microdilution รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น การสร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจด้วยวิธี direct spot agar นอกจากนั้นยังทำการศึกษาคุณสมบัติด้านสรีรวิทยาพันธุศาสตร์ และชีวเคมีเพื่อแยกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เหล่านั้นด้วย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบฤทธิ์ในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งคุณสมบัติทางชีวภาพอื่น ๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากจากดิน

2. การนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือพัฒนาในเชิงพาณิชย์

3. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปสู่การศึกษาการออกฤทธิ์ด้านอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer activity), และฤทธิ์ต้านโปรโตซัว (anti protozoa activity)

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ดิน

ดินเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆได้ดี จุลินทรีย์เหล่านี้ประกอบไปด้วย แบคทีเรีย, รา, เชื้อแอคติโนมัยสีท, สาหร่าย, โปรโตซัว, และไวรัส มักอาศัยตามหน้าของดิน จำนวนของจุลินทรีย์ในดินขึ้นอยู่กับอาหารทีมีประโยชน์ในดิน ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมในดิน ยิ่งลึกลงไปยิ่งมีจุลินทรีย์น้อย และในดินทีมีอากาศถ่ายเทได้ดีจะมีจุลินทรีย์มากกว่าในดินทีมีอากาศถ่ายเทน้อยกว่า โดยทั่วไปจุลินทรีย์ในดินจะแตกต่างกันไปตามชนิดของดิน แร่ธาตุและอินทรีย์สารในดิน ความชื้นของดิน ฯลฯ ในปัจจัยเหล่านี้อินทรีย์สารหรือสารอาหารในดินมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นอย่างยิ่ง ดินที่มีสารอินทรีย์มากก็จะมีจุลินทรีย์มากด้วย นอกจากนี้แล้วในดินยังมีสัตว์หน้าดิน และแมลงหน้าดินต่างๆ สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีความสัมพันธ์กันในระบบนิเวศของดิน ส่วนใหญ่แล้วดินเกิดจากการสลายตัวและผุพังของแร่หินต่างๆ โดยอิทธิพลจากธรรมชาติ เช่นความร้อน ความเย็น กระแสน้ำ และการทับถมของซากสิ่งมีชีวิตที่เน่าเปื่อยผุพัง ซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน จุลินทรีย์เหล่านี้จึงมีบทบาทสำคัญในการเกิดความอุดมสมบูรณ์ของดิน

2.2 จุลินทรีย์ในดิน

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตเล็กๆที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นจนกว่ามันจะเกาะกลุ่มกัน มีทั้งที่เป็นอันตรายต่อการทำให้เกิดโรคกับพืช มนุษย์ สัตว์ และที่เป็นประโยชน์ในการสร้างสารปฏิชีวนะทางการแพทย์ จุลินทรีย์ในดินร่วมกันในการย่อยเซลลูโลส โปรตีน ไขมัน และสารประกอบอื่นๆ จนได้สารตั้งต้นในการหายใจของสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสร้างอาหารได้ด้วยตนเอง จุลินทรีย์จึงมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ของดิน

2.2.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่พบจำนวนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จากการนับโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์ในหนึ่งกรัมของดินที่อุดมสมบูรณ์อาจพบแบคทีเรียมากถึงหนึ่งแสนถึงพันล้านโคโลนีต่อกรัมดิน แต่จากการนับจานเพาะเชื้อของตัวอย่างเดียวกัน จะเหลือประมาณสิบล้านเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากในดินมีแบคทีเรียมากมาย แต่มีความต้องการสารอาหารและสภาพแวดล้อมในการเจริญแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้ทุกชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จัดเตรียมขึ้นมีหน้าที่ในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ผลิตฮิวมัสเปลี่ยนแปลงแร่ธาตุในดินให้เป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตทั้งจุลินทรีย์เองและพืช แบคทีเรียบางชนิด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เป็นโรคพืช แบคทีเรียที่พบในดินโดยทั่วไป มีรูปร่าง 3 แบบคือ แบบกลม แบบแท่ง และแบบเกลียว มีทั้งออโตโทรฟ (Autotroph), เฮเทอโรโทรฟ (Heterotroph), มีโซไฟล์ (Mesophile), เทอร์โมไฟล์ (Thermophile), ไซโครไฟล์ (Psychrophile), แอโรบ(Aerobe) แอนแอโรบ (Aaerobe), เซลล์ลูโลส (Cellulose digester), บางพวกย่อยโปรตีน (Protein digester) บ้างก็ออกซิไดซ์ซัลเฟอร์ (Sulfer reducing bacteria), หรือตรึงไนโตรเจน (Nitrogen- fixing bacteria)ได้ แบคทีเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในดินที่มีอินทรีย์วัตถุ มีความชื้นพอสมควร และค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5.5-9 ในบริเวณรากพืชจะพบแบคทีเรียมากกว่าในบริเวณที่ไกลออกไป กิจกรรมของแบคทีเรียในดินมีมากมายแต่ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศ คือ การเป็นผู้ย่อยสลายอินทรียวัตถุในดินทำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และทำให้เกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนในดินเป็นต้น แบคทีเรียที่พบและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ เช่น *Pseudomanas* sp., *Rhizobium* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. , *Agrobacterium* sp.เป็นต้น (วรวุฒิ, 2556)

2.2.2 เชื้อรา

เป็นจุลินทรีย์ที่มีจำนวนรองลงมาจากแบคทีเรีย เส้นใยของเชื้อรายาวเป็นสิบถึงร้อยเมตรต่อกรัมของดินที่อุดมสมบูรณ์ ราในดินเป็นจำนวนมาก โดยพบมากที่ผิวดินซึ่งมีอากาศ พบทั้งสภาพที่มีไมซีเลียม และสปอร์ จำนวนของรามีประมาณแสนต่อดินหนึ่งกรัม รามีความสามารถในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์รวมถึงฮิวมัสในดิน เช่น เซลล์ลูโลสลิกนิน และเพกติน รวมทั้งยังสามารถเปลี่ยนคาร์บอนจากสารอินทรีย์ในดินให้เป็นองค์ประกอบของเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังเจริญในดินที่เป็นกรด ราจึงช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดินโดยการที่เส้นไมซีเลียมจะสานเป็นตาข่ายยึดอนุภาคดินไว้เป็นกลุ่มก้อน ทำให้ไม่ละลายน้ำไปเรียกว่า ครัมเบิลสตรัคเจอร์ (Crumble structure) บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคในสิ่งมีชีวิต บางชนิดทำลาย nematode ซึ่งเป็นศัตรูพืช ดำรงชีวิตได้โดยการดูดซึมสารอินทรีย์จากการย่อยภายนอกเซลล์ มีรูปร่างเป็นเส้นใย หรือเป็นเซลล์เดี่ยว จำเป็นต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต เชื้อราส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นกรด ราที่พบได้ทั่วไปได้แก่ *Mucor* sp., *Chaetomium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. เป็นต้น (วรวุฒิ, 2556)

2.2.3 เชื้อแอคติโนมัยสีท

เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะสารพันธุกรรมคล้ายแบคทีเรียแต่มีลักษณะของผนังเซลล์คล้ายเชื้อรา ในการจัดจำแนกยังคงจัดเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มักอยู่รวมกันเป็นเส้นสาย เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะสร้างเส้นใยที่คล้ายกับเชื้อรา แต่มีขนาดเซลล์เท่าเซลล์แบคทีเรีย เส้นใยของแอคติโนมัยสีท มีข้อได้เปรียบมาก โดยเฉพาะในสภาพขาดน้ำ โดยจะทำหน้าที่คล้ายสะพานเชื่อมช่องระหว่างแต่ละอนุภาคดิน รวมทั้งให้ผิวสัมผัสที่

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

กว้างแก่เซลล์ Actinomycetes เอง ทำให้มีโอกาสรับสารอาหารได้มากกว่า จุลินทรีย์ชนิดนี้พบมากและกระจายอยู่ทั่วๆไปในดินในรูปของสารก๊าซ ที่รู้จักในคำว่า Geosmin ซึ่งทำให้ดินมีกลิ่นเหม็นอับ หากเปรียบเทียบ มวลของ Actinomycetes โดยประมาณในดินจะเท่ากับ มวลแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทั้งหมดในดิน สามารถเจริญเติบโตได้ในดินที่เป็นกรดถึงเป็นด่าง ประมาณ 5.5 - 10.0 ย่อยสลายสารที่แบคทีเรียและเชื้อราย่อยสลายได้ยาก เช่น ไขมัน ไคติน ปัจจุบันความสนใจต่อแอคติโนมัยสีทมีมากขึ้นเนื่องจากแอคติโนมัยสีทบางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราได้ เช่นเชื้อ *Streptomyces* sp สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่เป็นประโยชน์แก่มนุษย์เป็นจำนวนมาก Actinmycetes ชนิดที่สำคัญคือ *Nocardia, Streptomyces, Micromonospora* (วรวุฒิ, 2556)

2.2.4 สาหร่าย

จำนวนของสาหร่ายในดินมีน้อยกว่าแบคทีเรียและราสาหร่ายที่พบส่วนใหญ่เป็นสีเขียว(Green algae) เช่น *Chlamydomonas, Chlorococcumc* และไดอะตอม (Diatom) ในดินที่อุดมสมบูรณ์ กิจกรรมทางชีวเคมีของสาหร่ายจะลดลง เพราะถูกแย่งอาหารโดยแบคทีเรียและรา เนื่องจากสาหร่ายเป็นพวกที่สังเคราะห์ด้วยแสง จึงมีส่วนทำให้ดินอุดมสมบูรณ์ด้วยการเพิ่มก๊าซออกซิเจนและสารอินทรีย์ นอกจากนี้ยังเป็นตัวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและแทนที่ (succession) โดยสาหร่ายบ้างชนิดสามารถเจริญเกาะอยู่บนหินได้ เมื่อสาหร่ายเจริญขึ้นมากๆสังเคราะห์แสงได้สารอินทรีย์ และพวกที่ตายยังทับทมกันอีก กลายเป็นอินทรีย์สารที่ทำให้แบททีเรียและราเจริญขึ้นได้ เมื่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญจะสร้างสารต่างๆขึ้น เช่น กรดที่ไปย่อยสลายหินทำให้แร่ธาตุละลายออกมาอย่างช้าๆ ต่อสภาพนั้นเหมาะกับการเจริญของไลเคนส์ มอส และพืชชั้นสูงตามลำดับ นอกจากนี้การมีสาหร่ายปกคลุมผิวดินมีผลให้เม็ดดินเกาะตัวกันดี น้ำซึมผ่านได้ดี สาหร่ายแกมน้ำเงินสามารถตรึงไนโตรเจนได้ เมื่อเจริญและตายลงย่อมปลดปล่อยไนโตรเจนที่ตรึงไว้ให้เป็นประโยชน์ต่อข้าว เช่น *Anabaena,Calothrix, Chroococcu,s Nostoc* เป็นต้น ในดินเขตร้อนจะพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมากที่สุด โดยเฉพาะพวกที่ตรึงไนโตรเจนในนาข้าว เช่น *Caynophyceae* (วรวุฒิ, 2556)

2.2.5 โพรโตซัว

ในดินส่วนใหญ่ เป็นพวกที่มีแฟลกเจลลาและพวกอะมีบา พบมากดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงและชุมชื้น โพรโตซัวในดินช่วยกินแบททีเรียบางชนิด จึงเป็นการควบคุมปริมาณแบททีเรียให้อยู่ในสมดุล

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.2.6 ไวรัส

ในดินมีทั้งไวรัสที่ทำให้เกิดโรคกับพืช, สัตว์, และแบคทีริโอฟาจ เข้าใจว่า ไวรัสช่วยควบคุมปริมาณแบคทีเรียในดินเช่นกัน

2.3 ความสำคัญของจุลินทรีย์ในดิน

2.3.1 จุลินทรีย์ผู้ย่อยสลาย

จุลินทรีย์ที่มีชีวิตอย่างอิสระในดินมีประโยชน์ต่อพืชเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะบทบาทต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ ซากพืชจะถูกย่อยเป็นลำดับขั้นตอนอย่างมีระเบียบ แบคทีเรียและราในดินร่วมด้วยช่วยกันในการย่อยเซลลูโลส โปรตีน ไขมัน และสารประกอบอื่นๆ จนได้สารตั้งต้นในการหายใจของสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสร้างอาหารได้ด้วยตนเอง สังคมของจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงครึ่งหนึ่งของสารอินทรีย์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ได้ภายในหนึ่งปี ถึงแม้ว่าสารประกอบเหล่านี้ถูกย่อยสลายได้โดยตรง แต่สารลิกนินและสารอินทรีย์บางอย่างยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลง หรือถูกย่อยสลายเพียงบางส่วนจนเกิดเป็นฮิวมัส ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมอาจนับเป็นปี สิบปี หรือร้อยปีที่จะเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ทั้งหมดไปเป็นกาซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ การย่อยสลายสารอินทรีย์จากจุลินทรีย์จึงทำให้เกิดสารโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กรดอะมิโน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อพืช จุลินทรีย์บางชนิดอาศัยอยู่กับพืชและมีชีวิตอย่างพึ่งพาอาศัยกัน ทั้งสองกรณีทำให้สิ่งมีชีวิตทั้งสองได้รับสารอาหารที่จำเป็นและน้ำเพิ่มขึ้นความสัมพันธุ์ของจุลินทรีย์ในดิน

2.3.2 จุลินทรีย์เป็นแหล่งปุ๋ยธรรมชาติของพืช

พืชทั้งหมดต้องการไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียหรือไนเตรท กิจกรรมที่เกิดจากแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนในรูปอิสระไม่สามารถจัดหาไนโตรเจนให้แก่ความต้องการของสังคมพืชในโลกนี้ ดังนั้นจึงมีการนำปุ๋ยเคมีมาใช้แก่พืช อย่างไรก็ตามจัดเป็นการสูญเสียค่าใช้จ่าย นักวิทยาศาสตร์จึงมีความพยายามในการศึกษาวิจัยหาความสัมพันธุ์ระหว่างพืชและจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจน เพื่อลดการใช้ปุ๋ยเคมีลง

Rhizobium sp. เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชตระกูลถั่ว โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้อาศัยอยู่ในปมบริเวณรากของพืชตระกูลถั่ว จะดูดซึมสารอาหารและทำให้เกิดปมขึ้นที่รากพืชตระกูลถั่วทำให้สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ นับเป็นแหล่งปุ๋ยตลอดชีวิตของต้นพืช ทำให้ผลผลิตของพืชสูงขึ้น การอยู่ร่วมกันของแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. และพืชเริ่มต้นเมื่อแบคทีเรียในดินเข้าไปในขนรากของพืช พืชจะสร้างโปรตีนที่เรียกว่า lectins แล้วไปรวมกับแบคทีเรียที่ขนรากของพืช เซลล์ของพืชตีวงล้อมรอบกลุ่มแบคทีเรียจนเกิดเป็นปม

มหาวิทยาลัยราชภัฏ Rangsit University

2.3.3 จุลินทรีย์ใช้ในการบำบัดมลพิษน้ำ

จากการใช้ปุ๋ยเพื่อให้ผลผลิตทางการเกษตรสูง ปุ๋ยสังเคราะห์โดยทั่ว ๆ ไปมีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบ ปุ๋ยเหล่านี้หากมีการใช้มากเกินจำเป็นจะปะปนไปอยู่ตามแม่น้ำ ลำคลอง สระ บ่อน้ำ น้ำบาดาล เป็นต้น น้ำที่มีปริมาณไนเตรทสูง เมื่อดื่มเข้าไปจะทำให้เป็นโรคพิษไนเตรท คือโรคเด็กตัวเขียว โดยไนเตรทจะไปลดรูปเป็นไนไตรท์ในตัวเด็ก และเมื่อถูกส่งถ่ายไปกับโลหิตแดงก็จะไปแย่งออกซิเจนจากโลหิตแดงนั้น ๆ จนเกิดเป็นโลหิตดำที่ขาดออกซิเจน ทำให้เด็กมีอาการตัวเขียวและเสียชีวิตได้ จึงเรียกว่าโรคเด็กตัวเขียว

กระบวนการที่ใช้ในการกำจัดไนเตรทออกจากน้ำทั่วไปมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง แต่พบว่ามีดิไนตริไฟอิ้งค์แบคทีเรียซึ่งสามารถเปลี่ยนไนเตรทและให้ก๊าซไนโตรเจนกลับสู่บรรยากาศ ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถดังกล่าวจากธรรมชาติจึงเป็นวิธีทางชีวภาพที่น่าสนใจ

2.3.4 จุลินทรีย์เป็นแหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

พันธุกรรมที่หลากหลายของจุลินทรีย์ เป็นแหล่งรวมของ genes ที่มีลักษณะพิเศษที่รอการค้นพบและนำมาพัฒนาใช้ประโยชน์ในแง่ต่างๆ ได้อีกมากมายในอนาคต

2.3.5 จุลินทรีย์เป็นแหล่งความหลากหลายของปฏิกิริยาทางเคมีและชีวเคมี (metabolic diversity)

ในจุลินทรีย์มีกระบวนการสังเคราะห์และย่อยสลายทางชีวเคมีที่หลากหลาย ซึ่งควบคุมโดยเอนไซม์ ยังมีปฏิกิริยาทางเคมีและชีวเคมีของจุลินทรีย์ในแหล่งต่างๆ ที่เราสามารถค้นหานำมาใช้ประโยชน์อีกมาก

2.3.6 จุลินทรีย์เป็นแหล่งความหลากหลายของสารเคมี (chemical diversity)

เป็นที่ทราบกันดีว่าจุลินทรีย์ในดินเป็นอีกหนึ่งแหล่งที่ผลิตสารเคมีที่หลากหลายและเราสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยตรง หรือนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้ประโยชน์ได้อย่างมาก เช่น ยาปฏิชีวนะ สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ สาร biopolymers สารที่มีประโยชน์ทางเกษตรกรรม อุตสาหกรรม และทางการแพทย์

2.3.7 จุลินทรีย์ช่วยให้ดินอุ้มน้ำได้มากขึ้น

2.3.8 จุลินทรีย์ทำหน้าที่เป็น buffer ทำให้ pH ของดินเปลี่ยนแปลงไปอย่างช้าๆ

2.3.9 จุลินทรีย์ช่วยเพิ่มแร่ธาตุต่างๆ ในดินเหมาะสมต่อการเจริญของพืช

2.4 Microbial metabolite

2.4.1 Primary Metabolite

เป็นสารที่ได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง(Photosynthesis) รวมทั้งสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์จากกระบวนการหายใจ (respiration) ทำ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ให้มีสารประกอบต่าง ๆ เกิดขึ้นมากมาย และมีการสร้างพลังงานด้วย ได้แก่ สารพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดอะมิโน โปรตีน เพียวรีน และไพริมิดีน เป็นต้น

2.4.2 Secondary Metabolite

เป็นสารที่ได้มาจากการนำสารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิ มาเข้าสู่กระบวนการชีวสังเคราะห์เพื่อสร้างสารชนิดต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตอีกทอดหนึ่ง ได้แก่ สารพวก อัลคาลอยด์ (alkaloids) ฟีนอลิก (phenolics) อะซีโทจีนิน (acetogenins) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) รวมทั้งเอนไซม์ และสารปฏิชีวนะ เป็นต้น

สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะในจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ มีการสร้างขึ้นในช่วง idiophase ของการเจริญ โดยสารที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษจำเพาะต่อเชื้อบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงพบว่ามีเชื้อเพียงบางกลุ่มเท่านั้นที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยในระยะแรกเชื้อมีการปรับตัวและมีการแบ่งเซลล์อย่างช้าๆ (lag phase) ต่อมาเชื้อจะมี metabolism และอัตราการเจริญสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (acceleration phase) จนกระทั่งถึงจุดสูงสุดของการเจริญ (exponential phase) อาหารถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ปริมาณอาหารที่ลดลงเป็นผลให้เกิดการสะสม biochemical intermediate บางชนิด ทำให้อัตราการเจริญถูกจำกัด (deceleration phase) เชื้อเริ่มมีการเปลี่ยน biochemical pathway ทำให้ได้ผลผลิตภัณฑ์เป็นสารปฏิชีวนะออกมา (Isaae and Jennings, 1995)

สารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นมักมีคุณสมบัติเป็น water soluble antibiotics และ water insoluble antibiotics คุณสมบัติที่ปรากฏมักจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และสภาพแวดล้อมที่เจริญ

2.4.2.1 บทบาทและหน้าที่ของสารปฏิชีวนะที่เชื้อจุลินทรีย์สร้าง (Isaae and Jennings, 1995)

1) สารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นเป็นวิวัฒนาการหนึ่งของเชื้อในการดำรงชีพ

2) เป็นของเสียที่เชื้อปล่อยออกมาในขบวนการ metabolism

3) เป็นแหล่งที่เชื้อใช้สำหรับเก็บอาหาร หรือใช้เป็นสารที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้ม สปอร์ของเชื้อ

4) เป็นผลิตผลที่ได้จากการแตกย่อยของสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์

5) สารปฏิชีวนะมีบทบาทในการฆ่า หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆในธรรมชาติ อันเป็นการแก่งแย่งเพื่อความอยู่รอดของเชื้อ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

6) การที่เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะ ถือเป็นกลวิธีหนึ่งที่จะรักษากลไกการทำงานของเซลล์ เป็นไปอย่างเดิมในระหว่างที่เชื้อไม่สามารถจะเจริญต่อไปได้เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

7) การผลิตสารปฏิชีวนะ เป็นวิธีการหนึ่งที่จะหลีกเลี่ยงมิให้เซลล์ของเชื้อตาย อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของการเจริญเติบโต

8) เป็นกลไกในการกำจัดสารพิษของเชื้อ

9) ช่วยในการชนส่งพวกโลหะเข้าสู่เซลล์

10) ระงับการงอกของสปอร์ของตัวเชื้อเอง

2.5 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ในดิน

มนุษย์ได้นำวัตถุดิบจากธรรมชาติมาใช้เป็นยารักษาโรคตั้งแต่สมัยดึกดำบรรพ์ และกว่าครึ่งศตวรรษที่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของจุลินทรีย์ต่างๆ สืบจนมาถึงปัจจุบัน ทำให้ได้เรียนรู้และค้นพบสิ่งที่น่าสนใจมากมาย โดยเฉพาะในเรื่องของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เป็นต้น และสารนั้นจะต้องไม่มีผลทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก เพราะเมื่อสารนั้นถูกนำมาแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยา ย่อมไม่ต้องการให้ยามีผลกับส่วนที่ดีของร่างกาย ยกเว้น เชื้อโรค หรือมะเร็งที่ต้องการขจัดเท่านั้น

ในการคัดหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จะต้องอาศัยเครื่องมือในการทดสอบฤทธิ์ และวิธีการการแยกสารให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนั้นอาจยังต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างของสารบางส่วนเพื่อทำให้สารนั้นมีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น การหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจที่ทำการตรวจสอบอยู่ในปัจจุบันมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (anti-malaria) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (anti-fungus) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และฤทธิ์ต้านวัณโรค (anti-tuberculosis) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาจากหลายแหล่งด้วยกัน เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในแง่ของความหลากหลายทางชีวภาพ จุลินทรีย์จากดินเป็นอีกแหล่งที่มีความน่าสนใจเพื่อที่จะศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย มีรายงานที่ค้นพบความสามารถของจุลินทรีย์ในดินที่สามารถผลิตสารต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้

การวิจัยในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ จากจุลินทรีย์ ได้แก่ antibiotics, antiinflamatory drugs, immune suppressors, lipid regulating agents, biopesticides, growth promotors etc. เป็นต้น เดิมนั้นนักวิจัยมักจะแยกจุลินทรีย์จากดินและน้ำเป็นหลัก ในปัจจุบันได้เริ่ม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ค้นหาจากแหล่งอื่น เช่น เชื้อราในแมลง, เชื้อรา และแบคทีเรียในพืช (endophytic fungi, endophytic bacteria), จุลินทรีย์จากทะเล เป็นต้น

การวิจัยด้านเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เอนไซม์ได้ถูกนำมาใช้ใน อุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวางทั่วโลก แต่สำหรับประเทศไทยเราความก้าวหน้าทางด้านนี้ยังมีไม่มากนักและยังมีช่องทางพัฒนาได้อีกมาก โดยเฉพาะในระยะแรกควรเน้นการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวเนื่องจากการ เกษตรเป็นหลัก เช่น เอนไซม์สำหรับใช้ผสมในอาหารสัตว์, อุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรม textile, อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ เป็นต้น

การวิจัยด้านอื่นๆ ที่สามารถนำศักยภาพของความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ของประเทศมาพัฒนาใช้ประโยชน์ได้ เช่น industrial fermentations, biosensors, probiotics, biocontrol, biopesticides, bioplastics, biomimetic polymers, diagnostics, การผลิตเชื้อเพลิง (alcohol, hydrogen, biodiesel), การใช้กระบวนการทางชีวภาพในการกำจัดของเสียหรือสารพิษ, การ recycle, การเกษตรและป่าไม้ที่ยั่งยืน, รวมทั้งใช้ช่วยในการอนุรักษ์พืชและสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ หรือแม้แต่ในงานวิจัยที่ใช้เทคโนโลยีขั้นสูงเช่น bio-microelectronics, bio-switches, bio-computers เป็นต้น

ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ เป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญของชาติ ซึ่งเราสามารถใช้ความรู้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีพัฒนานำมาใช้ประโยชน์ได้อีก มากมายในอนาคต ในขณะเดียวกัน การที่เรามีทรัพยากรชีวภาพที่มีความหลากหลายมาก ก็จะช่วยให้เราสามารถพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของชาติ ให้เข้มแข็งและก้าวหน้าได้มากขึ้น ในทางตรงข้ามหากเราปล่อยให้ทรัพยากรชีวภาพของชาติเสื่อมโทรมขาดความหลากหลาย การพัฒนาจะเป็นไปด้วยความยากลำบาก เนื่องจากเราขาดต้นทุนไม่มีแหล่งทรัพยากร ที่จะเกื้อหนุนการพัฒนาเพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมที่ใช้ เทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเป็นกระแสสำคัญของวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรมในสหัสวรรษใหม่นี้

2.6 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.6.1 แอคติโนมัยสีท (*Actinomycetes* sp.)

Actinomycetes ดำรงชีวิตอยู่ในดิน ในปุ๋ยหมัก น้ำ โคลนตม และบริเวณรากพืช ปริมาณของแอคติโนมัยสีทที่พบในดินขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพของดิน โดยจะพบ Actinomycetes ในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง โดยอาจพบได้สูงถึง 95 % ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในดินนั้น ถ้าเป็นดินที่มีสภาพแห้งและมีสภาวะเป็นด่าง และแอคติโนมัยสีทที่พบในดินส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตมัยสีท (*Streptomyces* sp.) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุด

Actinomycetes เป็นแกรมบวก มีรูปร่างหลายแบบ กลม ท่อน หรือเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา โดยอาจเป็นเส้นสายที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใย เพื่อสร้างสปอร์แบบไม่

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

อาศัยเพศ หรืออาจจะเป็นเส้นสายที่มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ ซึ่งโครงสร้างของสปอร์มีทั้งแบบที่มีถุงหุ้มและไม่มีถุงหุ้ม แอคติโนมัย สีทส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน แต่ก็มีบางชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนหรือต้องการก็เพียงเล็กน้อย แอคติโนมัยสีท มีบทบาทที่สำคัญอันหนึ่ง คือ ช่วยย่อยสลายอินทรียวัตถุในธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ช่วยย่อยส่วนประกอบของพืชและสัตว์ที่ทนทานต่อการย่อยสลาย เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และไคติน

Actinomycetes บางชนิด เช่น *Streptomycetes rubiginosus, streptomycetes bambergensis* และ *Streptomycetes violaceoniger* สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถช่วยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นน้ำตาลฟรุกโทสได้ ปัจจุบัน มีการใช้ประโยชน์แอคติโนมัยสีทช่วยผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เช่น การใช้แอคติโนมัยสีทชนิด Thermomonospora ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 60-70 % และเอนไซม์ไซแลนที่ทำงานที่อุณหภูมิสูงซึ่งเอนไซม์นี้มีประโยชน์ในการผลิตน้ำตาลไซโลสจากซังข้าวโพด นอกจากนั้น มีการใช้แอคติโนมัยสีทบางชนิดในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสารพิษชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์ย่อยสลายสารพิษอะลิฟาติก-อะโรมาติก โคโพลีเอสเตอร์ส (Aliphatic-Aromotic Copolyesters และ 1,4 -ไดออกเซน (1,4-Dioxane) ทางการแพทย์และเภสัชกรรมก็ใช้ประโยชน์จาก แอคติโนมัยสีท เช่น ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสและใช้ผลิตสารต้านมะเร็งและสารกดระบบภูมิคุ้มกัน ทางการเกษตรมีการใช้ Actinomycetes ในการผลิตสารฆ่าแมลง สารฆ่าวัชพืช และสารกดภูมิคุ้มกัน นอกจากนั้นยังมีการใช้ *Streptomyces lydicus* WYEC 108 ในการควบคุมศัตรูพืชและควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชที่เกิดกับรากและเมล็ด Actinomycetes เป็นตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีคุณประโยชน์ต่อวงการแพทย์และยา เกษตรกรรมและอุตสาหกรรม รวมถึงต่อวัฏจักรของระบบนิเวศ

2.6.2 *Bacillus* spp.

Bacillus spp. พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ ฝุ่น พืช เศษซากพืชหรือแม้แต่ในอาหาร นม และธัญญาหาร (Claus and Berkeley, 1986) *Bacillus* spp. พบได้ทุกสภาพแวดล้อมเพราะสปอร์ที่แบคทีเรียสร้างทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้
สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันทำให้ชนิดของ *Bacillus* spp. มีความหลากหลาย เช่น พวกที่ต้องการออกซิเจน (aerobes) ไม่ต้องการออกซิเจนเป็นบางช่วง (facultative anaerobes) เจริญได้ในสภาพกรด (acidophiles) สภาพด่าง(alkalophiles) สภาพที่มีความเค็ม (halophiles) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophiles) อุณหภูมิสูง (thermophiles) และพวกที่ใช้สารเคมีอนินทรีย์ในการเจริญ (chemolithotrophs) (Claus and Berkeley, 1986) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่เจริญอยู่ในดิน แต่บางครั้งพบ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

B. subtilis และ *B. licheniformis* อยู่ในน้ำทะเลและน้ำกร่อย (Rosovitz *et al*., 1998) *Bacillus* spp. ที่พบจะแตกต่างกันตามชนิดของดิน เช่น *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. cereus* ไม่ต้องการสารประกอบในอาหารมากนักสามารถพบได้ในดินที่มีธาตุอาหารต่ำ *B. polymyxa* และ *B. azotofixans* พบในดินรอบ ๆ รากพืชที่มีธาตุอาหาร ส่วน *B. macerans* และ *B. circulans* ต้องการสารประกอบอาหารที่ซับซ้อนและพบในเศษซากพืชที่ย่อยสลาย (Priest, 1989) *B. licheniformis*, *B. subtilis*และ *B. pumilus* พบในน้ำทะเลที่สะอาด (พรพรรณ,2550)

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก (rod shaped) อาจเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสาย มีขนาด 0.5-2.5 x 1.2-10 µm (Rosovitz, 1998) หรือ 0.3-2.2 x 0.7-1.2 µm (ดวงพร, 2537) ต้องการออกซิเจนในการหายใจ บางครั้งสามารถเจริญได้ในที่ไม่ออกซิเจน(facultative anaerobe) สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore forming) 1 เซลล์ ต่อ 1 สปอร์ เมื่ออาหารมีจำกัด เซลล์เข้าสู่ ระยะ stationary phase และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อน แสง UV และสารเคมีต่าง ๆ บางเซลล์อาจมีแวคิวโอล บางชนิดอาจพบผลึกโปรตีน เช่น *B. thuringiensis* (จริยา และคณะ,2534) *Bacillus* spp. ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เจริญได้ในอาหารหลายชนิดเติบโตดีในอุณหภูมิปกติ และ pH เป็นกลาง สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น protease และ amylase เป็นต้น *Bacillus* spp. ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาแบบ peritrichous flagella และการใช้แฟลกเจลลาเป็น antigens มีประโยชน์ในการตรวจจำแนก *B. cereus, B.thuringiensis* และ *B. sphaericus* (Turnbull *et al*., 1990)

B. acidocaldarius และ *B. licheniformis* CMUC305 ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ที่ย่อยสลายพันธะ α-1, 4 glucosidic linkage ทนความร้อนสูง และคงทนต่อความเป็นกรด-เบส ในช่วงกว้าง มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร การย่อยแป้ง การผลิตแอลกอฮอล์ และอุตสาหกรรมทอผ้า *B. licheniformis* และ *B. sterothermophilus* ผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่ย่อยสลายไขมันพวกไตรกลีเซอไรด์ โดยไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ของกลีเซอรอล (glycerol-ester hydrolase) ให้กรดไขมันและกลีเซอรอล ใช้มากทั้งอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การสังเคราะห์กลิ่นและรส กรดไขมันและอุตสาหกรรมผงซักฟอก เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ยังมีบทบาทในการจัดการสิ่งแวดล้อม โดยนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียและขยะในแหล่งชุมชน และยังมีสาร subtilisins ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* spp. หลายชนิดใช้ในการทำความสะอาด contact lens ใช้ในกระบวนการผลิต collagen และ gelatin และอุตสาหกรรมอื่น ๆ เอนไซม์อื่นที่แยกได้จาก *Bacillus* spp. ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตนม แป้ง เครื่องดื่ม อาหารและเบียร์ (Zukowski, 1992) สารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. เช่น bacitracin ผลิตจาก *B.licheniformis* สาร polymyxin ผลิตจาก *B.*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

polymyxa สาร gramicidin และ สาร tyrocidine ผลิตจาก *B. brevis* สาร subtilin และ bacilycin ผลิตจาก *B. subtilis*

2.6.3 *Streptomyces* spp.

Streptomyces spp. เป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Streptomycetaceae* เป็นสกุลที่มีจำนวนมากและสำคัญที่สุดในแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสีท เป็นแกรมบวก มีลักษณะคล้ายเชื้อราอาศัยอยู่ทั่วไปในดิน ปุ๋ยหมัก น้ำ ละอองฝุ่น อากาศ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะสร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ฝังลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกั้น เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่เส้นใยอากาศจะสร้างสายสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ ซึ่งมีรูปแบบต่าง ๆ ลักษณะโคโลนีในระยะแรกผิวโคโลนีเรียบ เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยอากาศจะพัฒนาเป็นสปอร์ทำให้ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) มีหลายสี ได้แก่ ขาว เทา แดง เหลือง เขียว น้ำเงิน และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์ที่อยู่ด้านบน ส่วนด้านล่างโคโลนีมีเส้นใยอาหารเป็นสีน้ำตาลส่วนใหญ่ แต่อาจพบสีอื่น เช่นเดียวกับสีสปอร์ *Streptomyces* spp. สร้างรงควัตถุหลายชนิด นอกจากนี้ยังผลิตสาร geosmin (Trans-1, 10-dimethyl decalol) มีกลิ่นคล้ายกลิ่นดิน (earth odor) *Streptomyces* spp. ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตเป็นพวก chemo-organotrophic เมตาบอลิซึม เป็นแบบ oxidative สามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท ย่อยอะดีนีน (adenime) เอสคูลิน (esculin) เคซีน (casein) เจลาติน (gelatin) ไฮโปแซนธีน (hypoxanthine) แป้ง และไทโรซีน (Ltyrosine) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 °C pH 6.5-8.0 ส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile มีบางชนิดที่เป็นพวก psychrophile และ thermophile สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะ *Streptomyces* spp. จำเป็นต้องใช้แร่ธาตุบางชนิดได้แก่ โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม และ ฟอสเฟต เป็นต้น (Williams, Goodfellow and Alderson, 1989)

Streptomyces spp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial agent) เช่น ampicillin, penicillin-N ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงเบต้าแลคแทม (β-lactamring) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเปบติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย โอลีนโดมัยซิน(oleandomycin) เป็นสารพวกแมคโครไลด์ (macrolide) ผลิตโดย *S. antibioticus* (Swan, *et al*, 1994) ซึ่งจะจับกับไรโบโซมและยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน สารต่อต้านเชื้อรา (anti-fungal agent) เช่น แคนดิซิดิน (candicidin) เป็นสารพวกโพลีอีนแมคโครไลด์ (polyene macrolide) ผลิตโดย *S. griseus* (Lechevalier, *et al*, 1953) มีฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา nystatin มีโครงสร้างเป็น polyene มีสมบัติฆ่าเชื้อราได้หลายชนิด polyoxin มีโครงสร้างเป็น nucleoside มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์เชื้อรา anthracycline นอกจากเป็นสารต่อต้านเชื้อรายังเป็นสารต่อต้านมะเร็งด้วยโดยมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II ในเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองดีเอ็นเอได้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.6.4 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp.มีรูปร่างเป็น rod - shaped ขนาดประมาณ 0.6 x 2.0 µm ติดสี gram negative มักพบเป็น single bacilli in pairs และบางครั้งเป็น short chain เชื้อสามารถเคลื่อนที่โดย polar flagella เส้นเดียว แบบ monotrichous flagellum ผนังเซลล์ประกอบด้วย lipopolysaccharide (LPS) ที่มีโครงสร้างคล้ายของแบคทีเรียในตระกูล *Enterobacteriaceae* แต่มีสารเคมีบางหมู่ต่างกัน ส่วนของ polysaccharide side chain ที่ยื่นออกจาก LPS เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความจำเพาะและความไว (susceptible) ต่อ bacteriocin หรือ pyocin และ bacteriophage แหล่งที่พบ *Pseudomonas* spp. จะคล้ายกับราและยีสต์ คือ พบได้ในธรรมชาติทั้งที่มีและที่ไม่มีชีวิต เช่น พืช สัตว์ ดิน น้ำ เป็นต้น ส่วนมากเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (plant pathogen)

2.6.5 *Serratia* spp.

Serratia spp.เป็นแบคทีเรียแกรมลบ rod - shaped จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae และเป็นพวก facultative anaerobe คือ เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ ไม่ทนร้อน เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritricous flagella) ให้แก๊สจากการหมักย่อยกลูโคส สามารถสร้างรงควัตถุสีแดงได้ (red pigment) การสร้างรงควัตถุเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 15-20 °C ในภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *Enterobacter Serratia* มีอยู่ทั่วไปในดิน

2.6.6 *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อราโรคพืช โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะไปลดกิจกรรมการดำเนินชีวิตของเชื้อราโรคพืช เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโต ยับยั้งการขยายพันธุ์ ด้วยกลไกสามประการ คือ

2.6.6.1 การทำลายโดยตรง โดยการกินเชื้อราโรคพืชเป็นอาหาร

2.6.6.2 การแก่งแย่งที่อยู่อาศัย และสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต

2.6.6.3 การสร้างสารปฏิชีวนะที่เป็นอันตรายต่อเชื้อโรคชนิดอื่น

นอกจากนี้ เชื้อรา *Trichoderma* spp. มาช่วยกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิต้านทานต่อเชื้อโรคพืช กระตุ้นให้รากพืชเจริญเติบโตดีขึ้น ทำให้รากยาวและแข็งแรง และเมื่ออยู่ในดินจะสร้างสารที่ไปละลายธาตุอาหารในเม็ดหินและดินให้ละลายออกมาเป็นประโยชน์ต่อพืช

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินทั่วไป มีหลายชนิด หลายสายพันธุ์ ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืช โดยมุ่งเน้นไปที่เชื้อราโรคพืชที่เกิดจากดินพบว่าสามารถควบคุมเชื้อราโรคพืชได้ดีหลายชนิด เช่น เชื้อ *Phytopthora* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotium* spp., *Rhizoctonia* spp. เป็นต้น ซึ่งเชื้อ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ราเหล่านี้เป็นสาเหตุของโรคพืชต่างๆ ได้แก่ โรครากเน่าโคนเน่า โรคผลเน่า โรคกล้าเน่าหรือกล้ายุบ โรคเน่าระดับดิน โรคเหี่ยวในพืชตระกูลพริก โรคถอดฝักดาบของข้าว เป็นต้น ปัจจุบันพบว่านอกจากจะเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืชที่อยู่ในดินแล้ว ยังสามารถใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชในส่วนต่างๆของพืชที่อยู่เหนือดินได้ดีเช่นกัน เช่น โรคไหม้ในข้าว โรคแอนแทรกโนสในพริก เป็นต้น และมีแนวโน้มที่จะมีผลไปกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสโรคพืชได้อีกด้วย จึงนับว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเกษตร การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มามาควบคุมโรคพืช ควรใช้ในช่วงเวลาที่แดดอ่อน เหมือนกับชีวภัณฑ์ชนิดอื่นๆ สามารถนำมาใช้ทั้งในด้านป้องกันและรักษาโรค

2.6.7 *Xylaria* spp.

Xylaria spp. เป็นเชื้อราที่พบจากไม้ที่ผุผัง ที่สามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากมายหลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotics) สารต้านมะเร็ง (antitumer) antihypercholesterolemic และ สารพิษในกลุ่ม cytotoxin เป็นต้น ราสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้หลายชนิด เช่น depudecin, phaseolinone, phomenone, 19,20-epoxycytochalacin Q และ (E)-methyl-3-(4-methoxyphenoxy)-propenoate เป็นต้น ซึ่งสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ผลิตจาก Xylaria sp. BCC1067 จัดเป็นสารประกอบในกลุ่ม polyketide คือ depudecin และ 19,20-epoxycytochalacin Q

Depudecin เป็นสารที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อนและมีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการ Histone deacetylase (HDACs) ซึ่งกระบวนการนี้เป็นสาเหตุสำคัญต่อการเกิดการ กลายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตก่อให้เกิดเซลล์มะเร็งได้ และสาร depudecin มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ HDACs นอกจากนี้สาร depudecin มีพิษต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้ด้วย และpropenoate มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียในระดับที่ดี (ประมาณ 0.5-19 mg/ml)

นอกจากนั้นยังพบสาร multiplolides A และ B จาก *Xylaria multiplex* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่ความเข้มข้น 7 และ 2 mg/ml ตามลำดับ สารบางชนิดเช่น phomoxanthones A และ B แยกได้จาก *Phomopsis* sp. ไม่มีฤทธิ์จำเพาะเจาะจงกับเซลล์ เพราะสามารถแสดงฤทธิ์ได้ทั้งเซลล์มะเร็ง เชื้อมาลาเรีย เชื้อวัณโรค อีกทั้งยังเป็นพิษกับเซลล์ปกติ

2.6.8 เชื้อราทะเล (marine fungi)

เชื้อราทะเลเป็นเชื้อราประเภทหนึ่งที่ดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่มีความเค็มสูงได้ เราพบราทะเลได้ในระบบนิเวศป่าชายเลน ป่าชายหาด หรือเกาะอยู่ตามหญ้าทะเล หรือ สาหร่ายทะเล ซึ่งระบบนิเวศเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพอยู่ตลอดเวลา จึงมีการแข่งขันเพื่อ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ความอยู่รอดในระบบนิเวศสูง ราทะเลจึงต้องสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพขึ้นเพื่อป้องกันตัวเอง สิ่งมีชีวิตอื่นๆ และเพื่อความอยู่รอด

เชื้อราทะเลกลุ่มไบทูนิเคท ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายชนิด เช่น

2.6.8.1 เชื้อรา *Aigialus parvus* ผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

2.6.8.2 เชื้อรา *Helicascus kanaloanus* ผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

2.6.8.3 เชื้อรา *Halorosellinia oceanica* เป็นเชื้อราทะเลชนิดหนึ่งที่เก็บได้ในประเทศไทย พบสารหลายชนิด เช่น cytochalasin Q, halorosellinic acid, 5- carboxymellein และ อนุพันธ์ของ 2-hexylidene-3-methylsuccinic acid แต่ผลฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ในระดับปานกลาง

2.6.9 เชื้อราที่พบจากแมลงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.6.9.1 เชื้อรา *Cordyceps unilateralis* มีสารกลุ่ม erythrostominones ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (มีฤทธิ์ยับยั้งประมาณ 4.0-10.1 mg/ml)

2.6.9.2 เชื้อรา *Cordyceps pseudomilitaris* มีสารกลุ่ม bioxanthracenes ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (มีฤทธิ์ยับยั้งประมาณ 1.1-18 mg/ml)

2.6.9.3 เชื้อรา *Myrothecium verrucaria* มีสารกลุ่ม verrucarin A, verrucarin, roridin A, roridin E และ อนุพันธ์ของ roridin E ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (มีฤทธิ์ยับยั้งประมาณ 0.06-0.9 mg/ml)

2.6.9.4 เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* มีสารกลุ่ม cyclodepsipeptides คือ beauvericin และ beauvericin A ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (1.6 mg/ml) และเชื้อวัณโรค (12 mg/ml)

2.7 ชนิดและบทบาทของเอนไซม์ที่เชื้อจุลินทรีย์สร้าง

2.7.1 ไคติน (chitin)

ไคติน เป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติ ซึ่งมีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อไม้ พบเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของรา เห็ด ยีสต์ และจุลินทรีย์หลายชนิด หรือพบเป็นโครงสร้างแข็งของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จำพวกแมลง กุ้ง ปู ปลาหมึก เป็นต้น โดยไคตินมีลักษณะเป็นของแข็ง ละลายได้ในกรดอนินทรีย์ เช่น กรดเกลือ กรดกำมะถัน กรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ แต่ไม่ละลายในด่างเจือจางแอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ไคตินเกิดจากการเรียงต่อกันเป็นสายของ N-acetyl-D-glucosamine เชื่อมต่อกันด้วย glycosidic bond ที่ตำแหน่ง β-1,4 มีสูตรโมเลกุล $(C_8H_{13}O_5)n$ โดยทั่วไปมีชื่อทางเคมีว่า Poly -β-(1,4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose ไคตินที่ได้จากแต่ละแหล่ง มีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกันตามลักษณะการเรียงตัว ของเส้นใยซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.แบบแอลฟา: มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะสวนทางกัน (anti-parallel) มีพันธะไฮโดรเจนอยู่ในเส้นตรงเดียวกัน เป็นโครงสร้างที่มีความแข็งแรงสูง พบในเปลือกกุ้ง และกระดองปู

2.แบบเบต้า: มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในทิศทางเดียวกัน จึงจับกันได้ไม่ค่อยแข็งแรง มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าแบบอัลฟา ได้แก่ ไคตินจากแกนปลาหมึก

3. แบบแกมม่า: มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะที่ไม่แน่นอน สามารถเปลี่ยนรูปร่างเป็นแบบแอลฟาได้ มีความแข็งแรงรองจากแบบอัลฟา ได้แก่ ไคตินจากเห็ด รา และพืชชั้นต่ำ (Robbers, 1996)

Chitinase (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการย่อยสลายไคทิน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคอลลอยด์ดัลไคทินได้เป็น chitobiose และ N-acetylglucosamine โดยมี chitobiose เป็นผลิตภัณฑ์หลัก

Enzyme chitinase

Chitinase เป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด มีฤทธิ์ในการย่อยสลายไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลเชื้อรา จึงมีความเป็นไปได้ว่าสามารถนำมาใช้ร่วมกับยาต้านเชื้อราเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งและทำลายเชื้อรา

บทบาทของ Chitinase enzyme

- ช่วยปุ๋ยเข้าทางใบได้อย่างดีเยี่ยมและรวดเร็ว
- สร้างภูมิคุ้มกันรวมถึงความต้านทานโรคพืชที่สาเหตุมาจากเชื้อรา และแบคทีเรีย
- เสริมสร้างระบบรากโดยทำให้แตกรากรวดเร็วและแข็งแรง
- เร่งการเจริญเติบโตรวมถึงความสมบูรณ์ของพืชได้อย่างชัดเจน
- เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพิ่มมูลค่าเปลือกกุ้งซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตกุ้ง และลดปริมาณขยะ
- ทำลายโครงสร้างของไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลลของเชื้อราหลายชนิด

2.7.2 ไคโตซาน (chitosan)

ไคโตซาน คือ อนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่ acetyl (deacetylation) ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ออกตั้งแต่ 50% ขึ้นไป และมีคุณสมบัติละลายได้ในกรดอ่อน ไคโตซานที่ได้จะมีส่วนผสมของ น้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine และ glucosamine อยู่ในสายโพลิเมอร์เดียวกัน

ปัจจุบันมีการนำไคตินและไคโตซานมาประยุกต์ใช้ ดังนี้ (ประภัสสร, 2551)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.7.1 ด้านอาหาร ไคโตซานมีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิด โดยมีกลไกคือ ไคโตซานมีประจุบวก สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบได้ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนและสารอื่นของเซลล์ ในหลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคตินและไคโตซานให้เป็นสารที่ใช้เติมในอาหารได้ สามารถนำไปใช้เป็นสารกันบูด สารช่วยรักษากลิ่น รส สารให้ความข้น สารเคลือบอาหาร ผัก และผลไม้ เพื่อรักษาความสดหรือผลิตในรูปฟิล์มที่รับประทานได้ (Edible film) สำหรับบรรจุอาหาร

2.7.2 ด้านอาหารเสริม ไคโตซานสามารถช่วยลดคอเลสเตอรอล และไขมันในเส้นเลือดได้โดยไคโตซานจะไปจับกับคอเลสเตอรอล ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมไปใช้หรือดูดซึมได้น้อยลง นอกจากนี้ ทางการแพทย์ มีรายงานการนำ N-acetyl-D-glucosamine ไปใช้รักษาอาการไขข้อเสื่อม โดยอธิบายว่า ข้อเสื่อมเกิดเนื่องจากการสึกกร่อนของเนื้อเยื่ออ่อนที่เคลือบอยู่ระหว่างข้อกระดูก ซึ่ง glucosamine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ proteoglycan และ matrix ของกระดูกอ่อน จึงช่วยทำให้เยื่อหุ้มกระดูกอ่อนหนาขึ้น

2.7.3 ด้านการแพทย์ มีการวิจัยนำแผ่นไคโตซานมาใช้ปิดแผล ช่วยทำให้ไม่เป็นแผลเป็นโดยไคโตซานช่วยลดการหดตัวของ fibroblast ทำให้แผลเรียบ กระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมบาดแผลให้หายเร็วขึ้น

2.7.4 ด้านเภสัชกรรม ใช้ไคโตซานเพื่อควบคุมการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ

2.7.5 ด้านการเกษตร ใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ เนื่องจากไคตินสามารถช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช และกระตุ้นการนำแร่ธาตุไปใช้ ผลคือสามารถเพิ่มผลผลิตและคุณภาพการผลิตได้ ทำให้เกษตรกรมีต้นทุนต่ำลง เนื่องจากลดการใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลง

2.7.6 ด้านการปศุสัตว์ ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดการติดเชื้อ ทำให้น้ำหนักตัวของสัตว์เพิ่มขึ้น

2.7.7 ด้านการบำบัดน้ำเสีย ใช้บำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจาก ไคโตซานมีประจุบวก สามารถจับกับโปรตีนและไขมันได้ดี นอกจากนี้ ไคโตซานยังสามารถดูดซับอิออนของโลหะหนัก และจับสี (dye) จึงช่วยในการบำบัดน้ำเสียได้

8. ด้านสิ่งทอ นำมาขึ้นรูปเป็นเส้นใย และใช้ในการทอร่วมหรือเคลือบกับเส้นใยอื่นๆ เพื่อให้ได้คุณสมบัติการต้านจุลชีพ ลดการเกิดกลิ่นอับชื้น

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ chitosanases ที่ผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Arthrobacter, Bacillus, Streptomyces, Aspergillus* และ *Penicillium* ที่พบได้ปกติในระบบนิเวศน์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Enzyme Chitosanase

Chitosanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลส์ไคโตซานให้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง ทำให้สามารถแพร่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ และขัดขวางการสังเคราะห์ mRNA มีผลยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนได้ ทั้งยังช่วยในการเพิ่มผลผลิตอย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถเสริมสร้างความแข็งแรงต้านทานโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา และแบคทีเรีย

บทบาทของ Chitosanase

- ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพ ต่อต้านมะเร็ง ช่วยลดสารพิษและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นอันตราย เช่น เชื้อซัลโมเนลลา
- ช่วยบำบัดน้ำเสีย โดยช่วยตรึงเอนไซม์ในการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ รวมทั้งสามารถจับของแข็งแขวนลอยได้ดี และจับกับอะตอมของโลหะหนัก
- ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ต่อพืชและสัตว์

2.7.3 เคซีน (Casein)

น้ำนมวัว (cow milk) ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 3.25 โปรตีนที่สำคัญที่พบในน้ำนม ได้แก่ เคซีน (casein) และ เวย์โปรตีน (whey proteins) ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนหลัก 2 ชนิดคือ แอลฟาแลกตัลบูมิน (α-lactalbumin) และเบต้าแลกโตโกลบูลิน(β-lactoglobulin) (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล,2542) เคซีน (Casein) มีปริมาณร้อยละ 80 ของโปรตีนในน้ำนม เป็นโปรตีนที่พบในน้ำนมเท่านั้น มีลักษณะเป็นสีขาว ไม่มีกลิ่นรส เป็นตัวที่ทำ ให้น้ำนมมีสีขาว เคซีนมีความสำคัญต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์นมระหว่างการให้ความร้อน การทำ เข้มข้น และการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังมีผลต่อคุณสมบัติการไหล (rheologial properties) ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวและนมข้น

Casein จัดเป็น Conjugated protein เป็นกลุ่ม milk protein ที่ได้จากการตกตะกอนน้ำนมประเภทปราศจากมันเนย ที่ pH 4.6 ณ อุณหภูมิ 20 °C โดยเฉลี่ยน้ำนมสดจะมีโปรตีน 33 g/L ในจำนวนนี้ เป็น casein ประมาณ 26 g คิดเป็น 79.5% ของโปรตีนทั้งหมด caseinในน้ำนมอยู่ในสภาพที่เป็น micelle อยู่ร่วมกับ phosphate, magnesium และ citrate โดยปกติเคซีนอยู่ในรูปของไมเซลล์ซึ่งกระจายเป็นแบบคอลลอยด์ในน้ำนม เคซีนจะมีลักษณะทรงกลมอย่างหยาบ เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 40-300 nm โดยเฉลี่ยประกอบด้วยเคซีนประมาณ 104 โมเลกุล เคซีนไมเซลล์มีลักษณะเป็นประจุลบ ภายในไมเซลล์ประกอบด้วยสารอนินทรีย์สำคัญคือ แคลเซียมฟอสเฟตซึ่งมีประมาณ 8 กรัมต่อ 100 กรัมเคซีน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยโปรตีนอื่นๆ อีกเล็กน้อย เช่น โปรตีเอส-เปปโตน (Walstra *et al*., 1999)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Enzyme protease

เอนไซม์ในกลุ่ม protease มีหลากหลายชนิด สามารถแบ่งประเภทตามแหล่ง ได้แก่ จากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ หากแบ่งตามลักษณะการทำ งานได้แก่ เอนโดโปรตีเอส และ เอกโซโปรตีเอส เอนโดโปรตีเอส จะตัดพันธะเปปไทด์แบบสุ่มตลอดสายเปปไทด์ ขณะที่เอกโซโปรตีเอสจะตัดพันธะเปปไทด์ได้ทีละ1 อะมิโนแอซิด protease ที่สามารถย่อยโปรตีนในน้ำนมก็มีหลายชนิด เช่น เอนไซม์ไคโมทริปซิน(cymotrypsin) เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) เอนไซม์เรนนิน และเอนไซม์เปปซิน เป็นต้น

บทบาทของ Protease

ในกระบวนการผลิตชีสจะต้องใช้เอนไซม์โปรติเอส 2 ชนิด ในการผลิต ชนิดแรกคือ เรนเนต (เอนไซม์ผสมของ chymosin และ pepsin) ที่ใช้ในด้านการแยกโปรตีนออกจากนมและอีกชนิด คือ เอนไซม์โปรติเอส (ที่ได้จากจุลินทรีย์) ซึ่งใช้ในการบ่มเพื่อให้ได้กลิ่นและรสชาติเฉพาะตัวของชีส ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสเหมือนกันแต่ไม่สามารถใช้แทนกันได้เพราะความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาที่ต่างกัน สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ Mucor miehei หรือ Mucor pusillus สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ของเคซีนในน้ำนมที่ตำแหน่งเฉพาะระหว่างกรดอะมิโน phenylalanine และ alanine ทำให้โปรตีนในน้ำนมเกิดการตกตะกอนและถูกแยกออกมาเป็นชีสนั่นเอง ส่วนโปรติเอสที่ใช้ในขั้นตอนการบ่มเป็นเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย สายพันธุ์ Lactobacilli ซึ่งจะย่อยพันธะเพปไทด์แบบไม่มีความจำเพาะเหมือนเรนเนตช่วยทำให้ได้กลิ่น รส และลักษณะปรากฏที่เป็นเอกลักษณ์ของชีส (Krongsakda,2006)

2.7.4 เจลาติน (Gelatin) (พิมพ์เพ็ญ, 2556)

เจลาตินเป็น ไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ซึ่งเป็นโปรตีน (protein) ที่ได้จากการย่อยและการสกัดคอลลาเจน (collagen) ที่มีอยู่ใน กระดูก หนังสัตว์และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ของสัตว์เช่น ควาย หมู วัว โดยใช้ความร้อน และ กรด หรือ ด่าง เพื่อ ย่อยให้คอลลาเจนโมเลกุลเล็กลงเปลี่ยนเป็นเจลาตินลักษณะเป็นแผ่น ชิ้น เกร็ด หรือ ผงสีเหลืองอ่อน หรือสีเหลืองอำพัน ละลายได้ในน้ำร้อนไม่ละลายในน้ำเย็น แต่จะอ่อนนุ่ม พองตัว และอุ้มน้ำได้ 5-10 เท่าของน้ำหนักเดิม ละลายได้ในกรดอะซิติก (acetic acid) ไม่ละลายในอีเธอร์ คลอโลฟอร์ม และเอทธานอล 98 เปอร์เซ็นต์ เจลาติน (E441) ที่ใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) เมื่อนำผงเจลาตินผสมน้ำ และให้ความร้อน จะเป็นของเหลวหนืด เมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็นของเหลวจะตัวกลายเป็นเจล (gel) ใช้ในอาหารได้หลายวัตถุประสงค์ดังนี้

-ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดเจล(gelling agent) ที่คืนตัวเป็นของเหลวได้เมื่อได้รับความร้อน (thermoreversible gel)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

-ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัว (stabilizer) เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ทำให้น้ำกับไขมันรวมตัวกันได้ดี ไม่แยกชั้น

-ใช้ทดแทนไขมัน (fat replacer) ใช้ในอาหารไขมันต่ำ

-ใช้สำหรับการจับเก็บกลิ่นรส flavor encapsulation

-ใช้เคลือบผิว แฮม ขนมเค้ก เพื่อรักษาความชุ่มชื้น

เจลาติน ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิด ได้แก่

-ผลิตภัณฑ์นม (dairy products) - นมพาสเจอไรซ์ นมยูเอชที, นมเปรี้ยว (ใช้ 0.2-0.8%) , เนยแข็งชนิดนิ่ม (soft cheese) เช่น ซาวร์ครีม, ครีมชีส (cream cheese) ,คอตเตจชีส (cottage cheese) , ชีสสเปรด (เนยทาขนมปัง) , เค้กแช่แข็ง, พุดดิ้ง, เต้าหู้นมสด, คัสตาร์ด, มูส, ไอศครีม, มาการีน, เนยไขมันต่ำ

-ขนมหวาน (confectionery)

- เยลลี่, เม็ดเยลลี่, มาชแมลโล (marshmellow), กัมมีแบร์, หมากฝรั่ง, นูกัต, ลิโคริส, ขนมเคี้ยวหนึบ

-อาหารเคลือบน้ำตาล, เคลือบผิวขนม, เค้กแช่แข็ง, เคลือบทอฟฟี่, ช็อกโกแลต หรือ หมากฝรั่ง

-ชีสเค้ก, ซีเรียลบาร์

-ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ไส้กรอก, เคลือบผิวแฮม

-อาหารกระป๋อง เช่น เนื้อสัตว์กระป๋อง อาหารทะเลกระป๋อง อาหารสัตว์

-อาหารแช่เยือกแข็ง

-ซุป, ซอส, แกง, โจ๊ก

-มาการีน น้ำสลัด

-น้ำผลไม้, แยม

Gelatin สามารถถูกย่อยโดย exoenzyme เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลงแล้วจึงถูกนำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในขบวนการ metabolism เมื่อกรดอะมิโนถูกนำมาสู่เซลล์จะเกิดขบวนการเมตะบอลิซึ่มหลายชนิด ก่อนที่กรดอะมิโนจะสามารถถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจะต้องเกิดปฏิกิริยา deamination เสียก่อน เป็นการนำเอา amino group ออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโนเกิดเป็นแอมโมเนียและกรดอินทรีย์ กรดอะมิโนหลายๆ ชนิดอาจถูก decarboxylation เป็นการนำเอา CO2 ออกจากกรดอะมิโนเกิด amine และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Enzyme Gelatinase

Gelatinase เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถไฮโดรไลซ์ เจลลาติน ซึ่งเป็นโปรตีนจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์ได้

บทบาทของ Gelatinase

- ทำให้น้ำผลไม้ใส เพิ่มปริมาณผลผลิตในน้ำผลไม้
- ช่วยย่อยโปรตีนจากสัตว์ก่อนให้เด็กเล็กรับประทาน

2.7.5 แป้ง (starch) (อาภัสสรา, 2537)

แป้ง เป็น polysaccharide ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสที่ต่อกันเป็นสายตรง (straight chain) และแตกแขนง (branched chain) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมเป็นส่วนใหญ่ในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว พบในรูปของเม็ดแป้ง (starch grains) ใน plastids (amyloplasts) และ chloroplasts ในส่วนของใบ แป้งประกอบด้วย α-amylose และ amylopectin ในปริมาณที่แตกต่างกัน α-amylose ประกอบด้วย D-glucose มาเชื่อมต่อกันเป็นสายโซ่ยาวด้วย α-1,4 glycosidic bond โดยไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขา มีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 1-500 กิโลดาลตัน เมื่อ α-amylose อยู่ในน้ำจะเกิดการสร้างเป็นไมเซลล์ (micelle) ในไมเซลล์นี้ polysaccharide จะอยู่ในลักษณะของการขดตัวเป็นเกลียวยาว (helical coil) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน(I_2) จะให้สีน้ำเงิน amylopectin ประกอบด้วย D-glucose ประมาณ 2,000-200,000 หน่วยกลูโคส ต่อกันด้วยα-1, 4 glycosidic bond ระหว่างโมเลกุลของกลูโคส และทุก 20-25 หน่วยของกลูโคสจะมีการแตกกิ่งก้านสาขาและเชื่อมต่อกันด้วย α-1,6 glycosidic bond โดยมีอัตราส่วนระหว่างพันธะทั้งสองชนิดเป็น 15 : 1 ดังนั้นโครงสร้างของ amylopectin จึงเป็นกิ่งก้านสาขา (branched polysaccharide)

Enzyme amylase

เอนไซม์ amylase เป็นเอนไซม์ ชนิดหนึ่งที่สามารถ hydrolyte พันธะในโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็น dextrin, disacharide เช่น maltose และ monosacharide เช่น glucose ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลเล็กเช่นนี้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ iodine แต่แป้งส่วนที่เหลือสามารถทำปฏิกิริยากับ iodine เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงินและมีการดูดกลืนแสงมากสุด (maximum absorption) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ความเข้มของสีที่เกิดจึงเป็นสัดส่วนผกผันกับแอคติวิตีของเอนไซม์ amylase

บทบาทของ Amylase enzyme

1. นำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการย่อยแป้ง
2. เร่งการหมักให้เกิดได้สูงสุด และป้องกันไม่ให้ขนมปังแห้งแข็ง ช่วยปรับปรุงด้านความยืดหยุ่น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.7.6 เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลส เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45% ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่สะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ในพืชชั้นสูงทุกชนิด ซึ่งมีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่า 97-99% จัดว่าเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ ประกอบด้วย polymer chain เรียงขนานกัน และยึดกันด้วย dispersion force และ hydrogen bond ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่น ทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้ช้า เซลลูโลสใน primary cell wall ประกอบด้วยกลูโคสยาวประมาณ 2,000 โมเลกุล และ ไม่ต่ำกว่า 14,000 โมเลกุลใน secondary cell wall โดยโมเลกุลของเซลลูโลสจะเกาะกันเป็นคู่ตามยาวและเรียงขนานกันเป็นกลุ่ม 40 คู่ เรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) เพื่อให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์ของพืช (Fan *et al*., 1987) โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชชั้นสูง มี 3 แบบ คือ

1. Fringe micelle ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และส่วนที่เป็นอสัณฐาน (Amorphous)

2. โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

3. โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นแบบริบบิ้นและม้วนเป็นเกลียว

โครงสร้างที่แตกต่างกัน 3 แบบ ก่อให้เกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุล ทำให้โมเลกุลไม่ต่อเนื่อง ในธรรมชาติจึงไม่พบเซลลูโลสในรูปอิสระแต่มักรวมกับลิกนิน เฮมิเซลลูโลส เพนโตแซน กัม แทนนิน และ ไขมัน เป็นต้น

ในด้านโครงสร้างทางเคมี เซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส (glucose) จำนวน 1,000-10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลีเมอร์ (polymer) เชื่อมกันด้วย β-1, 4-glycosidic bond ระหว่าง alcoholic hydroxyl groups โดยโมเลกุลสายยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 2,000-15,000 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-2,400,000 ดาลตัน (Dalton) การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนงย่อยมีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)n$ เมื่อ n คือ จำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง (Fan *et al*., 1987) ชนิดของเซลลูโลสแบ่งตามความสามารถในการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. แอลฟา-เซลลูโลส (α-cellulose) คือ เซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5%

2. เบต้า-เซลลูโลส (β-cellulose) คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3. แกมม่า-เซลลูโลส (γ-cellulose) คือ เซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% และสารละลายกรด แต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

ประชาชนส่วนใหญ่ในประเทศไทยประกอบอาชีพเกษตรกรรม ทำให้มีผลพลอยได้และวัสดุอินทรีย์ที่เหลือทิ้ง เช่นใบไม้และเศษวัชพืชจำนวนมาก ก่อให้เกิดปัญหาขยะมูลฝอยตามมา การคิดหาวิธีนำเศษอินทรีย์เหลือทิ้งเหล่านี้ไปแปรรูปหรือเพิ่มมูลค่า จะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ส่วนหนึ่ง ตัวอย่างของเศษวัสดุอินทรีย์ที่มีส่วนประกอบเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ

การย่อยสลายเซลลูโลส (Cellulose hydrolysis) (Fan *et al*., 1987)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นผลึกหรือเป็น linear homopolymer ของกลูโคสที่จับกันด้วย β-1, 4-glucosidic linkage ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย นอกจากนี้โดยธรรมชาติของเซลลูโลสจะมี lignin จับอยู่ ซึ่งเป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยาการย่อยสลาย การย่อยสลายเซลลูโลสทำได้ 2 วิธี คือวิธีการทางเคมีหรือการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งต้องทำภายใต้อุณหภูมิสูง วิธีนี้มีข้อจำกัด คือให้ปริมาณกลูโคสต่ำ และเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการด้วย และวิธีการทางชีวภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะทำให้ปฏิกิริยาการย่อยเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง คือที่อุณหภูมิประมาณ 50°C ความดันบรรยากาศ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารประกอบเซลลูโลสมาก ทำให้ไม่สูญเสียกลูโคสระหว่างเกิดปฏิกิริยาและไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

ข้อดีของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

1. เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ จึงเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องให้ความร้อนทำให้ประหยัดต้นทุนในการผลิต

2. ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะเกิดได้เร็วกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาถึงภาวะสมดุลได้เร็ว

3. เอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มาก

4. ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น

5. เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารที่มีโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงได้ตามที่ต้องการ

6. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น และ สามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยเซลลูโลสได้

7. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อนแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส

ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสมีดังนี้

1. แบคทีเรียในกระเพาะอาหารของสัตว์กินพืช เช่น วัว ควาย ในดิน เช่น *Bacillus sp.*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

และ ในทะเล เช่น *Cytophaga* sp. (Larry *et al*., 2006)

2. แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาพทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เช่น *Cellvibrio* sp. และ *Cellulomonas* sp. เป็นต้น

3. แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เช่น *Clostridium thermophilum* และ *Ruminococcus albus* เป็นต้น

4. Myxobacteria เช่น *Sporocytophaga* sp.

5. จุลินทรีย์ที่เป็นปรสิตในพืช มีทั้งพวกย่อยเซลลูโลสอย่างเดียว หรือก่อโรคในพืชด้วย เช่น *Pseudomonas solanacearum* (ปัจจุบันคือ *Ralstonia solanacearum*) ทำให้เกิดโรคเหี่ยวในพืช จุลินทรีย์ย่อยไม้ ได้แก่ แอคติโนไมสีท เป็นต้น (Fergus, 1969)

แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนจะย่อยเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์หลัก 2 ชนิด คือ CO_2 และสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ส่วนรา และแอคติโนไมสีท จะได้ CO_2 เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และเกิดกรดอินทรีย์ในปริมาณน้อย อัตราการย่อยเริ่มต้นจะถูกจำกัดด้วยกระบวนการ oxidation ของคาร์โบไฮเดรต เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของสารตัวกลาง ซึ่งจะเกิดขึ้นขณะมีการใช้น้ำตาล ส่วน mesophilic และ thermophilic anaerobe ไม่สามารถย่อยสารตั้งต้นอย่างสมบูรณ์ได้ สารอินทรีย์หลายชนิดจึงถูกขับออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเกิดการสะสมของ CO_2, H_2, ethanol และกรดอินทรีย์ เช่น acetic acid, lactic acid และ succinic acid เป็นต้น (Bisaria and Ghose, 1981)

การย่อยเซลลูโลสขั้นต้นเกิดจากการที่โมเลกุลถูก hydrolyse โดยเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งเอนไซม์จะเข้าทำการย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ แต่ข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์เกิดจากการที่สารตั้งต้นละลายน้ำได้น้อย จากนั้น cellulose derivative ที่เกิดขึ้นก็จะถูกย่อยต่อ ได้เป็น monosaccharide หรือ disaccharide ผลผลิตขั้นตอนต่อมาของการย่อยจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ และเนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ จากนั้นจึงดูดซึมสู่ภายในเซลล์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป (ยุพดี, 2527)

Enzyme Cellulose

Cellulose เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทาหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะβ-1,4-glycosidic ภายในโครงสร้างโมเลกุลของ Cellulose หน่วยเล็กที่สุดหากการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้glucose (พิจิตรา, 2548) โดยพบว่าเอนไซม์นี้สร้างได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และรา เป็นต้น (Klyosov, 1990) ส่วนใหญ่ถูกสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งถูกเหนี่ยวนาให้สร้างโดยสิ่งแวดล้อม เนื่องจากโมเลกุลของ Cellulose ไม่สามารถเข้าสู่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น จุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์เพื่อย่อย Cellulose จนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ จากนั้นจึงดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป (Alexander, 1967) โดยจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาอย่างมาก ได้แก่เชื้อรา เช่น *Aspergillus niger, Trichoderma* spp. เป็นต้น (Dashtban *et al*., 2009)

บทบาทของ Cellulose enzyme

- ย่อยสลาย Cellulose (ไฟเบอร์ที่พบในผักต่างๆ) โดยปกติแล้ว ร่างกายไม่สามารถผลิตเอนไซม์ Cellulose เอง

- ส่งผลให้เส้นใยเปลี่ยนจากสีครีมเป็นสีขาวสดใส เส้นใยเรียงตัวสม่ำเสมอ มีลักษณะอ่อนนุ่ม ขนลดน้อยลงมากที่สุด

-ใช้ในการผลิตน้ำตาลจากเซลลูโลส (cellulosic sugar) สำหรับผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและเคมีภัณฑ์จากวัตถุดิบชีวภาพ

- ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้เอนไซม์ปริมาณมาก ช่วยลดต้นทุนการผลิตด้วย และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพถึง 10-20%

Enzyme lipase

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลไขมันเมื่อไขมันถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์และจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอล และกรดไขมัน จึงมีชื่อตามระบบว่า triacylglycerol ester hydrolase นอกจากเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของไขมันแล้วไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ (transesterification) ซึ่งเป็นการย้อนกลับของปฏิกิริยานี้ด้วย และด้วยคุณสมบัติของไลเปสจึงเป็นเอมไซต์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆมากมายได้แก่ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมผลิตสารลดแรงตึงผิว อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมบำบัดของเสีย และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางโดยเฉพาะกลุ่มทำความสะอาดเป็นต้น(ณกัญภัทร, 2549)

Lipase สามารถไฮโดรลิซิส (hydrolysis) โมเลกุลของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบต่าง ๆ ได้แก่ กรดไขมันอิสระ กลีเซอรอล อัลดีไฮด์ คีโตน แอลกอฮอล์ เปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งเป็นสารประกอบที่ระเหยได้ ทำให้อาหารมีกลิ่นรสผิดปกติไป แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไขมันได้ ได้แก่ *Pseudomonas* spp., *Achromobactor* spp. (วีระสิทธิ์และคณะ,2545)

บทบาทของ Lipase enzyme

นำมาใช้ในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง และยา (ณกัญภัทร จินดา)

ใช้ในบ่อบำบัดดักไขมัน

ไฮโดรไลซ์ไขมันให้กรดไขมันซึ่งเป็นพิษต่อโปรโตซัวชนิด Giadin lamblia

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในดินที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.8.1 ด้านสารต้านจุลชีพ

บัวสายและคณะรายงานว่า *Bacillus amyloliquefaciens* ที่แยกได้จากดินมีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Fuarium solani* TISTR 3436 ได้ (บัวสายและคณะ, 2010)

Umezawa รายงานว่า *Streptomyces* spp. สร้างสารต่อต้านมะเร็ง (anti-tumour agent) เช่น บลีโอมัยซิน (bleomycin) ซึ่งเป็นสารพวกไกลโคเปปไทด์ (glycopeptide) ผลิตโดย *S. verticillus* มีผลทำให้สายดีเอ็นเอขาด limocrocin ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคได้ (Umezawa, *et al*, 1966)

วรรณดีและวีระศักดิ์ รายงานว่า *Pseudomonas fluorescens* ที่แยกได้จากดินช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ และยังสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (วรรณดี และวีระศักดิ์, 2551)

สุขุมวัฒณ์ และญาณียังพบว่า *S. marcescens* สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งในต้นข้าวได้ (สุขุมวัฒณ์ และญาณี, 2550)

2.8.2 ด้านเอนไซม์

ขจีนาฏและคณะพบว่า *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากดินและสิ่งแวดล้อมสามารถผลิตเอนไซม์ที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) โปรติเอส (proteiase) และไลเปส (lipase) โดยเอนไซม์โปรติเอส ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ หรือโพลีเปปไทด์ของโปรตีนเป็นกรดอะมิโน ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เบียร์ เนยแข็งอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก และใช้ในทางเภสัชกรรมเป็นต้น (ขจีนาฏ และคณะ, 2541)

พิจิตรา และคณะคัดเลือกเชื้อรา ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน เพื่อลดขยะ และนำเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป (พิจิตรา, 2548)

วีระสิทธิ์ และคณะได้ทำการจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือและศึกษาสมบัติของเอนไซม์ เพื่อนำเอนไซม์ที่ได้มาใช้ประโยน์ ให้เหมาะสมกับคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ (วีระสิทธิ์ และคณะ, 2545)

2.9 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่นำมาทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่นำมาทดสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพในครั้งนี้ เลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน เพื่อการตรวจสอบผลของสารต้านจุลชีพต่อเชื้อแต่ละประเภทโดยเลือก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราชนิดต่างๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ESBL; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella* Typhi, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เชื้อรา ได้แก่ *Candida albicans, Cryptococcus neoformans* ซึ่งคุณสมบัติของแบคทีเรียและเชื้อรา แต่ละชนิดที่นำมาทำการศึกษาดังนี้

(Extended Spectrum Beta-Lactamase, ESBL)

ESBL เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียชนิดแกรมลบรูปแท่ง โดยจะพบมากในแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Enterobateriaceae เช่น *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* และแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae เช่น *Pseudomonas aeruginosa* โดยมีฤทธิ์ในการสลายยากลุ่มบีตา-แลคแทมได้จำนวนมากชนิดขึ้นได้แก่ penicillin, oxyimino cephalosporin และ aztreonam แต่ไม่มีผลต่อยา cephamycin หรือ carbapennem โดยจัดอยู่ใน function group 2be และ Ambler's molecular class A หรือ class D ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีการดื้อยาบีตา-แลคแทมเกือบทุกกลุ่ม เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ บีตา-แลคทาเมสชนิดใหม่ที่มีการค้นพบได้ทั่วโลก ซึ่ง ESBL มีความสามารถในการทำลายยาในกลุ่ม บีตา-แลคแทมที่แตกต่างกัน และสามารถพบในแบคทีเรียต่างชนิดกัน ทั้งนี้สามารถจำแนกกลุ่มโดยอาศัยความคล้ายคลึงกัน และที่มาของต้นกำเนิดของเอนไซม์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์และคุณสมบัติอื่นๆ ซึ่งยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว อาจอยู่บนโครโมโซม หรือ พลาสมิด โดยสามารถส่งผ่านไปยังแบคทีเรียที่ต่างวงศ์กันได้ ในปัจจุบันนี้พบเอนไซม์กลุ่มนี้ไม่น้อยกว่า 90 ชนิด และสามารถตรวจพบในเชื้อแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ ในประเทศไทยมีรายงานการพบแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBLซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในวงศ์ Enterobacteriaceae และ Pseudomonadaceae ตลอดจนสามารถตรวจพบ ESBL ชนิดใหม่ได้เป็นครั้งแรก คือ SHV-12 และ SHV-2a นอกจากนี้ยังมี ESBL กลุ่มอื่นๆ ที่กำลังค้นพบกันอีกมากมาย

Extended -spectrum β-lactamase (ESBL) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง พบครั้งแรกในเชื้อ *Klebsiella ozaenae* ในประเทศเยอรมัน จากนั้นก็พบกระจายไปทั่วโลก (Bradford, 2001) เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ในเชื้อหลายกลุ่มเช่น *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Capnocytophaga ochracea* เป็นต้น โดยเอนไซม์ ESBL สามารถทำลาย β-lactam ring ซึ่งเป็นโครงสร้างของยาในกลุ่ม penicillins นอกจากนี้ยังทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มของ cephalosporins และ monobactams อีกด้วย จึงเป็นปัญหาต่อการรักษาเป็นอย่างมาก

2.9.1 *Escherichia coli*

2.9.1.2 ลักษณะทั่วไปของ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนตรง ปลายมน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่มีขนาด 0.6 x 2 - 4 µm เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเสริม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 - 5 mm ขอบเรียบ ตรงกลางมีลักษณะนูน ผิวเรียบมัน มีสีเทาขาว และลักษณะทึบ ซึ่ง *E. coli* นี้มีหลาย serotype และหลาย biotype ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ เชื้อสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เช่น มีชีวิตอยู่ตามเสื้อผ้าแห้ง และในฝุ่นละอองได้หลายวัน อยู่ในน้ำได้นานหลายสัปดาห์ เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45ºC) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60ºC 15 นาที หรือ 55ºC 60 นาที

2.9.1.1 การก่อโรค

1) ท้องร่วง (gastroenteritis) เชื้อ *E.coli* ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในคนและสัตว์คือ

1.1 Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) ทำให้เกิดโรคท้องร่วงกับเด็กและผู้ใหญ่ เชื้อจะสร้าง Enterotoxin ซึ่งเป็น exotoxin

1.2 Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) อุจจาระร่วงจากเชื้อกลุ่มนี้ยังถือว่าไม่ค่อยชัดเจนนัก อาจก่อให้เกิดอุจจาระร่วงในเด็กเล็กแถบประเทศกำลังพัฒนา

1.3 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ทำให้เกิดโรคท้องร่วงคล้ายโรคบิดที่เกิดจาก *Shigella* ถึงแม้ว่า *Shigella* จะมีความรุนแรงมากกว่า เพราะใช้เชื้อน้อยกว่าในการทำให้เกิดอาการโรคนี้เกิดได้กับทุกวัยทั้งเด็กโตและผู้ใหญ่

1.4 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) พบครั้งแรกใน ค.ศ. 1982 ในสหรัฐอเมริกา *E.coli* ที่พบคือ *E.coli* O 157 ที่พบมากคือ *E.coli* O 157: H7 ที่ทำให้เกิดอาการ

1.5 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ทำให้เกิดท้องร่วงรุนแรงในเด็กแรกเกิดและเด็กทารก จนถึง 2 ขวบ ไม่ทำให้เกิดโรคในผู้ใหญ่ *E.coli* สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดท้องร่วงแบบเป็นน้ำ ไม่มีเลือดปน (watery diarrhea) และมีอาการมีไข้ คลื่นไส้ อาเจียน

2) ทางเดินปัสสาวะอักเสบ (urinary tract infections) *E.coli* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดทางเดินปัสสาวะอักเสบได้บ่อยที่สุด (มากกว่า 80%) ในหญิงสาว ก่อโรคได้รุนแรงเนื่องจากสร้าง hemolysin และเกาะติดกับเยื่อบุผิวของทางเดินปัสสาวะได้ ผู้หญิงมีโอกาสเป็นโรคนี้ได้มากกว่าผู้ชาย เพราะ urethra ของผู้หญิงสั้นกว่า โดยเชื้อจะอยู่ในอุจจาระและอาจรวมกลุ่มอยู่ใกล้ช่องคลอดและรอบ ๆ urethra ทำให้เชื้อมีโอกาสเข้าไปยังกระเพาะปัสสาวะได้ ผู้ป่วยที่ได้รับการสวน urethra มีโอกาสติดเชื้อประมาณ 1% ของคนไข้ ทำให้มีแบคทีเรียจำนวนมากอยู่ในน้ำปัสสาวะ (bacteriuria) อาการจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อบุกรุกเข้า mucosa ทำให้เซลล์ตาย และเกิดการอักเสบทำให้เกิดโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) เชื้อที่บุกรุกอาจเข้าสู่ ureter เพิ่มจำนวนขึ้นในกรวยไต (renal pelvis) ทำให้เกิดโรคภาวะไตและกรวยไตอักเสบ (pyelonephritis)

มหาวิทยาลัยราชภัฏ Rajabhat University

3) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (neonatal meningitis) *E.coli* เป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารกอายุ 1 เดือนแรกมากที่สุดเหมือน streptococci group B เยื่อหุ้มสมองอักเสบที่เกิดจาก *E.coli* นี้จะเกิดจากสายพันธุ์ K1 มากที่สุด (เกือบ 90%) สายพันธุ์ K1 นี้มี capsular antigen เป็น polysaccharide อยู่ที่ผิวเซลล์ การเกิดโรคอาจเกิดจากทารกได้รับเชื้อจากมารดาโดยผ่านทาง nasopharynx หรือลำไส้ หลังจากเชื้อเข้ากระแสเลือดจะถูกนำไปเยื้อหุ้มสมอง (นงลักษณ์, 2547)

2.10 *Klebsiella pneumoniae*

2.10.1 ลักษณะทั่วไปของ *Klebsiella pneumoniae*

สัณฐานวิทยาของ *Klebsiella pneumoniae* มีลักษณะเป็น gram negative bacilli ที่ค่อนข้างกลม มีแคปซูลหนา เมื่อย้อมแกรมจะเห็นเป็นวงใสๆ รอบตัวเชื้อ เคลื่อนที่ไม่ได้เพราะไม่มี Peritrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ Mucoid colony เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพบาบาล มักก่อโรคในระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินปัสสาวะ มักเกิดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน

2.10 2 การก่อโรค

สามารถก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนในมนุษย์ได้ในหลายๆ ระบบ เช่น ปอดบวม (pneumonia) ฝีในอวัยวะภายในต่างๆ โดยเฉพาะโรคปอดบวมที่เกิดในโรงพยาบาล (hospital-acquired pneumonia) โดยเชื้อจะทำลายเนื้อเยื่อปอดทำให้เกิดโพรงหนองและทำให้เสมหะมีเลือดและข้นเหนียว การที่เชื้อมีแคปซูลจึงสามารถก่อโรคได้รุนแรง เนื่องจากไปขัดขวางกระบวนการ phagocytosis และ complement fixation (อิสยา และคณะ, 2548) นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรคในทางเดินปัสสาวะอีกด้วย จึงทำให้ยากต่อการรักษาถ้าเชื้อ *K .pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยนั้นเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ ESBL หรือมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น cefepime, cefoxitin, ciprofloxacin, amphicillin และ carbinicillin

2.11 *Salmonella* Typhi

2.11.1 ลักษณะทั่วไปของ *Salmonella* Typhi

Salmonella Typhi เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว ยกเว้น *S. pullorum* และ *S. gallinarum* เชื้อนี้ไม่มีแคปซูลและสปอร์เจริญได้ดีในที่มี หรือไม่มีออกซิเจน สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคสและแมนโนสได้กรดบางทีได้ก๊าซด้วย แต่ไม่สามารถเฟอร์แมนน้ำตาลแล็กโทสและซูโครสได้ ให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือก๊าซ จากการเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรต สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา เชื้อส่วนใหญ่ไม่ต้องการวิตามิน หรือ กรดอะมิโน ต้องการทริปโตเฟน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.11.2 การก่อโรค

ไข้ไทฟอยด์ Typhoid fever (Salmonellosis) มักก่อโรคในเด็กทารก เด็กเล็กและวัยรุ่น เชื้อจะปนเปื้อนในน้ำและอาหาร เช่น สัตว์ปีก เนื้อหมู เนื้อวัวและผลิตภัณฑ์จากนม เชื้อจะถูกแพร่กระจายจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่ง ทำให้เกิดอาการท้องเสียหลังกินอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ 12-48 ชั่วโมงมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย เป็นเวลา 3-4 วัน จนถึงสัปดาห์ คนป่วยประมาณครึ่งหนึ่งจะมีไข้ การติดเชื้อจะมีการทำลายเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้อาจทำให้ทะลุ และเข้าสู่กระแสเลือดได้ทำให้เกิดอาการไข้เนื่องจากพิษของ endotoxin และถึงแก่ความตายได้ถ้าไม่ได้รับการรักษา

S. Typhimurium พบปนเปื้อนได้ในมูลสัตว์และแหล่งน้ำ (โสภณ คงสำราญ.) ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์หรือไข้รากสาดน้อย (Typhoid fever, Enteric fever) มีอาการไข้สูงคงตัวที่ประมาณ 40 องศาเซลเซียส เหงื่อออกมาก กระเพาะ และลำไส้อักเสบมีอาการท้องเสียโดยไม่มีเลือดปน ความร้ายแรงของการติดต่อถูกจำกัดเฉพาะที่ในลำไส้เล็กหรือกระเพาะความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย (Tuin, A) หากมีการใช้มูลสัตว์หรือน้ำที่มีการปนเปื้อนด้วย *S.* Typhimurium ในการผลิตแบบเกษตรอินทรีย์อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนในพืชผักผลิตภัณฑ์เกษตรได้

2.6.4 *Staphylococcus aureus*

2.6.4.1 ลักษณะทั่วไปของ *Staphylococcus aureus*

S.aureus อยู่ในตระกูล *Micrococcaceae* มีลักษณะทรงกลม (เส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ 0.5-1.5 µm) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive cocci in cluster) แต่เชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้นานๆ หรือจากสิ่งส่งตรวจเก่า ๆ อาจจะย้อมไม่ติดสี *Staphylococci* ไม่มีแฟลกเจลลา ลักษณะ colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้น คือ กลม ขอบเรียบทึบแสงมีสีเหลือง เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 10 - 40ºC แต่อุณหภูมิที่พอเหมาะคือ 37ºC เจริญในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี

2.6.4.2 การก่อโรค

1) การติดเชื้อที่ผิวหนัง ที่พบทั่วไปได้แก่ ฝี (boils หรือ furuncles) พบตามบริเวณต่าง ๆ ของร่างกายโดยไม่จำเป็นต้องมีรอยขีดข่วนใด ๆ มาก่อน โดยเฉพาะบริเวณรอบริมฝีปาก ทำให้เกิดเนื้อเยื่ออักเสบตามมา

2) อาหารเป็นพิษ (Staphylococcal food poisoning) เกิดเนื่องจาก *S. aureus* สร้าง enterotoxin หากรับประทานอาหารที่มีสารพิษนี้ปนเปื้อนเข้าไป จะทำให้เกิดอาการอาหาร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เป็นพิษ ภายหลังการบริโภคประมาณ 1 - 6 ชั่วโมง โดยมีอาการท้องร่วงรุนแรง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง แต่ไม่มีไข้ อาการจะหายในประมาณ 1 วัน

3) ช็อก (Toxic shock syndrome) มักพบในสตรีขณะที่มีประจำเดือน วันที่ 2 - 3 มีอาการแสดงคือไข้สูง ท้องเดิน ความดันต่ำ มีผื่นตามผิวหนังและช็อก

4) ผิวหนังหลุดลอก (Scalded skin syndrome) พบบ่อยในทารกแรกคลอดและเด็กอ่อน เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ที่สามารถสร้าง erythrogenic toxin บางครั้งเป็น exfoliative dermatitis (Ritter's disease) ซึ่งมีอาการคล้ายกับไข้ดำแดง (scarlet fever) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Streptococcus* spp.

5) ปอดบวม (Staphylococcal pneumonia) โดยทั่วไปมักติดเชื้อนี้ภายหลังเป็นโรคอื่น ๆ มาก่อน เช่น ผู้ป่วยหลังผ่าตัด ได้รับยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นเวลานาน ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายหลังจากการป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่ อาการที่พบ มีไข้ หนาวสั่น เจ็บหน้าอก ลักษณะการอักเสบอาจเป็นแบบปอดอักเสบรอบหลอดลม หรือปอดอักเสบเฉพาะกลีบ (lobar pneumonia) อาจมีอาการแทรกซ้อน เชื้ออาจลุกลามเข้ากระแสเลือดได้ อัตราการตายของโรคปอดบวมจากเชื้อนี้สูงถึงร้อยละ 50 แม้ว่าจะได้รับยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเชื้อลุกลามเข้ากระแสเลือดแล้ว

6) ไขกระดูกอักเสบ (Osteomyelitis) *S. aureus* เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคนี้ โดยเฉพาะในเด็กซึ่งมีการติดเชื้ออื่นเล็กน้อยอยู่แล้ว หรือมีบาดแผลธรรมดา อาการจะเกิดขึ้นทันทีทันใด โดยจะเจ็บปวดบริเวณแผล มีไข้ และอ่อนเพลีย

7) เยื่อบุหัวใจอักเสบ (Endocarditis) ที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* มักมีปัญหายุ่งยากซับซ้อน หากมีการติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจเทียม (prosthetic heart valves) ก็ควรต้องผ่าตัดเอาส่วนที่ติดเชื้อออกไป

8) ลำไส้อักเสบ (Staphylococcal enteritis) ตามปกติพบเชื้อ *S. aureus*ในลำไส้ได้ไม่มากนัก แต่เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นหากสมดุลของเชื้อเสียไปเนื่องจากการรับประทานยาปฏิชีวนะ เช่น ในผู้ป่วยที่จะผ่าตัดช่องท้อง แล้วได้รับยาฆ่าเชื้อก่อนการผ่าตัดทำให้เกิดการระคายเคือง ทางเดินอาหารอักเสบ ผู้ป่วยจากโรคนี้จะมีอาการท้องเดินเฉียบพลัน อาเจียน มีไข้สูง สูญเสียน้ำและเกลือแร่ ในกรณีที่เชื้อสามารถแบ่งตัวได้รวดเร็วจะอยู่กันเป็นกลุ่มใหญ่ ทำให้เกิด pseudomembranous enterocolitis คล้ายกับอาการที่เกิดเนื่องจากเชื้อ *Clostridium difficile* ทำให้ช็อกถึงแก่ชีวิตได้

9) หูอักเสบ พบว่าเชื้อนี้ทำให้หูชั้นนอก และหูชั้นกลางอักเสบ โดยมักเกิดร่วมกับการติดเชื้อในลำคอแล้วลามเข้าหูชั้นกลาง อาจลามไปถึงโพรงกระดูกหลังหูได้ ในบางรายอาจลุกลามไปยังสมองหรือเยื่อหุ้มสมอง ซึ่งเป็นอันตรายร้ายแรง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

10) กุ้งยิง (stye) เป็นการติดเชื้อที่ขอบเปลือกตา เชื่อว่าเกิดจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิต lipase ได้ดี ทำให้ต่อมบริเวณนั้นอุดตันและอักเสบ

Staphylococcus aureus ที่ดื้อยาแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน (methicillin-resistant *S. aureus*: MRSA) และ *Staphylococcus aureus* ที่ไวต่อยาเมธิซิลลิน (methicillin-susceptible *S. aureus*: MSSA)

กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) จากการที่เชื้อ *S. aureus* ดื้อยาเพนนิซิลินเพิ่มมากขึ้นจึงเกิดการพัฒนายาเพนนิซิลินให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2503 มีการพัฒนายาเพนนิซิลินกึ่งสังเคราะห์ (semisynthetic penicillin) โดยการเปลี่ยนแปลง side chain ของ penicillin-G ทำให้ได้ยาชนิดใหม่ เช่น เมทธิซิลลิน (methicillin) นาฟซิลิน (nafcillin) และออกซาซิลิน (oxacillin) ซึ่งมีคุณสมบัติทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์บีตา-แลคทาเมส จึงใช้ยากลุ่มนี้ในการรักษา *S. aureus* ที่ดื้อยา แต่ในปี พ.ศ. 2504 เริ่มพบเชื้อดื้อยาเมทธิซิลลิน หรือ methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) โดยทั่วไป *S. aureus* จะไวต่อยาปฏิชีวนะบีตา-แลคแตม เนื่องจากยาปฏิชีวนะเข้าไปแย่งจับกับ PBPs (penicillin binding proteins) ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมพันธะเพปไทด์ระหว่าง N-acetylmuramic acid สองโมเลกุลในการสร้างเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) แต่เชื้อ MRSA มีการพัฒนากลไกในการสร้าง PBP2a ซึ่ง PBP2a มีคุณสมบัติในการจับกับยากลุ่มบีตา-แลคแตม ได้ต่ำมาก ดังนั้นการใช้ยากลุ่มบีตา-แลคแตม เช่น เพนนิซิลิน หรือ เพนิซิลินกึ่งสังเคราะห์ (semisynthetic penicillin) เช่น ออกซาซิลินและเมทธิซิลิน จึงไม่ได้ผลกับเชื้อกลุ่ม MRSA8 นอกจากนี้เชื้อ MRSA ยังสามารถต้านยากึ่งสังเคราะห์ชนิดอื่นด้วย เช่น แอมพิซิลิน (ampicillin) เมทธิซิลิน นาฟซิลิน (nafcillin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) เตตราซัยคลิน อิริโทรมัยซิน คลอแรมฟินิคอล สเตรปโตมัยซิน และvancomycin (vancomycin) เป็นต้น และนอกจากนี้ เชื้อ MRSA ยังสามารถสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมส มาทำลายโครงสร้างบีตา-แลคแตมของยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น ออกซาซิลิน เรียก *S. aureus* สายพันธุ์นี้ว่า borderline oxacillin resistant *S. aureus* (BORSA) ซึ่งสามารถรักษาด้วยยาปฏิชีวนะร่วมกัน เช่น ampicillin/sulbactam และamoxicillin/clavulanate เป็นต้น นอกจากนี้การดื้อยาเมทธิซิลินยังเกิดจากการเพิ่มจำนวนของ PBP ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ PBP2a เรียกสายพันธุ์นี้ว่า modifiled PBP *S. aureus* (MODSA) แต่ทั้ง BORSA และ MODSA มักไม่ดื้อยาปฏิชีวนะข้ามไปกลุ่มอื่นๆ (อิสยา และคณะ, 2548)

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (*MRSA*)

เชื้อแบคทีเรียที่มีชื่อเรียกว่า *Staphylococcus aureus* หรือที่นิยมเรียกสั้นๆ ว่าเชื้อ "staph" เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบบริเวณผิวหนังและภายในโพรงจมูกของบุคคลทั่วไป บางครั้งเชื้อนี้ก่อให้เกิดโรค

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

และพบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่ผิวหนังได้บ่อยที่สุดในบรรดาเชื้อก่อโรคทั้งหลาย การติดเชื้อส่วนใหญ่ถือว่าไม่รุนแรง เช่น อาจเกิดเป็นลักษณะของหนองฝีติดเชื้อ และส่วนใหญ่หายเองได้โดยไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะแต่อย่างใด แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ staph อาจก่อให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงได้เหมือนกัน เช่น การติดเชื้อที่แผลผ่าตัด หรือปอดอักเสบติดเชื้อ ที่ผ่านมาแพทย์รักษาภาวะติดเชื้อ staph ชนิดรุนแรงด้วยยาในกลุ่ม penicillin แต่ปรากฏว่าในระยะหลังพบเชื้อ staph ดื้อยามากขึ้นเรื่อยๆ จึงเรียกเชื้อที่ดื้อยาเหล่านี้ว่า methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA

เชื้อ Staph และ MRSA อาจพบได้ที่ผิวหนังและในโพรงจมูกโดยไม่ก่อให้เกิดโรคแต่อย่างใด เรียกภาวะนี้ว่า colonization พบได้ประมาณร้อยละ 25 ถึง 30 ของประชากรทั่วไป ในกรณีที่เชื้อก่อให้เกิดโรค อาจเกิดเป็นภาวะติดเชื้อที่ผิวหนัง กระดูก ปอด หรือติดเชื้อในกระแสโลหิต ซึ่งถือว่ามีความรุนแรงมากที่สุดและทำให้ผู้ป่วยถึงกับเสียชีวิตได้ เนื่องจากเชื้อ MRSA เป็นเชื้อ staph ชนิดหนึ่ง ดังนั้นการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อจึงเหมือนกันทุกประการ อย่างไรก็ตามพบว่าการติดเชื้อ MRSA พบได้บ่อยในโรงพยาบาล การติดเชื้อ MRSA มักพบในผู้ป่วยที่นอนพักรักษาตัวในโรงพยาบาล โดยเฉพาะผู้ป่วยหนัก ผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยแผลกดทับ และผู้ป่วยที่ต้องใช้สายสวนปัสสาวะหรือสายให้น้ำเกลือและยาทางหลอดเลือด การติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลมักจะรุนแรง ปัจจัยที่ทำให้พบการติดเชื้อ MRSA ในโรงพยาบาลมากขึ้น ได้แก่ การที่ผู้ป่วยต้องนอนโรงพยาบาลเป็นเวลานานหลายวัน การใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างขวาง การเข้ารับการดูแลในหออภิบาลผู้ป่วยหนัก (ICU) คลุกคลีใกล้ชิดกับผู้ติดเชื้อ MRSA ในผู้ป่วยหลังผ่าตัด และผู้ที่เป็นพาหะมีเชื้อ MRSA ในโพรงจมูก เชื้อ MRSA อาจก่อให้เกิดโรคนอกโรงพยาบาลได้เช่นกัน พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ MRSA ที่พบในชุมชน มีความสัมพันธ์กับแบบแผนการใช้ยาปฏิชีวนะ สิ่งของเครื่องใช้ที่ปนเปื้อน หรือในชุมชนที่อาศัยร่วมกันอย่างแออัด และเกือบทั้งหมดเป็นการติดเชื้อที่ผิวหนัง ในแง่ของการรักษาทั้งการติดเชื้อ staph และ MRSA มียาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาได้ผลเป็นอย่างดี ส่วนใหญ่แล้วการติดเชื้อ staph ที่ผิวหนังรักษาได้โดยการกรีดหนองออก และอาจไม่จำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามหากใช้ยาปฏิชีวนะ ก็ควรใช้ยาให้ถูกต้องครบทั้งขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสม การแพร่กระจายของเชื้อ staph และ MRSA เกิดจากการสัมผัสโดยตรง ไม่แพร่กระจายทางอากาศดังนั้นวิธีป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจึงประกอบไปด้วยหลักสำคัญสามประการ ประการแรก ต้องหมั่นล้างมือให้สะอาดอยู่เสมอ ประการที่สอง รักษาความสะอาดของบาดแผลและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำแผล และประการสุดท้าย ต้องหลีกเลี่ยงการสัมผัสบาดแผลหรือสิ่งปนเปื้อนของผู้ป่วย *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อตั้งแต่ยุคก่อนมียาต้านจุลชีพมาจนถึงปัจจุบัน เชื้อ *S. aureus* เกือบทั้งหมดเคยไวต่อยา natural penicillins เมื่อครั้งที่เริ่มมียาดังกล่าวเมื่อปี พ.ศ. 2483 ทำให้อัตราตายจากการติดเชื้อ *S. aureus* ลดลงมาก เชื้อ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

S. aureus เริ่มปรับตัวโดยการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ทำให้เชื้อนี้ดื้อต่อยากลุ่ม natural penicillins มากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงปัจจุบันที่เชื้อ *S. aureus* มากกว่าร้อยละ 90 สามารถสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ได้ ทำให้ยากลุ่ม natural penicillins ไม่สามารถรักษาการติดเชื้อที่เกิดจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase นี้ได้ แต่โรคติดเชื้อที่เกิดจาก *S. aureus* สายพันธุ์ดังกล่าวก็สามารถรักษาได้ผลดีด้วยยากลุ่ม penicillinase-resistant penicillin (เช่น cloxacillin) เนื่องจากยากลุ่มนี้สามารถทนต่อเอ็นซัยม์ beta-lactamase ที่สร้างจาก *S. aureus* ได้ และยังคงเป็นยาสำคัญในการรักษาการติดเชื้อจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ beta-lactamase เรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน สำหรับเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากลุ่ม penicillinase-resistant penicillin ที่เรียกว่า Methicillin Resistant *S.aureus* (MRSA) นั้นเริ่มพบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 เชื้อนี้ดื้อต่อยากลุ่ม penicillinase-resistant penicillin โดยการเปลี่ยนแปลง penicillin binding protein (PBP) ชนิดที่ 2 ให้กลายเป็น PBP2' หรือ PBP2a ซึ่งไม่สามารถจับกับยากลุ่ม beta-lactam ทุกขนานได้ดี ทำให้ยากลุ่ม beta-lactam ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ การสร้าง PBP ดังกล่าวที่ในเชื้อ MRSA ถูกควบคุมโดย *mecA* gene, เชื้อ MRSA มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อ และ มีความรุนแรงไม่แตกต่างจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่ใช่ MRSA, เชื้อ MRSA เป็นเชื้อก่อโรคสำคัญในสถานพยาบาลทั่วโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 และมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ เชื้อ MRSA มักก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลโดยร้อยละ 30 ถึง 60 ของ *S. aureus* ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศไทยเป็น MRSA ในระยะหลายปีที่ผ่านมาเริ่มมีรายงานการติดเชื้อ MRSA ในชุมชนบ้างแล้ว การติดเชื้อ MRSA ในชุมชนส่วนหนึ่งเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อ MRSA จากผู้ป่วยที่เคยอยู่โรงพยาบาลหรือบุคลากรการแพทย์ที่มี MRSA colonization เชื้อ MRSA ที่ผู้ป่วยได้รับขณะอยู่ในโรงพยาบาลสามารถคงอยู่ในผู้ป่วยรายนั้นได้นานหลายเดือน และสามารถแพร่กระจายไปยังบุคคลอื่นในครอบครัวได้ด้วย เชื้อ MRSA ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในชุมชนส่วนหนึ่งมักพบในเด็กซึ่งเชื้อ MRSA สายพันธุ์เหล่านี้ยังไวต่อยาบางขนาน เช่น clindamycin, co-trimoxazole เป็นต้น ส่วนเชื้อ MRSA ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลนอกจากจะดื้อต่อยากลุ่ม beta-lactam ทุกขนานแล้ว ยังมักดื้อต่อยากลุ่มอื่นด้วย เช่น aminoglycosides, macrolides การติดเชื้อ MRSA ในชุมชนในผู้ป่วยในประเทศไทยยังพบได้น้อยมาก

2.6.5 *Candida albicans*

2.6.5.1 ลักษณะทั่วไปของ *Candida albicans*

Macroscopic examination: เชื้อเจริญเร็วใน 1-3 วัน โคโลนีสีครีม นูนผิวเรียบมัน ระยะแรกโคโลนีคล้ายเชื้อ *Staphylococcus* ต่อมาจะสังเกตเห็นเส้นของสายรายื่นออกมารอบ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

โคโลนี เมื่อแก่ขึ้นโคโลนีหยาบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเห็นสายราที่ยื่นเข้าไปในเนื้ออาหารวุ้น มีลักษณะคล้ายขนนก

Microscopic examination: บน cornmeal-tween 80 agar หรือ rice agar เพาะเลี้ยงที่ 25 องศา พบเซลล์ยีสต์รูปกลมถึงรี เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่ม แตกหน่อบริเวณรอยคอดของ pseudohyphae และตรวจพบ true hyphae ได้ด้วย ที่ปลายสายรามี clamydospore รูปกลมใหญ่ผนังหนา สร้างบริเวณใกล้ขอบของ coverslip

2.6.5.2 การก่อโรค

1) โรคติดเชื้อในปาก (Candidiasis of oral cavity) ลักษณะทางคลินิกที่พบบ่อย คือ ฝ้าขาวในปาก มักพบในเด็กทารก เนื่องจากภูมิคุ้มกันต่อเชื้อยังเกิดไม่เพียงพอ ติดเชื้อจากหัวนมขวดนม หรือน้ำนมที่ใช้เลี้ยงทารก ติดเชื้อจากช่องคลอดมารดาที่เป็นโรคตกขาวจาก *Candida* นอกจากนี้ยังพบในคนชรา ผู้ที่ป่วยด้วยโรคมะเร็งและผู้ป่วยโรคเรื้อรังอื่นๆ ลักษณะเป็นแผ่นฝ้าสีขาว หนาพอประมาณคลุมอยู่บริเวณกระพุ้งแก้ม ลิ้น เหงือก เพดานปาก ตลอดจนทอนซิล คล้ายฝ้าฟันน้ำนม ซึ่งขูดออกได้ง่ายโดยเลือดไม่ออก เด็กเป็นโรคจะไม่ดูดนม ร้องกวน อีกแบบหนึ่งคือ ปากนกกระจอก ผิวหนังตรงมุมปากเป็นโรคด้านใดด้านหนึ่ง หรือทั้งสองข้าง มีลักษณะเปื่อยยุ่ยเป็นคราบสีขาวและเห็นรอยปริ อาจพบน้ำเหลืองจับกรังเป็นสะเก็ดสีเหลืองอยู่ที่ขอบ ในภาวะที่ภูมิต้านทานต่ำมากๆ อาจกลายเป็น Candida granuloma ขึ้นมาได้

2) โรคติดเชื้อบริเวณอวัยวะเพศ (Candidiasis of the genetalia) ในผู้หญิงการเกิดตกขาวจากเชื้อ *Candida* พบได้บ่อยและมีอาการคันรุนแรง มีสาเหตุเสริมหลายประการ เช่น การมีครรภ์ การร่วมเพศ ตกขาวมีลักษณะเป็นเมือกสีขาวข้น มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว ภายในช่องคลอดพบว่าผิวเยื่อบุที่เป็นโรคมีลักษณะเป็นแผ่นฝ้าสีขาว เปื่อยยุ่ยและมีแผลตื้นๆขนาดเล็ก ในรายที่เป็นมากเมือกขาวจะไหลออกมานอกช่องคลอดลุกลามไปถึงทวารหนักและขาหนีบ ส่วนในอวัยวะเพศของผู้ชายก็อาจเกิดโรคจากเชื้อ *Candida* ได้ ลักษณะทางคลินิกเกิดที่ด้านบนของปลายองคชาติ เมื่อเริ่มเกิดเป็นจุดสีแดงขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุดกระจายอยู่ทั่วไป ต่อมาตุ่มเหล่านี้แตกออกกลายเป็นฝ้ายุ่ยสีขาวอยู่เต็มผิวหนังบริเวณที่เป็นโรค เมื่อฝ้าเหล่านี้หลุดออกไปหมดผิวเนื้อจะมีสีแดงสด มีอาการแสบและคัน อาจพบการอักเสบของหลอดปัสสาวะร่วมด้วย คือมีเมือกใสหรือสีขาวขุ่นในตอนเช้า ผู้ป่วยมีอาการแสบและคันบางเวลา (พรรณกร, 2536)

2.6.6 *Cryptococcus neoformans*

2.6.6.1 ลักษณะทั่วไปของ *Cryptococcus neoformans*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Macroscopic examination: เชื้อเจริญได้ใน 3-5 วัน ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มี cycloheximide ซึ่งเจริญช้ากว่าเชื้อใน Genus *Candida* เล็กน้อย โคโลนีแบน สีขาวถึงครีม ลักษณะเด่นคือ โคโลนีเยิ้มคล้ายมูกเนื่องจากมี capsule เมื่อแก่โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

Microscopic examination: บน cornmeal-tween 80 agar หรือ rice agar เพาะเลี้ยงที่ 25°C พบเซลล์ยีสต์รูปร่างกลมผนังสีเข้ม มีทั้งขนาดใหญ่และเล็ก ห่อหุ้มด้วย capsule ที่มองไม่เห็น ไม่พบการสร้าง pseudohyphae หรือ true hyphae

2.6.6.2 การก่อโรค

1) ก่อโรคที่ปอด จากการสูดดมยีสต์เซลล์ที่พบตามธรรมชาติ ถ้าความต้านทานของร่างกายดี อาการที่ปรากฏมักมีไม่มาก เช่นมีอาการไข้ ไอ มีเสมหะปนเลือด คล้ายป่วยด้วยวัณโรคไข้หวัด แล้วอาการต่างๆหายได้เอง จึงมีรายงานตรวจพบเชื้อได้ในหลอดเลือด แต่ผู้ป่วยจะมีอาการไม่รุนแรง ส่วนน้อยที่ก่อโรคที่ปอดและเกิดอาการซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อได้ อาการคล้ายวัณโรคปอดอักเสบที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น มีไข้ ไอ เจ็บหน้าอก มีเสมหะ น้ำหนักลด ซึ่งมักเกิดในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ

2) ก่อโรคที่ระบบประสาท เชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่ผ่านเข้ามาในกระแสเลือดมักก่อโรคที่สมอง โดยเฉพาะเยื่อหุ้มสมอง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำไขสันหลังไม่มีเม็ดเลือดขาวและคอมพลีเมนต์ช่วยในการกำจัดจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีสารไนโตรเจนที่กระตุ้นการเจริญของเชื้อ เช่น Asparagine, Creatinine จึงพบว่า *Cryptococcus neoformans* มีอุบัติการณ์ก่อโรคที่เยื่อหุ้มสมองมากที่สุด ผู้ป่วยมีอาการไข้ ปวดศีรษะ คอ แข็ง หลังแข็ง เมื่อตรวจน้ำไขสันหลังจะพบเชื้อได้ พยาธิสภาพที่ระบบประสาทอาจเกิดก้อนฝีในสมอง หรือเกิดการอักเสบทั้งที่สมองและเยื่อหุ้มสมอง (พรรณกร, 2536)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การออกแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัย (ประเภท) : การวิจัยประยุกต์

ในสาขา (ระบุสาขาวิชาที่ทำการวิจัย) : จุลชีววิทยาคลินิก

โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยเชิง ทดลองเพื่อการป้องกันโรคและรักษาสุขภาพ

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือ

Incubator	Memmert/Germany
เครื่อง Autoclave	ASTELL/UK
เครื่อง Centrifuge	Sanyo,Harrier/UK, Hettich,Micro200R/Germany
เครื่อง Vortex mixer	SNP Scientific Co.,Ltd/Thailand
เครื่อง pH meter	Metrohm, 713 pH meter/Switzerland
เครื่อง Spectrophotometer	Thermo spectronic, Genesys 20/USA
เครื่องชั่ง	Ohaus, ARC120/USA
Hot air oven	Memmert/Germany
Refrigerator 4^{0}C	
Freezer -20 ^{0}C,-70^{0}C	Pattana intercool Co.,Ltd/Thailand
Laminar flow	Triwork 2000 Co.,Ltd/Thailand
กล้องจุลทรรศน์	
Autopipett + tip	Gennex /Finland
Rotary shaker	
Magnetic stirrer + magnetic bar	

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.2.2 อุปกรณ์

Erlenmeyer flask 250, 500, 1000 ml	Pyrex/USA
Volumetric flask 250, 1000 ml	Pyrex/USA
Cylinders 10, 50, 1000 ml	Pyrex/USA
Beakers 100, 250, 500, 1000 ml	Pyrex/USA
Glass rod V shape	
Glass funnel	
Stirring rod	
Screw cap test tube	Pyrex/USA
Serological pipette 2, 10 ml	
Culture plate	Thermo Fisher Scientific/Germany
Glass slide	United Science Co.,Ltd/Thailand
Cover slip	
Vial tube	
Inoculating loop	United Science Co.,Ltd/Thailand
Needle	United Science Co.,Ltd/Thailand
Forceps	United Science Co.,Ltd/Thailand
Tip	United Science Co.,Ltd/Thailand
Spreader	United Science Co.,Ltd/Thailand
Dropper	United Science Co.,Ltd/Thailand
Eppendorf	United Science Co.,Ltd/Thailand
ช้อนตักสาร	
Test Tube Racks	United Science Co.,Ltd/Thailand
cork borer ขนาด 4-5 mm.	
Sterile cotton swab	Nited Science Co.,Ltd/Thailand
Sterile Syringe Filters Size: 18mm, 0.45um	United Science Co.,Ltd/Thailand
Bunsen burner	United Science Co.,Ltd/Thailand
แผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อ	Advantec/Japan
กระดาษชั่งสาร	United Science Co.,Ltd/Thailand
แท่งแก้ว	United Science Co.,Ltd/Thailand

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.2.3 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ

95 % ethanol	Merck/USA
70% Ethanol	Fluka/Japan
5% Sodium hypochlorite (Clorox)	Haiter/THailand
0.85 % Sodium chloride	FISONS/England
Gram's stain Clinag/Japan	
Lactophenol cotton blue	Clinag/Japan
Lugol's iodine	
Mercuric chloride solution	
0.2% aqueous Congo red	
1M Sodium chloride	
Catalase reagent	Fluka Biochem/Japan
Oxidase reagent	Fluka Biochem/Japan
Kovac's reagent	
Methyl red indicator	
Sufanilic acid solution	
α-Naphthylamine solution	
Zinc dust	
5% α-Naphthol	
40%Potassium hydroxide	
1N Hydrochloric acid	

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี

Trypticase soy broth	BBL / USA
Nutrient agar	Difco / USA
Potato dextrose agar	Difco / USA
Yeast extract-malt extract agar	Difco / USA
Basal mineral salt medium	Difco / USA
MacConkey agar	Difco / USA
Blood agar	Criterion / USA
Starch agar	BBL / USA

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Gelatin agar	BBL / USA
Skim milk agar	
Chitin medium	
Chitosan medium	
Cellulose medium	BBL / USA
Tween-20 medium	
Tween-80 medium	
DNase test medium	BBL / USA
Thioglycolate broth	BBL / USA
Triple sugar iron	BD/USA
Lysine iron agar	BD/USA
Bile esculin agar	BBL / USA
Motility test media	BD/USA
Indole (1%Tryptone broth)	BBL / USA
Methyl red broth	BD/USA
Voges-Proskauer broth	BD/USA
Simmon's Citrate	BD/USA
Urease test media	BD/USA
Nitrate broth	BBL / USA
Ornithine decarboxylase	
Malonate broth	Ferak/Berlin
Mannitol phenol red broth	Ferak/Berlin
Glucose OF bromthymol blue	FISONS/England

3.2.5 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบ

เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบฤทธิ์ ดังนี้ เชื้อรา ได้แก่ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* และเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ESBL (*E.coli*), *Klebsiella pneumonia*e, *Salmonella* Typhimurium, Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) (ATCC25923) และ Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); MRSA 4, MRSA 5, MRSA 6, MRSA 14, MRSA 18, MRSA 28, MRSA 29, MRSA 31, MRSA 34, MRSA 36

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง ดิน จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างดินแบบสุ่ม โดยเก็บมาจากดินในสวน ดินในทุ่งนา ดินบนภูเขา ดินบริเวณแม่น้ำ ดินป่าชายเลน และดินบริเวณกองขยะ แล้วนำมาแยกเชื้อจุลชีพออกจากดิน เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา และแบคทีเรีย รวมทั้งการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและที่สนใจของเชื้อแต่ละชนิด

3.3.2 การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่สนใจ จำนวนอย่างน้อย 75 ตัวอย่างโดยคำนวณจากสูตรในการหาขนาดตัวอย่างดังต่อไปนี้

$$n = \frac{Z^2_{\alpha/2} P(1-P)}{e^2}$$

เมื่อ n = จำนวนสมาชิกกลุ่มตัวอย่าง

P = ค่าเฉลี่ยร้อยละของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Z = ระดับความเชื่อมั่น (ในงานวิจัยนี้ใช้ระดับความเชื่อมั่น 95% Z=1.96) (นที และ วิรัญชน์; 2553)

e = สัดส่วนของความคลาดเคลื่อนที่ยอมให้เกิดขึ้น (1%)

$$n = \frac{1.96^2 \times 0.27 \times 0.73}{0.01} = 75 \text{ ตัวอย่าง}$$

จากนั้นทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากหน้าดินในแต่ละบริเวณประมาณ 4-5 จุดนำมารวมกันใส่ในถุงพลาสติกรัดยางปากถุงให้แน่นเมื่อนำกลับมาห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ นำตัวอย่างออกมาแผ่แล้วปล่อยให้ตัวอย่างแห้งในที่ร่มแล้วบดให้ละเอียดเก็บไว้ในภาชนะที่มิดชิด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การทดสอบที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.3 การแยกเชื้อในกลุ่ม bacteria เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ทางชีวภาพ

การแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate method โดยชั่งตัวอย่างดิน 3 กรัม ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 27 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง rotator shacker ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที ปล่อยให้ดินตกตะกอน จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลายดิน 1 ml มาใส่ในหลอดฝาเกลียวที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลายดิน 0.1 ml มากระจายบนผิวหน้าอาหาร Nutrient agar และBasal mineral salt medium โดยวิธี spread plate method บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-2 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน และเลือกเก็บเฉพาะโคโลนีเดี่ยว มาย้อม Gram's stain ตรวจดู cell morphology และนำมา cross streak ให้บริสุทธิ์ นำโคโลนีของแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้มาทำการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี จากนั้นเก็บเชื้อลงใน Nutrient Agar หรือเก็บใน Trypticase soy broth ที่ -80 $^{\circ}$C ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.4 การแยกเชื้อในกลุ่ม เชื้อรา เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ทางชีวภาพ

การแยกเชื้อในกลุ่มเชื้อรา ด้วยวิธี spread plate method โดยชั่งตัวอย่างดิน 3 กรัม ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 27 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง rotator shacker ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที ปล่อยให้ดินตกตะกอน จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลายดิน 1 ml มาใส่ในหลอดฝาเกลียวที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เจือจางต่อให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลายดิน 0.1 ml มากระจายบนผิวหน้าอาหาร Basal mineral salt medium และYeast extract-malt extract agar โดยวิธี spread plate method บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน และเลือกเก็บเฉพาะโคโลนีเดี่ยว มาย้อมเพื่อตรวจดู morphology และนำมา cross streak ให้บริสุทธิ์ จากนั้นเก็บเชื้อราลงใน Potato dextrose Agar หรือเก็บใน Trypticase soy broth ที่ -80 $^{\circ}$C ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.5 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้โดยวิธี Cross streak method

1) นำเชื้อทดสอบ ที่เก็บไว้ใน freezing vial แล้ว มาทำการ culture บนอาหาร Nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย และอาหาร Potato Dextrose Agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นเชื้อรา เพื่อให้ได้ pure culture

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2) นำโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน ที่ต้องการทดสอบมาขีดตั้งฉากเป็นแนวยาวที่กลางเพลทที่มีอาหาร Nutrient agar

3) นำเชื้อจุลินทรีย์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1-2 วัน เพื่อให้สร้างสารต้านจุลินทรีย์ออกมา

4) นำเชื้อทดสอบมาทำ Cross streak เพื่อ screening ดูฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบที่สนใจ โดยขีดเชื้อทดสอบแต่ละไอโซเลตตั้งฉากกับเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่ขีดไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย และที่อุณหภูมิ 30°C สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นเชื้อรา เพื่อดู inhibition zone ที่เกิดขึ้น วัด inhibition zone ที่เกิดขึ้นในหน่วย mm. แล้วเลือกเชื้อที่ให้ inhibition zone ขนาดที่สนใจไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.6 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้โดยวิธี Agar diffusion method

3.3.6.1 การเตรียม inoculum ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน

1) นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจจากการทดสอบข้างต้น มาทำการ culture บนอาหาร Nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) นำโคโลนีของเชื้อมาปรับความขุ่นใน normal saline โดยนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 nm. ให้อยู่ในช่วง 0.08-0.1 ซึ่งจะเท่ากับปริมาณแบคทีเรีย 1.5×10^{8} CFU/ml

3.3.6.2 การเตรียม inoculum ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

1) นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้ใน freezing vial แล้วมาทำการ culture บนอาหาร Nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) นำโคโลนีของเชื้อมาปรับความขุ่นใน normal saline โดยนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 nm. ให้อยู่ในช่วง 0.08-0.1 ซึ่งจะเท่ากับปริมาณแบคทีเรีย 1.5×10^{8} CFU/ml

3.3.6.3 การเตรียม inoculum ของยีสต์ที่ใช้ทดสอบ

1) นำเชื้อยีสต์ที่เก็บไว้มาทำการ culture บน PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 25-30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับ *C. albicans* และ 48 ชั่วโมงสำหรับ *C. neoformans*

2) นำโคโลนีของเชื้อมาปรับความขุ่นใน normal saline นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 nm. จะต้องอยู่ในช่วง 0.12-0.15 ซึ่งจะเท่ากับปริมาณยีสต์ $1–5\text{x}10^{6}$CFU/ml

มหาวิทยาลัยศิลปากร Silpakorn University

หมายเหตุ : ควรทำการปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ก่อนทำการทดสอบความไวของยาต่อต้านจุลชีพไม่เกิน 15 นาที

3.3.6.4 การทำ Agar diffusion

1) นำเชื้อทดสอบ streak ด้วยวิธี three way swab ลงในplate Nutrient agar จากนั้นทำการเจาะรู agar ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 mm. ด้วย sterile cork borer

2) สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ใช้ autopipette ดูดเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่ทำการปรับความขุ่นไว้แล้ว 10 µl มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เจาะหลุมไว้แล้ว สำหรับเชื้อรา ใช้โคโลนีของเชื้อที่ทำการตัดเจาะให้มีขนาด 4-5 mm ไว้แล้ว มาวางบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นวัด inhibition zone ที่เกิดขึ้น แล้วเลือกเชื้อที่ให้ inhibition zone ขนาดที่สนใจ นำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.7 การทำ Extracellular filtration

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ที่น่าสนใจจากการทดสอบข้างต้น มาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมให้อยู่ในระยะ log phase (เชื้อแบคทีเรียอายุ 1-2 วัน) และ stationary phase (เชื้อแบคทีเรียอายุ 2-3 วัน) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนน้ำใส (supernatant) ที่ได้ไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 µm เพื่อทำเป็น Extracellular filtration เก็บไว้เพื่อทดสอบหาค่าต่ำสุดและสูงสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ ในการทำ modified microdilution method ต่อไป

3.3.8 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากดินที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้โดยวิธี Modified microdilution method

3.3.8.1 การเตรียม inoculum ของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

1) นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้ใน freezing vial แล้วมาทำการ culture บนอาหาร Nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) นำโคโลนีของเชื้อมาปรับความขุ่นใน normal saline โดยนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 nm. ให้อยู่ในช่วง 0.08-0.1 ซึ่งจะเท่ากับปริมาณแบคทีเรีย 1.5×10^{8} CFU/ml นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้วมาเจือจางในอัตราส่วน 1 : 100 ใน TSB เพื่อให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^{6} CFU/ml

3.3.8.2 การเตรียม inoculum ของยีสต์ที่ใช้ทดสอบ

1) นำเชื้อยีสต์ที่เก็บไว้มาทำการ culture บน PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 25-30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับ *C. albicans* และ 48 ชั่วโมงสำหรับ *C. neoformans*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2) นำโคโลนีของเชื้อมาปรับความขุ่นใน normal saline นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 nm. จะต้องอยู่ในช่วง 0.12-0.15 ซึ่งจะเท่ากับปริมาณยีสต์ 1–5x10^6CFU/ml

หมายเหตุ : ควรทำการปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ก่อนทำการทดสอบความไวของยาต่อต้านจุลชีพไม่เกิน 15 นาที

3.3.8.3 การทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี modified microdilution

1) นำ Extracellular Filtration ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจจากการทดสอบ Agar diffusion มาทำการเจือจางด้วยอาหารเหลวปราศจากเชื้อ โดยวิธี two-fold dilution ใน sterile microtiter plate เตรียม control ของ Extracellular Filtration ในหลุมที่ 11 โดยไม่เติมเชื้อ เพื่อตรวจสอบ aseptic technique ของการเจือจาง และเตรียม Negative control เป็น control อาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมที่ 12 (A-C) เพื่อตรวจสอบ sterility ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียม Growth control ของเชื้อในหลุมที่ 12 (D-F) โดยไม่เติม Extracellular Filtration เพื่อตรวจการเจริญเติบโตของเชื้อ

2) เติม inoculum ของเชื้อที่เตรียมไว้ใน 3 แถวบน (A-C) ตั้งแต่หลุมที่ 1-10 เป็นหลุมทดสอบ หลุม Growth control หลุมละ 50 µl

3) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อในแถว D-F ตั้งแต่หลุมที่ 1-10 เพื่อเป็น control ของ Extracellular Filtration ในแต่ละความเข้มข้น

4) ปิดฝา microtiter plate จากนั้นนำไป incubated ที่ 37ºC เป็นเวลา 15 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย ใส่สาร resazurin indicator (0.18%) หลุมละ 10 µl นำไป incubated ที่ 37ºC ให้ครบเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผลโดยชุดควบคุมทดสอบใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1,000 µg/ml ทำการทดสอบที่เหมือนกันอีก 3 ครั้ง

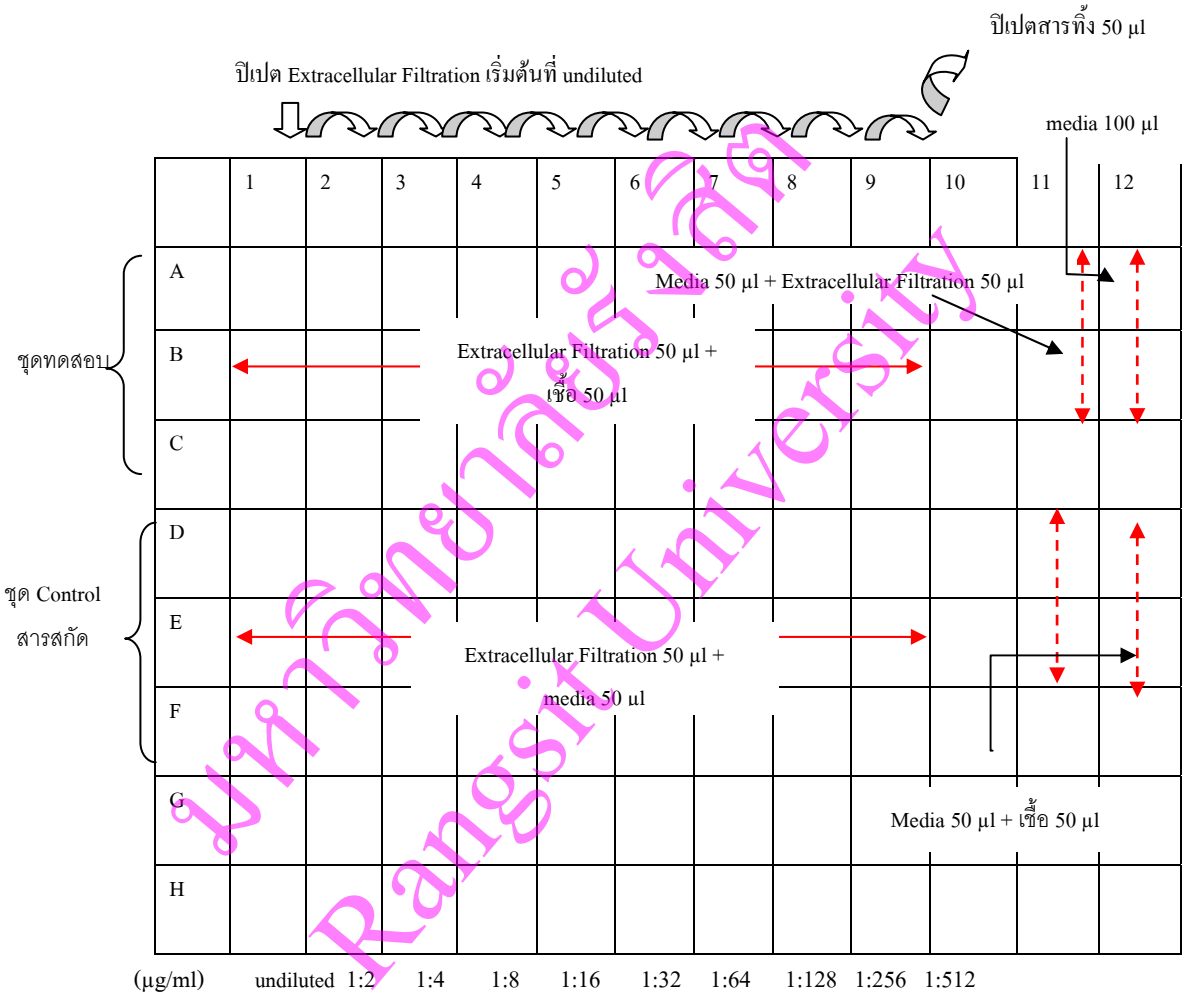
5) ในกรณีของยีสต์ ก็ทำเช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่จะใช้อาหาร RPMI-1640 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับ *C.albicans* ใส่สาร resazurin indicator (0.18%) หลุมละ 10 µl นำไป incubate ที่ 37ºC ให้ครบเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผล สำหรับ *C.neoformans* incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่สาร resazurin indicator (0.18%) หลุมละ 10 µl นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องให้ครบเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผลโดยชุดควบคุมทดสอบใช้ยาปฏิชีวนะ Ketoconazole ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1,000 µg/mlทำการทดสอบที่เหมือนกันอีก 3 ครั้ง

การแปลผล

เมื่อหยด resazurin indicator (0.18%) 10 µl แล้วหลังจาก incubate ถ้าให้ผลเป็นสีน้ำเงินหรือสี

มหาวิทยาลัยศิลปากร Silpakorn University

ม่วง แสดงว่าผลเป็นบวกคือ Extracellular Filtration จากไอโซเลทนั้นๆ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ และถ้าให้ผลเป็นสีชมพูหรือไม่มีสีแสดงว่าให้ผลเป็นลบคือ Extracellular Filtration จากไอโซเลทนั้นๆ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ดูผลและบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จากนั้นนำผลที่เป็นบวกจากการทดสอบ MIC ไปทดสอบ MBC และ MFC ต่อไป



รูปภาพที่ 3.1 แสดงวิธีการทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี modified microdilution

3.3.9 การทดสอบหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของ Extracellular Filtration จากไอโซเลตต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อที่ได้จากการหาค่า MIC ใน Microtiter plate แต่ละความเข้มข้นมาทำการหาค่า MBC ดังนี้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1) ถ่ายเชื้อ 1 loop จากหลุมที่ให้ผลเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วงทั้งหมดมา streak ลงบน Mueller-Hinton agar (ที่ไม่มีสารสกัดผสมอยู่) โดยแบ่ง plate ออกเป็น 4 ส่วนแล้ว streak เชื้อจากแต่ละหลุมลงบนแต่ละส่วนของ plate แบบ zigzag

2) นำ plate ไปบ่มที่ 37 ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3) ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยสังเกตจากการเจริญเป็นโคโลนีบนรอย streak

4) Dilution ที่มากที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อได้ (เชื้อไม่เจริญอีกบนอาหารแข็งที่ไม่มีสารสกัด) คือค่า MBC

3.3.10 การทดสอบหาค่า Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของ Extracellular Filtration จากไอโซเลตต่างๆ ต่อเชื้อราที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อที่ได้จากการหาค่า MIC ใน Microtiter plate แต่ละความเข้มข้นมาทำการหาค่า MFC ดังนี้

1) ถ่ายเชื้อ 1 loop หลุมที่ให้ผลเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วงทั้งหมดบน PDA (ที่ไม่มีสารสกัดผสมอยู่) โดยแบ่ง plate ออกเป็น 4 ส่วนแล้ว streak เชื้อจากแต่ละหลุมลงบนแต่ละส่วนของ plate แบบ zigzag

2) นำ plate ไปบ่มที่ 25-30 ºC เป็นเวลา 7 วัน

3) ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยสังเกตจากการเจริญเป็นโคโลนีบนรอย streak เทียบกับเชื้อที่นำมาจากหลุมที่มีแต่เชื้อและไม่มีสารยับยั้งใดๆ

4) Dilution ที่มากที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อได้ (เชื้อไม่เจริญอีกบนอาหารแข็งที่ไม่มีสารสกัด) คือค่า MFC

3.3.11 การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่สามารถสร้าง enzyme ที่สนใจได้โดยวิธี direct agar spot method (Fleming *et al.*, 1985)

3.3.11.1 การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis test)

นำเชื้อแต่ละไอโซเลต อายุ 24-48 ชั่วโมง inoculate บนผิวหน้าอาหาร starch agar บ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง ทดสอบการไฮโดรไลซ์แป้ง โดยเท Lugol's iodine ให้ท่วมผิวอาหาร ถ้ามีการไฮโดรไลซ์แป้งจะเกิดโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรีย เนื่องจากแป้งบริเวณนั้นถูกไฮโดรไลซ์หมดไป (แสดงผลบวก) ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถไฮโดรไลซ์แป้งจะเป็นสีน้ำเงินเช่นเดียวกับจานเปรียบเทียบ (ไม่ได้ inoculateเชื้อ)

3.3.11.2 การทดสอบการย่อยเซลลูโลส (Cellulase test)

Heavy inoculate เชื้อแต่ละไอโซเลต ที่มี อายุ 18-24 ชั่วโมง บน Cellulose agar นำไปบ่มที่ 37 ºC เป็นเวลา 18-48 ชั่วโมง แล้วราดด้วย congo red (Hendricks and Doyle, 1995)เพื่อ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ย้อมสีและราด 1M NaCl 15 นาที เพื่อ destained ถ้าเกิดโซนใสรอบโคโลนีแสดงผลเป็นบวก หากไม่เกิดโซนใสรอบโคโลนีแสดงผลเป็นลบ

3.3.11.3 การทดสอบการย่อยไคติน

นำเชื้อเลี้ยงบนอาหาร chitinase selective media, บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจดูการย่อยสลาย ทุก 1-2 วัน โดยดูจากวงใสรอบๆบริเวณที่เชื้อเจริญหรือตรงใต้โคโลนี เปรียบเทียบกับการย่อยสลายของเอนไซม์ไคติเนส (จักรพันธ์ และสุพรรณี, 2552)

3.3.11.4 การทดสอบการย่อยไคโตซานเนส

นำเชื้อเลี้ยงบนอาหาร chitosanase selective media บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจดูการย่อยสลาย ทุก 1-2 วัน โดยดูจากวงใสรอบๆบริเวณที่เชื้อเจริญหรือตรงใต้โคโลนี เปรียบเทียบกับการย่อยสลายของเอนไซม์ไคโตซานเนส (จักรพันธ์ และสุพรรณี, 2552)

3.3.11.5 การทดสอบการย่อย Skim milk

นำเชื้อเลี้ยงบนอาหาร Skim milk agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ºC เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจดูการย่อยสลาย ทุก 1-2 วัน โดยดูจากวงใสรอบๆบริเวณที่เชื้อเจริญหรือตรงใต้โคโลนี (จักรพันธ์ และสุพรรณี, 2552)

3.3.11.6 การทดสอบการย่อยเจลาติน (GelatinaseTest)

Heavy inoculate เชื้อแต่ละไอโซเลต ที่มี อายุ 18-24 ชั่วโมง บน Gelatin agar นำไปบ่มที่ 37 ºC เป็นเวลา 18-48 ชั่วโมง แล้วราดด้วย acid mercuric chloride ถ้า Gelatin agar ตกตะกอนเป็นสีขาวขุ่น และเกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อแสดงผลเป็นบวก หาก Gelatin agar ตกตะกอนเป็นสีขาวขุ่น และไม่เกิดโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อแสดงผลเป็นแสดงผลเป็นลบ

3.3.11.7 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Lipase

Esterasic activity

สูตรอาหาร Basal mineral salts medium autoclave + sterilized 1% tween 80 ผสมรวมกันได้โดยตรง การใส่เชื้อ ใช้วิธี point inoculation การตรวจผล ดูโซนใสใต้โคโลนี ภายใน 7 วัน (จักรพันธ์ และสุพรรณี, 2552)

Lipolytic activity

สูตรอาหาร Basal mineral salts medium autoclave + sterilized 1% tween 20 ผสมรวมกันได้โดยตรง การใส่เชื้อ ใช้วิธี point inoculation การตรวจผล ดูโซฯใสใต้โคโลนี ภายใน 7 วัน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3.3.12 การระบุชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่ผ่านการคัดเลือก

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อก่อโรค หรือมีการสร้างจากการทดสอบข้างต้น มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังต่อไปนี้

3.3.12.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ศึกษาลักษณะโคโลนี สีโคโลนี รูปร่างและขนาดของเซลล์ การผลิตสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.12.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย ตามลักษณะทางชีวเคมี

1) การตรวจสอบการติดสีแกรม (Garbutt, 1997)

หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด และเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 1 loop สเมียร์(smear)ให้เชื้อกระจาย นำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง แล้วย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น พร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์เพื่อชะสีส่วนเกินออกไป ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย saflanin O เป็นเวลา 1 วินาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบลักษณะรูปร่างเซลล์และการจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์

2) การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Garbutt, 1997)

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบ สเมียร์ลงบนสไลด์ แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3% ลงบนสไลด์ 1 หยด ถ้าพบโคโลนีเกิดฟองอากาศ แสดงว่า แบคทีเรียนั้นให้ผลบวก ส่วนโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบ

3) การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test)

หยดสารละลาย 1% tetramethyl- p-phenylenediamine dihydrochloride ลงบนกระดาษกรอง แล้วใช้แท่งแก้วเขี่ยเชื้อมาขีดลงบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ ถ้ากระดาษกรองบริเวณที่ขีดเชื้อลงไปเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินภายใน 10 วินาที แสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวก หากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแสดงว่าให้ผลลบ

4) การทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ เพื่อจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

การระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่สนใจ ทำโดยตรวจสอบลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีแกรม โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส การทดสอบออกซิเดส เบื้องต้น หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบชีวเคมีตามหลักการจำแนก

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เชื้อแบคทีเรียตามชนิดแกรมและรูปร่างของแบคทีเรียตามคู่มือการจำแนกชนิดแบคทีเรียของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology

3.3.12.3 การระบุชนิดของเชื้อรา (Identification)

นำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน สำหรับเชื้อรา ทำการระบุชนิดของเชื้อรา ซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเชื้อรา โดยทาการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยเทคนิค slide culture ควบคู่กับการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งชนิด Potato dextrose agar ในจานเพาะเชื้อ ทาการตรวจวัดส่วนประกอบของโครงสร้างเชื้อราด้วยไมโครมิเตอร์ และจำแนกชนิดโดยการเปรียบเทียบกับเชื้อรามาตรฐาน และคู่มือการจำแนกชนิดของเชื้อรา (Gilman, 1957; Hawksworth *et al*., 1995; Raper, 1965)

3.3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองในแต่ละการทดสอบมาวิเคราะห์ข้อมูลของแต่ละกรรมวิธีโดยใช้ การวิจารณ์เชิงพรรณนา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกแหล่งที่มาของตัวอย่างดิน

ผลการแยกแหล่งที่มาของตัวอย่างดินทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บมาจากแหล่งต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย เมื่อแบ่งดินตามภาคพบว่า ตัวอย่างดินจากภาคใต้ มีทั้งสิ้น 35 ตัวอย่าง, ตัวอย่างดินจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีทั้งสิ้น 27 ตัวอย่าง, ตัวอย่างดินจากภาคกลาง มีทั้งสิ้น 18 ตัวอย่างตัวอย่างดินจากภาคตะวันออก มีทั้งสิ้น 8 ตัวอย่าง, ตัวอย่างดินจากภาคเหนือ มีทั้งสิ้น 7 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินจากภาคตะวันตก มีทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง เมื่อแบ่งดินตามแหล่งที่มาพบว่า ตัวอย่างดินจากดินที่ไม่สามารถระบุแหล่งที่มา มีทั้งสิ้น 54 ตัวอย่าง, ตัวอย่างดินจากทุ่งนา มีทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง, ตัวอย่างดินจากริมแม่น้ำลำคลอง มีทั้งสิ้น 10 ตัวอย่าง, ตัวอย่างดินจากป่าชายเลน มีทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง, ตัวอย่างดินจากไร่-สวน มีทั้งสิ้น 8 ตัวอย่าง, ตัวอย่างดินจากภูเขา-ถ้ำ มีทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินจากข้างถังขยะ มีทั้งสิ้น 2 ตัวอย่าง ผลการแยกแหล่งที่มาของตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลอง ดังแสดงตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดินทั้งหมดที่นำมาใช้ในการทดลอง

ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1	ดินข้างฟิวเจอร์พาร์ค จ.ปทุมธานี
2	ดิน อ.ชุมพวง จ.นครราชสีมา
3	ดินในกองร้อย อ.เมือง จ.ตรัง
4	ดินทุ่งนา อ.เมือง จ.นครนายก
5	ดินคลอง4 ธัญบุรี จ.ปทุมธานี
6	ดินในสวน อ.เมือง จ.นครนายก
7	ดินป่าชายเลน อ.เมือง จ.ชลบุรี
8	ดิน อ.เมือง จ.ขอนแก่น
9	ดิน อ.บางแสน จ.ชลบุรี
10	ดิน อ.ชุมพวง จ.นครราชสีมา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง
11	ดินพื้นนา เขตหนองจอก กทม.
12	ดิน อ.พิมาย จ.นครราชสีมา
13	ดิน เขตหนองจอก กทม./1
14	ดินในสวน อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
15	ดินข้างกองขยะ อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
16	ดินริมคลอง จ.ราชบุรี
17	ดินเขตหนองจอก กทม./2
18	ดิน อ.เมือง จ.บึงกาฬ
19	ดิน คลองเตย กทม.
20	ดิน อ.เมือง จังหวัดเชียงใหม่
21	ดิน อ.เมือง จังหวัดสงขลา
22	ดินทุ่งนา อ.หนองบัวลำภู จังหวัดหนองบัวลำภู
23	ดินภูเขา ต.ทุ่งหลวง อ.ละแม จังหวัดชุมพร
24	ดิน ต.ทุ่งหลวง อ.ละแม จังหวัดชุมพร
25	ดิน อ.เมือง จังหวัดชุมพร
26	ดิน ม. 2 ต.ทุ่งหลวง อ.ละแม จ.ชุมพร
27	ดินถ้ำ ม. 2 ต.ทุ่งหลวง อ.ละแม จ.ชุมพร
28	ดิน อ.ท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี
29	ดินคันนา อ.ไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี
30	ดิน ต.บางพลา อ.เมืองขุนพัน จังหวัดสุราษฎร์ธานี
31	ดิน อ.นาโยง จังหวัดตรัง
32	ดิน ม.2 ต.คลองน้อย อ.เมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี
33	ดิน ป่าชายเลนน้ำกร่อย ต.บางพลา อ.ขุนพัน จังหวัดสุราษฎร์ธานี
34	ดิน อ.เมือง จังหวัดกาฬสินธุ์
35	ดิน ซอยวิเชียร อ.ลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี
36	ดิน อ.เมือง จังหวัดร้อยเอ็ด
37	ดิน เขตมีนบุรี กทม.
38	ดินภูเขา ม.17 ต.บ้านดวน อ.หลังสวน จังหวัดชุมพร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง
39	ดินป่าชายเลนหาดทรายทอง อ.ละแม จ.ชุมพร
40	ดินป่าชายเลนหาดค้อเขา อ.ละแม จ.ชุมพร
41	ดินป่าชายเลนน้ำกร่อย อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี
42	ดินป่าชายเลนหาดนาพญา อ.หลังสวน จ.ชุมพร
43	ดินป่าชายเลนน้ำกร่อย อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
44	ดินข้างถังขยะ อ.เมือง จ.ปทุมธานี
45	ดินทุ่งนา อ.ฮองฮี จ.กาฬสินธุ์
46	ดินหน้าหอพัก อ.เมือง จ.ปทุมธานี
47	ดิน อ.เมือง จ.ชัยภูมิ
48	ดิน อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ
49	ดินคันนา อ.เมือง จ.อุบลราชธานี
50	ดินใต้ถุนบ้าน อ.บุณฑริก จ.อุบลราชธานี
51	ดิน อ.เมืองพล จ.ขอนแก่น
52	ดิน อ.ชุมแพ จ.ขอนแก่น
53	ดินในนา อ.กุดชุม จ.ยโสธร
54	ดินริมแม่น้ำ อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
55	ดินที่นา อ.คูเมือง จ.บุรีรัมย์
56	ดินริมแม่น้ำ อ.ท่าตูม จ.สุรินทร์
57	ดินสวนยาง อ.ห้วยยอด จังหวัดตรัง
58	ดินลำธาร อ.ห้วยยอด จังหวัดตรัง
59	ดินห้วย อ.ห้วยยอด จังหวัดตรัง
60	ดินจอมปลวก อ.ห้วยยอด จังหวัดตรัง
61	ดินห้วย อ.ห้วยยอด จังหวัดตรัง
62	ดินนา อ.ห้วยยอด จังหวัดตรัง
63	ดินสวนปาล์ม อ.ห้วยยอด จังหวัดตรัง
64	ดินคลอง อ.ทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช
65	ดินสวนผัก อ.ร่อนพิบูรณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช
66	ดินสวนยาง อ.ร่อนพิบูรณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง
67	ดินที่นา อ.นาโยง จังหวัดตรัง
68	ดินแปลงผัก เขตมีนบุรี กทม.
69	ดินที่นา อ.บ้านหมี่ จังหวัดลพบุรี
70	ดินที่นา อ.หนองบัวลำภู จังหวัดหนองบัวลำภู
71	ดินสันเขา อ.หล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์
72	ดินยอดเขา อ.หล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์
73	ดินไร่อ้อย อ.นากลาง จังหวัดหนองบัวลำภู
74	ดินหน้าบ้าน อ.หนองบัว จังหวัดนครสรรค์
75	ดินกองเรือยุทธการ อ.สัตหีบ จังหวัดชลบุรี
76	ดินคลอง 2 อ.ธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี
77	ดิน อ.แม่ทา จังหวัดลำพูน
78	ดิน อ.เมือง จังหวัดนครสวรรค์
79	ดิน อ.บุ้งคล้า จ.บึงกาฬ
80	ดินในโรงอาหาร 01 มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
81	ดินบ้านโค่ย ต.หนองนาคำ อ.เมือง จังหวัดอุดรธานี
82	ดินดอยอินทนนท์ จังหวัดชียงใหม่
83	ดิน อ.องครักษ์ จังหวัดนครนายก
84	ดินเขตหนองจอก กทม.
85	ดิน อ.โนนสะอาด จังหวัดอุดรธานี
86	ดินเกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี
87	ดิน อ.เบตง จังหวัดยะลา
88	อ.เมือง จังหวัดปทุมธานี
89	ดิน อ.โนนสะอาด จังหวัดอุดรธานี
90	ดิน อ.โนนสะอาด จังหวัดอุดรธานี
91	ดินจังหวัดชลบุรี
92	ดินจังหวัดชลบุรี
93	ดิน อ.โนนสะอาด จังหวัดอุดรธานี
94	ดินคลอง 12 ลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลำดับ	สถานที่เก็บตัวอย่าง
95	ดินป่าชายเลน อ.ละแม ตะวันฉาย
96	ดิน ท่าฉาง จ.สุราษฎร์ธานี
97	ดิน หลังสวน บางมะพร้าว จังหวัดชุมพร
98	ดินแม่น้ำ จังหวัดยะลา
99	ดินสะเทินดาษ จังหวัดนครราชสีมา
100	ดินจังหวัดนครราชสีมา

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน

4.2 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยวิธี Cross streak method

จากการเพาะเลี้ยงและคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินทั้งสิ้น 100 ตัวอย่างข้างต้น เมื่อนำมาเพาะแยกชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต ได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 477 ไอโซเลท แบ่งเป็น เชื้อแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 425 ไอโซเลท และเชื้อราจำนวนทั้งสิ้น 52 ไอเลท เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวนทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ ประกอบด้วย Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 10 สายพันธุ์ Methicillin-sensitivity Staphylococcus aureus (MSSA) 1 สายพันธุ์ Extended spectrum beta lactamases producing *Escherichia. coli* (ESBL) 1 สายพันธุ์ *Samonella* Typhymurium, *Klebsiella pnuemoniae*, และยีสต์ก่อโรค 2 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* โดยวิธี Cross streak method พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 30 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 7 สายพันธุ์ขึ้นไป โดยไอโซเลทที่ 39 และ 418 มีฤทธิ์เป็น Broad spectrum สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ถึง 14 สายพันธุ์ และไอโซเลทส่วนใหญ่ ให้ผล inhibition zone กว้างที่สุดต่อเชื้อ MSSA (ATCC 25923) เมื่อนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาทำการศึกษาลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีแกรม โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ออกเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม คือ Gram positive bacilli with spore forming 12 ไอโซเลท, Gram positive coccobacilli 2 ไอโซเลท, Gram negative bacilli 11 ไอโซเลท, และ Gram variable 5 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.2 - 4.5

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming โดยวิธี Cross streak method จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Inhibition Zone of Antimicrobial Activity ที่ 48 ชั่วโมง (mean ± SD, mm)														
				MRSA4	MRSA5	MRSA6	MRSA14	MRSA18	MRSA28	MRSA29	MRSA31	MRSA34	MRSA36	*ESBL(E.coli)*	*S.*Typhimurium	*K.pneumoniae*	*C.albicans*	*C.neoforman*	MSSA (ATCC 25923)
1	18	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	-	24±2.24	25±1.41	-	13±2.24	11±2.24	7±2.24	-	6±2.24	-	-	7±2.24	15±3.16	-	27±2.24
2	23	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	15±2.24	-	16±2.24	17±1.41	10±2.24	10±2.24	10±2.24	3±1.41	-	15±3.16	8±2.24	21±3.16	11±2.24	22±1.41	-	23±1.41
3	24	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	10±2.24	-	-	-	8±2.24	3±1.41	-	-	-	11±2.24	-	7±2.24	8±2.24	20±2.24	-	22±1.41
4	39	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	20±2.24	18±2.24	22±1.41	25±1.41	13±3.16	20±2.24	20±2.24	10±2.24	15±3.16	23±1.41	7±2.24	15±3.16	12±2.24	-	-	27±2.24
5	75	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	10±2.24	5±2.24	5±2.24	9±2.24	10±2.24	9±2.24	10±2.24	10±2.24	-	-	-	-	-	-	-	15±3.16
6	386	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	-	8±2.24	-	9±2.24	-	11±2.24	-	-	8±2.24	-	-	-	11±2.24	-	13±2.24
7	405	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	-	7±2.24	6±2.24	9±2.24	-	8±2.24	10±2.24	-	10±2.24	2±1.00	7±2.24	5±2.24	4±2.24	5±2.24	9±2.24

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming โดยวิธี Cross streak method จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) (ต่อ)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Inhibition Zone of Antimicrobial Activity ที่ 48 ชั่วโมง (mean ± SD, mm)														
				MRSA4	MRSA5	MRSA6	MRSA14	MRSA18	MRSA28	MRSA29	MRSA31	MRSA34	MRSA36	*ESBL(E.coli)*	*S.Typhimurium*	*K.pneumoniae*	*C.albicans*	*C.neoforman*	MSSA (ATCC 25923)
8	418	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	18±2.24	15±3.16	10±2.24	20±2.24	15±3.16	20±2.24	20±2.24	15±3.16	14±2.24	3±2.24	10±2.24	14±2.24	-	3±2.24	13±3.16
9	421	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	-	11±2.24	15±3.16	12±2.24	12± 2.24	11±2.24	10±2.24	-	-	-	6±2.24	10±2.24	-	-	-
10	423	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	16±2.24	15±3.16	-	10±2.24	11±2.24	6±2.24	11±2.24	12±2.24	10±2.24	-	5±2.24	-	25±1.41	-	12±2.24
11	424	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	11±2.24	14±2.24	-	15±3.16	17±1.41	10±2.24	10±2.24	11±2.24	10±2.24	-	-	-	-	-	-
12	428	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	17±1.41	14±2.24	15±3.16	10± 2.24	-	5±2.24	15±3.16	-	-	-	-	-	-	-	-	15±3.16

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive coccobacilli โดยวิธี Cross streak method จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Inhibition Zone of Antimicrobial Activity ที่ 48 ชั่วโมง (mean ± SD, mm)														
				MRSA4	MRSA5	MRSA6	MRSA14	MRSA18	MRSA28	MRSA29	MRSA31	MRSA34	MRSA36	*ESBL(E.coli)*	*S.Typhimurium*	*K.pneumoniae*	*C.albicans*	*C.neoforman*	MSSA (ATCC 25923)
1	307	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus* spp.	6±1.00	-	-	5±0.00	-	7±1.41	5.5±2.12	-	-	9±1.41	4.5±0.71	22±7.78	7.5±0.71	-	-	24±6.36
2	401	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus* spp.	-	9±1.41	8.5±2.12	6.5±2.12	-	-	-	-	-	-	-	6.5±2.12	9.5±3.45	-	-	20±2.38

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli โดยวิธี Cross streak method จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

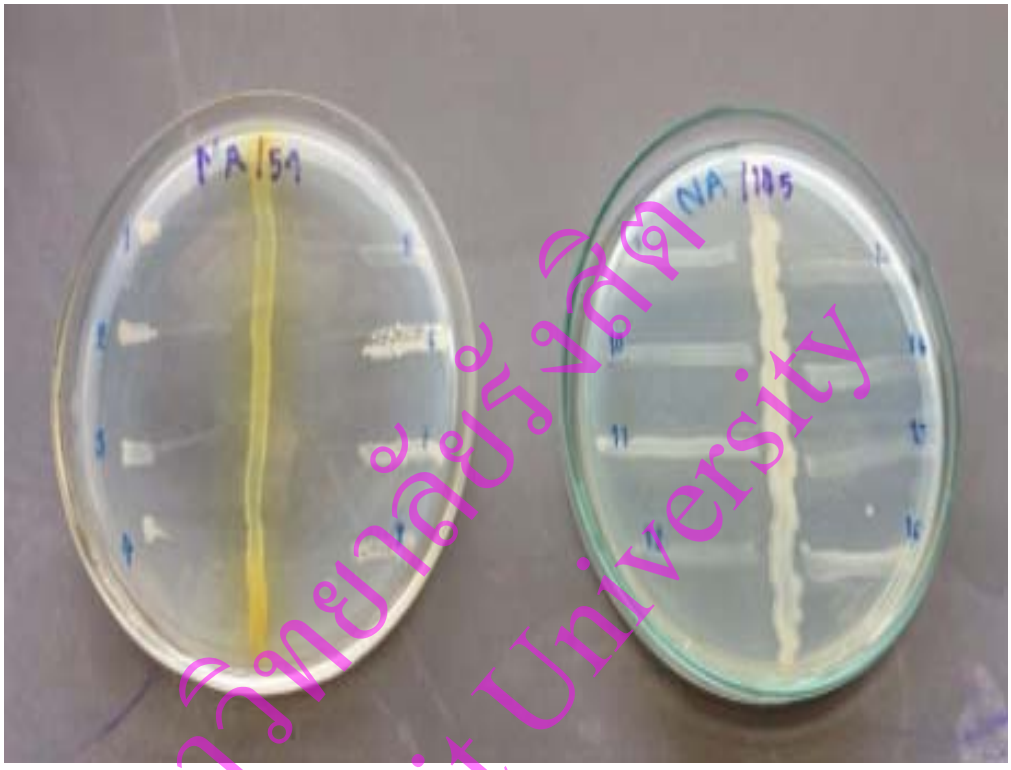
ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Inhibition Zone of Antimicrobial Activity ที่ 48 ชั่วโมง (mean ± SD, mm)														
				MRSA4	MRSA5	MRSA6	MRSA14	MRSA18	MRSA28	MRSA29	MRSA31	MRSA34	MRSA36	*ESBL(E.coli)*	*S.Typhimurium*	*K.pneumoniae*	*C.albicans*	*C.neoforman*	MSSA (ATCC 25923)
1	10	Gram negative bacilli	*Burkholderia spp.*	9±1.41	-	11.5±2.12	11.5±0.71	5±1.41	11±1.41	1.5±0.71	-	9.5±0.71	2.5±0.71	-	9±1.41	-	-	-	14±1.41
2	17	Gram negative bacilli	*Burkholderia spp.*	11±1.41	11.5±0.71	10±1.41	15.5±0.71	17±1.41	14.5±1.41	14±1.41	14±1.41	15±0.71	19±1.41	4.5±0.71	4.5±0.71	-	-	-	21±1.41
3	38	Gram negative bacilli	*Pseudomonas spp.*	10.5±0.71	10±1.41	13.5±2.12	15±1.41	15.5±0.71	15±0.71	13.5±0.71	9±0.71	19±1.41	7.5±0.71	5.5±0.71	-	-	-	-	21.5±0.71
4	69	Gram negative bacilli	*Pseudomonas spp.*	7.50±0.71	5±1.41	6±1.41	-	9±1.41	4.5±1.41	9±1.41	8.5±1.41	6±1.41	-	5±1.41	-	-	-	-	12.5±0.71
5	70	Gram negative bacilli	*Burkholderia spp.*	9±1.41	9.5±0.71	14±1.41	18±1.41	9.5±0.71	14±0.71	7±1.41	12±1.41	12±1.41	4.5±0.71	-	-	-	-	-	19±1.41
6	191	Gram negative bacilli	*Burkholderia spp.*	11±1.41	10.5±2.12	10.5±0.71	15.5±0.71	17±1.41	14.5±1.41	14±1.41	14.5±1.41	14±1.41	19±1.41	4±1.41	4±1.41	-	-	-	21±1.41
7	225	Gram negative bacilli	*Pseudomonas* spp.	10.5±0.71	9.5±2.12	13.5±2.12	15±1.41	15±1.41	14±1.41	13±1.41	9.5±1.41	19±1.41	7±1.41	5.5±0.71	4±1.41	-	-	-	20.5±2.12
8	277	Gram negative bacilli	*Pseudomonas* spp.	7±1.41	5.5±0.71	6±1.41	-	9.5±0.71	4±0.71	9.5±0.71	8.5±0.71	6.5±0.71	-	5±1.41	-	-	-	-	12±1.41
9	278	Gram negative bacilli	*Burkholderia* spp.	9.5±0.71	9±1.41	14±1.41	17.5±2.12	8.5±2.12	14.5±2.12	7±1.41	12.5±1.41	12±1.41	4±1.41	-	-	-	-	-	19±1.41
10	303	Gram negative bacilli	*Burkholderia* spp.	8.5±2.12	-	12±1.41	11±1.41	5.5±0.71	11±0.71	1.5±0.71	-	9±1.41	2.5±0.71	-	-	-	-	-	14.5±0.71
11	367	Gram negative bacilli	*Pseudomonas* spp.	-	6±1.41	-	-	-	-	9.5±0.71	12±0.71	-	16±1.41	-	9±1.41	-	6±1.41	-	14.5±2.12

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram variable โดยวิธี Cross streak method จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Inhibition Zone of Antimicrobial Activity ที่ 48 ชั่วโมง (mean ± SD, mm)														
				MRSA4	MRSA5	MRSA6	MRSA14	MRSA18	MRSA28	MRSA29	MRSA31	MRSA34	MRSA36	*ESBL(E.coli)*	*S.Typhimurium*	*K.pneumoniae*	*C.albicans*	*C.neoforman*	MSSA (ATCC 25923)
1	374	Gram variable	*Pimelobacter spp.*	10±2.24	11±2.24	3±1.00	11±2.24	13±3.16	5±1.41	9±2.24	10±2.24	12±2.24	11±2.24	-	7±1.41	9±2.24	-	-	9±2.24
2	390	Gram variable	Cellulomonas spp.	7±1.41	3±1.00	-	-	9±2.24	10±2.24	8±2.24	-	-	11±2.24	-	5±1.41	5±1.41	14±2.24	-	10±2.24
3	391	Gram variable	Pimelobacter spp.	-	7±1.41	10±2.24	-	15±3.16	10±2.24	5±1.41	-	-	5±1.41	-	-	10±2.24	10±2.24	-	8±2.24
4	397	Gram variable	Cellulomonas spp.	-	-	-	-	10±2.24	8±2.24	5±1.41	-	-	12±2.24	3±1.00	10±2.24	-	-	6±2.24	10±2.24
5	398	Gram variable	Oerskovia spp.	-	7±1.41	17±1.41	-	18±2.24	-	15±3.16	12±2.24	-	12±2.24	5±1.41	-	15±3.16	10±2.24	5±1.41	12±2.24

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปภาพที่ 4.1 แสดงผล inhibition zone ที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยเทคนิคCross streak

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.3 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยวิธี Agar diffusion method

เมื่อนำแบคทีเรียมีฤทธิ์ที่น่าสนใจทั้งสิ้น 30 ไอโซเลท จากทำการทดสอบ Cross streak มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มเติมโดยวิธี Agar diffusion method และทำการวัด inhibition zone ที่ 48 ชั่วโมง พบว่ามี 10 ไอโซเลท ที่ให้ inhibition zone ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิด resistant type ที่นำมาทดสอบทั้งสิ้น 15 สายพันธุ์ ขนาดของ inhibition zone ที่วัดได้อยู่ในช่วง 6-21 mm ไอโซเลทที่ให้ Inhibition zone กว้างที่สุดคือ ไอโซเลทที่ 23 ขนาดของ Inhibition zone เท่ากับ 20.6±0.72 (24 ชั่วโมง) 21±3.16 mm (48 ชั่วโมง) ต่อเชื้อทดสอบ *Candida albicans* แบคทีเรียที่เป็น broad spectrum คือ ไอโซเลทที่ 39 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ถึง 4 สายพันธุ์ คือ MRSA28, MRSA29, MRSA31 และMRSA34 สามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ออกเป็นกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ Gram positive bacilli with spore forming 4 ไอโซเลท, Gram positive coccobacilli 1 ไอโซเลท, Gram negative bacilli 5 ไอโซเลท, ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเทคนิค Agar Diffusion แสดงในตารางที่ 4.6 และ 4.8

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming โดยวิธี Agar diffusion จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

No.	Isolate	Gram's stain	Identification	Inhibition Zone of Agar diffusion ที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง (mean ± SD, mm)											
				MRSA28		MRSA29		MRSA31		MRSA34		*C.albicans*		*C.neoformans*	
				24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.
1	23	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	20.6±0.72	21±3.16	-	-
2	39	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	7±2.24	8±2.24	6.5±1.12	6.5±1.12	6.5±1.12	7±2.24	8±2.24	8.5±0.50	-	-	-	-
3	405	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11±2.24	11.5±1.12
4	418	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus* spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.5±0.71	8±2.24

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive coccobacilli โดยวิธี Agar Diffusionจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

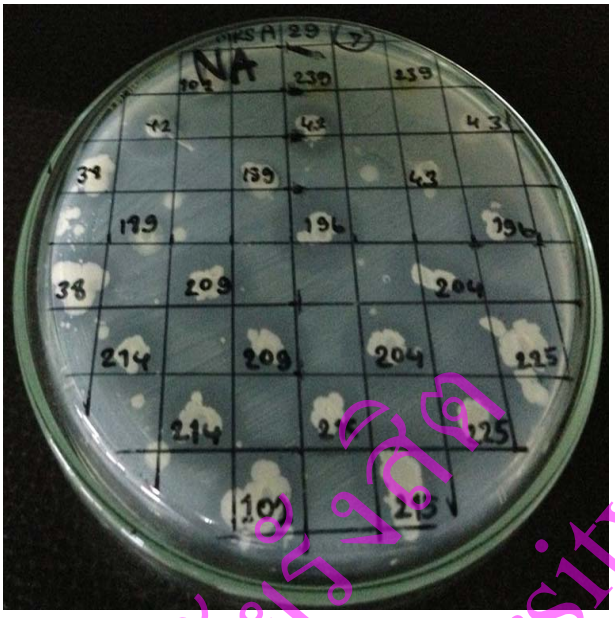
No.	Isolate	Gram's stain	Identification	Inhibition Zone of Agar diffusion ที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง (mean ± SD, mm)							
				MRSA28		MRSA29		MRSA36		*S.*Typhimurium	
				24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.
1	307	Gram positive coccobacilli	Rhodococcus spp.	-	-	-	-	-	-	9±0.71	10±0.71

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli โดยวิธี Agar Diffusion จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

No.	Isolate	Gram's stain	Identification	Inhibition Zone of Agar diffusion ที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง (mean ± SD, mm)							
				MRSA28		MRSA29		MRSA36		*S.*Typhimurium	
				24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.	24ชม.	48ชม.
1	191	Gram negative bacilli	*Burkholderia* spp.	-	-	-	-	17±0.71	18±0.71	-	-
2	225	Gram negative bacilli	*Pseudomonas* spp.	-	-	11±2.12	13±2.12	-	-	-	-
3	277	Gram negative bacilli	*Pseudomonas* spp.	-	-	10±0.00	10±0.00	-	-	-	-
4	278	Gram positive bacilli	*Burkhoderia* spp.	-	-	11±0.00	11±0.00	-	-	-	-
5	303	Gram negative bacilli	*Pseudomonas* spp.	14±1.41	14±1.41	-	-	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปภาพที่ 4.2 แสดงผล inhibition zone ที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยเทคนิค Agar Diffusion

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

4.4 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยวิธี modified microdilution

เมื่อนำแบคทีเรียมีฤทธิ์ที่น่าสนใจทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท จากทำการทดสอบ Agar Diffusion มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เพิ่มเติมโดยวิธี modified microdilution พบว่ามีแบคทีเรียทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท ที่ให้ผล Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ที่น่าสนใจ คือ ไอโซเลทที่ 23, 39, 277, และ 303 ไอโซเลทที่ให้ผล MIC ดีที่สุดคือไอโซเลทที่ 303 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA28 ที่ dilution เท่ากับ 1:512 และ ไอโซเลทที่ 39 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA28 และ MRSA34 ที่ dilution เท่ากับ 1:32 และ 1:4 ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน โดยวิธี modified microdilution จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน

No.	Isolate	Identification	Tested microorganisms															
			MRSA28		MRSA29		MRSA31		MRSA34		MRSA36		*S.*Typhimurium		*C.albicans*		*C.neoformans*	
			MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MFC dilution	MIC dilution	MFC dilution
1	23	*Bacillus* spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:4	G	-	-
2	39	*Bacillus* spp.	1:32	G	G	ND	G	ND	1:4	G	-	-	-	-	-	-	-	-
3	191	*Burkholderia* spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	G	ND	-	-	-	-	-	-
4	225	*Pseudomonas* spp.	-	-	G	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	277	*Pseudomonas* spp.	-	-	undiluted	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	278	*Pseudomonas* spp.	-	-	G	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	303	*Burkholderia* spp.	512	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	307	*Rhodococcus sp.*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	ND	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming โดยวิธี modified microdilution จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน (ต่อ)

No.	Isolate	Identification	Tested microorganisms															
			MRSA28		MRSA29		MRSA31		MRSA34		MRSA36		*S.*Typhimurium		*C.albicans*		*C.neoformans*	
			MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MBC dilution	MIC dilution	MFC dilution	MIC dilution	MFC dilution
9	405	*Bacillus* spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	ND
10	418	*Bacillus* spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	ND
control	Gentamicin (µg/ml)		62.50 (µg/ml)	62.50 (µg/ml)	1.95 (µg/ml)	1.95 (µg/ml)	1.95 (µg/ml)	1.95 (µg/ml)	1.95 (µg/ml)	1.95 (µg/ml)	62.50 (µg/ml)	62.50 (µg/ml)	62.50 (µg/ml)	62.50 (µg/ml)	ND	ND	ND	ND
control	Ketonazone (µg/ml)		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.98 (µg/ml)	0.98 (µg/ml)	0.98 (µg/ml)	0.98 (µg/ml)

***หมายเหตุ G คือ Growth**

ND คือ Not Done

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์

จากการเพาะเลี้ยงและคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินทั้งสิ้น 100 ตัวอย่างข้างต้น เมื่อนำมาเพาะแยกชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต ได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 477 ไอโซเลท แบ่งเป็น เชื้อแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 425 ไอโซเลท และเชื้อราจำนวนทั้งสิ้น 52 ไอเลท นำมาการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ทั้งสิ้น 8 ชนิดคือ เอนไซม์ที่สามารถย่อย Chitin, Chitosan, Starch, Cellulose,Skim milk, Gelatin, Tween 20, และTween 80 โดยวิธี direct spot agar พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีฤทธิ์ที่น่าสนใจในส่วนของการทดสอบฤทธิ์การสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ทั้งสิ้น 76 ไอโซเลท เมื่อทำการศึกษาลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีแกรม โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกชนิดของจุลชีพออกเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ Gram positive bacilli with spore forming 35 ไอโซเลท, Gram positive coccobacilli 10 ไอโซเลท , Gram negative bacilli 18 ไอโซเลท, Gram variable 11 ไอโซเลท, และ fungi ในกลุ่ม septate hyphae 2 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4.10 -4.14

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Clear Zone of Interested Biological Enzyme at 48 hr. (mm.)							
				Chitin	Chitosan	Starch	Cellulose	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 80
1	196	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	8±2.24	11±2.24	5±1.41	17±1.41	17±1.41	-	-
2	290	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	10±2.24	26±2.24	14±2.24	35±1.41	40±2.24	-	8±2.24
3	294	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	8±2.24	12±2.24	14±2.24	45±1.00	56±1.41	-	-
4	299	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	5±1.41	24±2.24	9±2.24	-	48±2.24	6±2.24	9±2.24
5	303	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	19±3.16	22±1.41	-	46±2.24	8±2.24	15±3.16
6	309	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	6±2.24	23±1.41	14±2.24	40±2.24	38±2.24	5±1.41	5±1.41
7	315	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	21±3.16	6±2.24	-	30±2.24	7±1.41	9±2.24
8	318	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	-	10±2.24	68±2.24	35±1.41	-	10±2.24
9	325	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	11±2.24	25±1.41	18±2.24	43±1.00			
10	326	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	20±2.24	11±2.24	-	39±3.16	7±1.41	6±2.24
11	329	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	10±2.24	18±2.24	17±1.41	-	42±2.24	5±1.41	7±1.41

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) (ต่อ)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Clear Zone of Interested Biological Enzyme at 48 hr. (mm.)							
				Chitin	Chitosan	Starch	Cellulose	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 80
12	336	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	9±2.24	11±2.24	-	-	43±1.41	-	14±2.24
13	337	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	14±2.24	-	-	24±2.24	-	15±3.16
14	340	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	8±2.24	12±2.24	11±2.24	-	24±2.24	-	-
15	341	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	-	-	-	-	-	10±2.24
16	346	Gram positive bacilli with spore forming	Bacillus spp.	-	-	8±2.24	-	-	-	-	-
17	354	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	12±2.24	-	-	11±2.24	-	-
18	368	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	-	-	15±3.16	70±3.16	-	-
19	372	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	-	-	20±2.24	-	36±2.24	-
20	373	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	-	-	25±1.41	40±2.24	18±2.24	-
21	376	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	-	10±2.24	-	-	-	-
22	383	gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	-	10±2.24	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) (ต่อ)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Clear Zone of Interested Biological Enzyme at 48 hr. (mm.)							
				Chitin	Chitosan	Starch	Cellulose	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 80
23	384	gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	-	3±1.41	17±1.41	40±2.24	-	-
24	388	gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	6±2.24	10±2.24	-	37±1.41	-	-
25	394	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	16±2.24	-	33±3.16	27±1.41	-	-
26	395	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	12±2.24	8±2.24	45±1.00	25±1.41	-	-
27	401	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	20±2.24	19±2.24	-	-	-	-
28	404	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	8±2.24	7±2.24	-	34±2.24	-	-
29	405	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	9±2.24	10±2.24	-	33±3.16	-	-
30	410	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	-	6±2.24	13±3.16	26±2.24	-	-
31	411	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus spp.*	-	-	12±2.24	7±2.24	-	27±1.41	-	-
32	412	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	-	-	-	29±1.41	43±3.16	18±2.24
33	418	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	12±2.24	18±2.24	26±2.24	-	-	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore formingจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) (ต่อ)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Clear Zone of Interested Biological Enzyme at 48 hr. (mm.)							
				Chitin	Chitosan	Starch	Cellulose	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 80
34	421	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	-	-	25±1.41	-	-	-
35	423	Gram positive bacilli with spore forming	*Bacillus sp.*	-	-	18±2.24	-	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.11 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive coccobacilli จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Clear Zone of Interested Biological Enzyme at 48 hr. (mm.)							
				Chitin	Chitosan	Starch	Cellulose	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 80
1	162	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	-	7±0.00	9±0.00	7±1.41	21.5±0.71	17.5±2.12	-	-
2	295	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	-	8±1.41	17±1.41	18±0.00	49±1.41	32±1.41	7±0.00	7±1.41
3	297	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	-	11±1.41	15.5±0.71	28±1.41	43.5±0.71	40±1.41	11±1.41	5.5±0.71
4	304	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	-	10.5±0.71	10.5±0.71	18.5±0.71	33±1.41	37.5±2.12	6.5±2.12	10.5±0.71
5	306	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	-	-	16±1.41	18.5±0.71	63.5±0.71	45.5±0.71	10±0.00	13±0.00
6	307	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	-	-	16.5±0.71	12±0.00	71±0.71	34±0.71	10±0.71	17±0.71
7	319	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	11.5±2.12	-	22.5±0.71	13±1.41	78.5±0.71	46±1.41	8.5±0.71	20.5±0.71
8	323	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	-	-	17.5±0.71	16.5±0.71	-	37±1.41	7.5±0.71	6±0.00
9	331	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	-	14.5±0.71	28.5±0.71	17±1.41	43.5±0.71	-	8±0.00	11.5±2.12
10	333	Gram positive coccobacilli	*Rhodococcus sp.*	-	-	40±0.00	24±1.41	33±1.41	-	-	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli จาก 3 การทดลองที่เหมือนกันค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Clear Zone of Interested Biological Enzyme at 48 hr. (mm.)							
				Chitin	Chitosan	Starch	Cellulose	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 80
1	226	Gram negative bacilli	*Burkhoderia sp.*	-	10.5±0.71	9±1.41	20±0.00	27.5±3.54	-	26.5±2.12	-
2	293	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	31±1.41	19±1.41	21±1.41	52.5±3.54	33.5±2.12	-	-
3	310	Gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	13±1.41	25.5±0.71	15.5±0.71	74±1.41	36.5±2.12	-	9.5±0.71
4	353	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	9±0.00	-	-	19±1.41	-	-
5	356	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	24±5.66	37.5±3.54	15.5±0.71	-
6	357	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	26.5±2.12	29±1.41	11±1.41	-
7	360	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	27±2.83	36.5±4.95	-	-
8	361	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	25±1.41	37±4.24	-	-
9	362	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	25.5±0.71	35±1.41	-	-
10	364	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	24.5±2.12	45±7.07	-	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) (ต่อ)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Clear Zone of Interested Biological Enzyme at 48 hr. (mm.)							
				Chitin	Chitosan	Starch	Cellulose	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 80
11	366	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	28.5±0.71	51±1.41	16±1.41	-
12	367	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	27±1.41	60.5±0.71	-	-
13	369	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	28.5±2.12	70±0.00	-	-
14	378	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	11±1.41	60±0.00	-	-	-
15	385	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	2.5±0.71	-	15.5±0.71	-	-
16	393	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	-	27.5±0.71	-	-
17	413	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	6±1.41	-	25±0.00	-	-
18	420	gram negative bacilli	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	-	32±1.41	-	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 4.13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram variable bacilli จาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

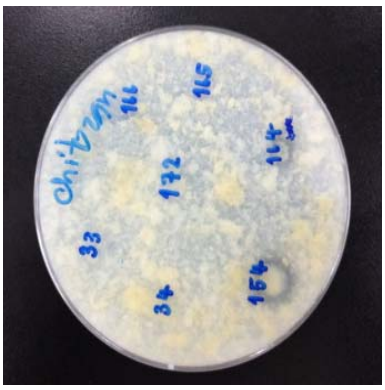
ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Clear Zone of Interested Biological Enzyme at 48 hr. (mm.)							
				Chitin	Chitosan	Starch	Cellulose	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 80
1	374	Gram variable	*Pimelobacter spp.*	-	-	17±1.41	-	46±2.24	-	-	-
2	379	gram variable	*Oerskovia spp.*	-	-	-	3±1.00	63±4.00	-	-	-
3	387	gram variable	*Pimelobacter spp.*	-	-	18±2.24	-	33±1.41	30±2.24	-	-
4	390	gram variable	*Cellulomonas spp.*	-	-	19±2.24	11±2.24	37±1.41	37±1.41	-	-
5	391	Gram variable	*Pimelobacter spp.*	-	-	11±2.24	13±3.16	28±2.24	32±2.24	-	-
6	392	Gram variable	*Pimelobacter spp.*	-	-	-	-	27±3.16	36±2.24	-	-
7	399	Gram variable	*Cellulomonas spp.*	-	-	24±2.24	11±2.24	-	-	-	-
8	400	Gram variable	*Oerskovia spp.*	-	-	17±1.41	18±2.24	-	-	-	-
9	406	Gram variable	*Cellulomonas spp.*	-	-	7±1.41	9±2.24	-	30±2.24	-	-
10	415	Gram variable	*Oerskovias spp.*	-	-	19±2.24	16±2.24	25±2.24	45±1.41	-	-
11	416	Gram variable	*Cellulomonas spp.*	-	-	-	-	-	31±1.41	-	-

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

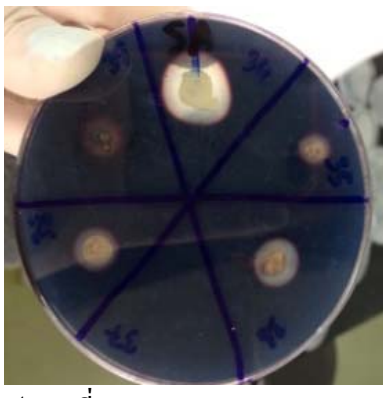
ตารางที่ 4.14 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆ ของเชื้อราจาก 3 การทดลองที่เหมือนกัน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

ลำดับ	ID Number	Gram's stain	Identification	Clear Zone of Interested Biological Enzyme at 48 hr. (mm.)							
				Chitin	Chitosan	Starch	Cellulose	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 80
1	40	septate hyphae	*Penicillium sp.*	-	11±1.41	21.5±0.71	20±1.41	70±0.00	39±1.41	8±1.41	10.5±1.41
2	43	septate hyphae	*Penicillium sp.*	-	12±1.00	9±1.41	7.5±0.71	78±1.41	34.5±2.12	13±0.00	12±1.00

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปภาพที่ 4.3 Clear zone from chitozan agar

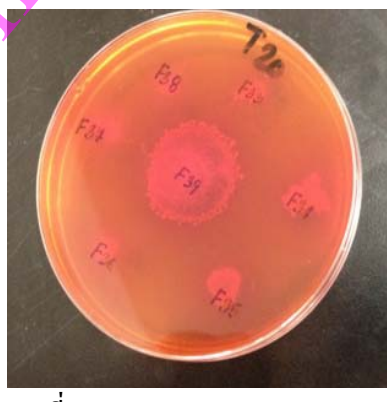


รูปภาพที่ 4.4 Clear zone from starch agar

รูปภาพที่ 4.5 Clear zone from cellulose agar

รูปภาพที่ 4.6 Clear zone from skim milk agar

รูปภาพที่ 4.7 Clear zone from gelatin agar



ภาพที่ 4.8 Clear zone from tween 20 agar

รูปภาพที่ 4.9 Clear zone from tween 80 agar

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

ในปัจจุบันงานด้านความหลากหลายทางชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในการค้นหาจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมาก จุลินทรีย์ไม่ได้อาศัยอยู่แต่ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติเท่านั้น มีจุลินทรีย์อีกจำนวนมากที่อาศัยหรือเจริญอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่น ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ทั้งภายในและภายนอกร่างกายของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ด้วยกันเอง เช่น fungi, protists ชนิดต่างๆ จุลินทรีย์ในพืช มี endophytic bacteria, endophytic fungi จุลินทรีย์ในแมลงมีเชื้อรา แบคทีเรีย และ protozoa, บนผิวหนังและในตลอดทางเดินอาหารของสัตว์ทุกชนิด รวมทั้งมนุษย์ ล้วนมีจุลินทรีย์เข้าไปอาศัยร่วมอยู่ด้วย ในความสัมพันธ์รูปแบบต่างๆ (สุเทพ , 2556) ทั้งนี้นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามค้นคว้า และทดลองเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะนำไปประยุกต์ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นในด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม เภสัชกรรมและด้านการแพทย์ โดยในปัจจุบันมีเชื้อโรคต่างๆ เกิดขึ้นมากมายซึ่งเกิดจากการปรับตัวจากเชื้อก่อโรคเดิมที่ได้เพิ่มความรุนแรงขึ้นรวมทั้งเชื้อชนิดใหม่ ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคเหล่านี้

ดินเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่รวมจุลินทรีย์ที่น่าสนใจและเหมาะสำหรับการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และเอนไซม์ชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติจำเพาะต่อการย่อยสลายสารประกอบต่างๆ ในดินหนึ่งกรัมอาจพบมีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อยู่หลายพันชนิด จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน พบว่ามีแบคทีเรีย และ เชื้อราที่มีศักยภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น เอนไซม์ สารต้านจุลินทรีย์ วิตามิน เป็นต้น และสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การสร้างสารต้านจุลินทรีย์ และการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาในเชิงลึกทั้งทางด้านชีวภาพและเคมีซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมและการเกษตรต่อไป และยังได้ทราบถึงความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศในดินแบบต่างๆของประเทศไทยอีกด้วย

ปัญหาเรื่องเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะจัดเป็นปัญหาเร่งด่วนที่สำคัญ ถึงขนาดที่ทางองค์การอนามัยโลกได้กำหนดเป็นคำขวัญในวันสุขภาพโลก ประจำปี 2554 ว่า“Antimicrobial Resistance: No Action Today, No CureTomorrow” เพื่อเป็นการกระตุ้นเตือนให้นานาชาติหันมาให้ความสนใจและมีมาตรการในการป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยาก่อนที่สถานการณ์จะรุนแรงไปกว่านี้ เพราะเชื้อดื้อยาถือว่าเป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ที่มีอันตรายรุนแรง ถึงขั้นทำให้เสียชีวิต โดยทำให้เราย้อนกลับไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เหมือนในอดีตในยุคก่อนปี 80 ที่ไม่มียาปฏิชีวนะหรือยาที่มีประสิทธิภาพใดๆ ในการรักษาโรค ที่สำคัญกว่านั้น ยาที่จะนำมารักษาโรคที่เกิดจากเชื้อดื้อยาอาจมีราคาแพงมากขึ้น จากความปัญหาดังกล่าว ทำให้ความต้องการค้นหาสารชีวภาพที่มีต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์มีมากขึ้น เพื่อใช้ทดแทนยาตัวเดิมที่จะเริ่มใช้ไม่ได้ในอนาคต มีรายงานว่าจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เช่น *B. thuringiensis subsp. entomocidus, B. licheniformis* และ *B. cereus* สามารถผลิตชีวสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวก เช่น *S. aureus, S. epidermidis, S. intermedius, Paenibacillus larvae, B. subtilis, B. cereus, C. botulinum, L. innocua, L. ivanovil, L.monocytogenes, Micrococcus luteus* และ *Leuconostoc mesenteroids* แต่ไม่สามารถยับยังการเจริญของเชื้อ *E. coli, P. putida, S. enteritids, Bordetella bronchiseptica, Klebsiella pneumoniae* และ *S. Flexiner* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีส่วนของผนังชั้นนอกห่อหุ้ม (outer membrane) ส่วนของเปปติโดไกลแคนของผนังเซลล์ซึ่งจะทำหน้าที่ป้องกันสารเคมีหรือ เอนไซม์ภายนอกไม่ให้ทำลายเซลล์ (Cherit *et al*., 2003; Cladera *et al*., 2004 and Oscariz *et al*., 1999) แต่ชีวสารที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกสามารถแทรกผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรีย แกรมบวกได้ง่ายกว่าแกรมลบ จึงยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Barefoot and Klaenhammer, 1983) จึงทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะค้นหาจุลินทรีย์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวจากตัวอย่างดินในแหล่งต่างๆ

จากการทดลองนี้ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บมาจากแหล่งต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ประกอบด้วย ตัวอย่างดินจากภาคใต้, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ภาคกลาง, ภาคตะวันออก, ภาคเหนือ, และภาคตะวันตก เมื่อแบ่งดินตามแหล่งที่มาพบว่าเป็นดินที่มาจากหลากหลายที่มา เช่น จากทุ่งนา, ริมแม่น้ำลำคลอง, ป่าชายเลน, ไร่สวน, ภูเขา-ถ้ำ, และข้างถังขยะ เป็นต้น เมื่อนำมาแยกชนิดของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต ได้แบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 425 ไอโซเลท และเชื้อรา จำนวนทั้งสิ้น 52 ไอโซเลท จากนั้นนำโคโลนีมาย้อมสีแกรม หรือสี lacctophenol cotton blue เพื่อทำการศึกษาเบื้องต้นในการแยกลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ จะสามารถจัดจำแนกชนิดของจุลชีพออกเป็นกลุ่มๆ ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยต้องการศึกษาจุลินทรีย์ 5 กลุ่ม คือ Gram positive bacilli with spore forming, Gram positive coccobacilli, Gram negative bacilli Gram variable และfungi เมื่อสามารถจัดกลุ่มจุลินทรีย์ได้แล้ว จากนั้นทำการแยกเชื้อทั้งหมดให้เป็น pure isolate colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เพื่อทำเป็น master plate และใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบก่อโรคในครั้งนี้ใช้เชื้อทดสอบจำนวน 16 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็น เป็นแบคทีเรียที่กลุ่มดื้อยา ได้แก่ methicillin resistant *staphylococcus aureaus* (MRSA) 10 สายพันธุ์, ESBL (*Escherichia coli*), *Salmonella* Typhimurium, *Klebsiella pneumonia*, Methicillin sensitive *staphylococcus aureaus* (MSSA) สายพันธุ์ ATCC 25923 และเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* นำมาทดสอบร่วมกับจุลินทรีย์ที่แยกได้ 477 ไอโซเลท เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบก่อโรคโดยใช้เทคนิคต่างๆทั้งสิ้น 3 เทคนิค คือ cross streak method, และ agar diffusion method เพื่อคัดกรองฤทธิ์ในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคเบื้องต้นของจุลินทรีย์ที่แยกทั้งหมด และวิธี modified microdilution เพื่อหาปริมาณและรูปแบบในการต้านเชื้อก่อโรคของสารยับยั้งเชื้อก่อโรคที่จุลินทรีย์ดังกล่าวสร้างขึ้น

ผลการทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินในการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยเทคนิค cross streak method ด้วยการสังเกตและวัดค่า inhibition zone ที่เกิดขึ้น และใช้หลักในการเลือกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจ คือ ต้องเป็นไอโซเลทที่มีฤทธิ์เป็น broad spectrum ต่อเชื้อทดสอบ 7 สายพันธุ์ขึ้นไป หรือเป็นไอโซเลท ที่ให้ผล Inhibition zone กว้างที่สุดต่อเชื้อทดสอบ พบว่ามีจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์น่าสนใจจำนวนทั้งสิ้น 30 ไอโซเลท คิดเป็น 6.28% ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากที่สุดคือ ไอโซเลตที่ 39 และ 418 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากถึง 14 สายพันธุ์ และรองลงมาคือ ไอโซเลตที่ 23 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ถึง 13 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2 และ 4.5) เมื่อทำการศึกษาลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีแกรม โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ออกได้เป็นกลุ่ม 4 กลุ่ม คือ Gram positive bacilli with spore forming 12 ไอโซเลท, Gram positive coccobacilli 2 ไอโซเลท, Gram negative bacilli 11 ไอโซเลท, และ Gram variable 5 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าคืองานวิจัยของภัทริดาและคณะ (2554) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *B. subtilis* ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ABRCA1 และ *Streptococcus agalactiae* ABRCS1 ในปลานิล โดยวิธี cross streak method พบว่า *B. licheniformis* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. hydrophila* ABRCA1 ส่วนเชื้อ *B. licheniformis, B. pumilus* และ *B. subtilis* สามารถเจริญครอบครองโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* ABRCS1 ได้ (ภัทริดาและคณะ, 2554)

ข้อดีของเทคนิค cross streak method คือสามารถตรวจกรองหาแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อทดสอบได้ครั้งละหลายเชื้อ อีกทั้งยังทำให้ทราบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารต้าน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

จุลินทรีย์ที่พบว่าควรเป็นสารที่ละลายน้ำได้ เพราะสารดังกล่าว ต้องสามารถละลายผ่านอาหารแข็งที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบหลักไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบ

เมื่อนำแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจจากการทดสอบ cross streak method ทั้ง 30 ไอโซเลท มาทำทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค Agar diffusion method และทำการวัด inhibition zone ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่ามี 10 ไอโซเลท ที่ให้ inhibition zone ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิด resistant type ที่นำมาทดสอบทั้งสิ้น 15 สายพันธุ์ ขนาดของ inhibition zone ที่วัดได้อยู่ในช่วง 6-21 mm ไอโซเลทที่ให้ Inhibition zone กว้างที่สุดคือ ไอโซเลทที่ 23 ขนาดของ Inhibition zone เท่ากับ 20.6±0.72 (24 ชั่วโมง) 21±3.16 mm (48 ชั่วโมง) ต่อเชื้อทดสอบ *Candida albicans* แบคทีเรียที่เป็น broad spectrum คือ ไอโซเลทที่ 39 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ถึง 4 สายพันธุ์ คือ MRSA28, MRSA29, MRSA31 และMRSA34 (ตารางที่ 4.6 และ 4.8) เทคนิคนี้เคยถูกนำมาใช้ในงานวิจัยของ สุรัตนา และคณะ จากการนำเชื้อที่แยกได้จากดินมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่าเชื้อทั้ง 38 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ATCC 6633 แต่มีผลเพียงเล็กน้อยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* ATCC 25922 (สุรัตนาและคณะ, 2543)

ผลการทดลองข้างต้นยังสอดคล้องกับงานวิจัยของนทีและวิรัญชน (2553) ที่ได้ทดลองคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินจากกรุงเทพมหานคร พระนครศรีอยุธยา และปราจีนบุรี รวม 21 ตัวอย่าง มาคัดแยกแบคทีเรียโดยวิธี cross streak กับแบคทีเรียก่อโรค 8 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น และพบว่า มีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่สร้างสารต้านเชื้อทดสอบได้อย่างน้อย 3 ชนิดจากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 36 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในมีเดียที่ต่างกันภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างๆ และทำการสกัดสารให้เข้มข้นขึ้น เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีเพียง 1 สายพันธุ์ ที่ยับยั้ง *B.cereus, E.coli, S.typhi, S.sonnei* และ *S.aureus* ได้ผลดีจริง (นทีและวิรัญชน, 2553)

Bacillus บางสายพันธุ์ เช่น *B. laterosporus* สามารถผลิตชีวสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้โดย ชีวสารดังกล่าวมีผลโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางเดินอาหาร *S. aureus, L. monocytogenes, C. botulinum* และ *B. stearothermophilus* เป็นต้น (สุมณฑา, 2549) จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อ *B. laterosporus* SA14 ที่แยกได้จากอากาศ สามารถผลิตชีวสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* และพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถปล่อย ชีวสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อทดสอบออกไปยังน้ำเลี้ยงเชื้อได้ตั้งแต่วันแรกของการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อโดยชีวสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้เป็นอย่างดีโดยเฉพาะ *S. aureus* และ MRSA เมื่อทดสอบด้วย agar well diffusion โดยฤทธิ์ดังกล่าวมีความ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ทนทานต่อความเป็นกรด-ด่าง สารเคมี และช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบ กล่าวคือ เปปไทด์ดังกล่าวยังคงแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ MRSA ได้เช่นเดิมภายหลังจากนำไปผ่านปัจจัยทดสอบดังกล่าวข้างต้น (จาตุรงค์ และ สุพรรนี, 2553)

การใช้ agar diffusion method ในการทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ทำให้สามารถทราบถึงคุณสมบัติเบื้องต้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่พบได้คร่าว ๆ ว่ามีการสร้างออกมาในปริมาณมากนั้นเพียงใดในช่วงเวลาที่กำหนดตามขนาดความกว้างของ inhibition zone ที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่ทำง่ายรวดเร็ว สามารถทดสอบสารต้านจุลินทรีย์ได้ทีละหลายๆ ชนิด แต่ข้อจำกัดคือ ไม่สามารถใช้เทคนิคนี้กับสารต้านจุลินทรีย์ที่ไม่แพร่กระจาย หรือไม่สามารถละลายในน้ำได้ และยังไม่สามารถบอกความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่แน่นอนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้

อย่างไรก็ตาม การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทั้ง cross streak method และ agar diffusion method เป็นเพียงการทดสอบตรวจคัดกรอง (screening method) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำแบคทีเรียมีฤทธิ์ที่น่าสนใจทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท จากการทดสอบ Agar diffusion method มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค modified microdilution พบว่ามีแบคทีเรียทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท ที่ให้ผล MIC ที่น่าสนใจ ไอโซเลทที่ให้ผล MIC ดีที่สุดคือไอโซเลทที่ 303 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA28 ที่ dilution เท่ากับ 1:512 และ ไอโซเลทที่ 39 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA28 และ MRSA34 ที่ dilution เท่ากับ 1:32 และ 1:4 โดยมีฤทธิ์ Anti-microbial activity เป็นแบบ Bacterioatasis (ตารางที่ 4.9) เมื่อเทียบกับผลการทดสอบ Anti-microbial activity ของ Gentamicin ที่ต้องใช้ความเข้มข้นของยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MRSA28 และ MRSA34 ถึง 62.50 µg/ml (dilution เท่ากับ 1:32 เมื่อ Gentamicin มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1,000 µg/ml) และ 1.95 µg/ml (dilution เท่ากับ 1:1,024 เมื่อ Gentamicin มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1,000 µg/ml)จึงควรมีการนำไปศึกษา และพัฒนาเพื่อเป็นประโยชน์ในด้านการแพทย์ต่อไป

ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของอัครวิทย์ (2006) ที่ได้รายงานคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยอาศัยวิธี Colorimetric microdilution broth assay จากตัวอย่างในทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทย พบว่า 10 % ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียในทะเลทั่วไปและแบคทีเรียกลุ่ม gliding สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ ในขณะที่ 30% ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มเดียวกันนี้ (อัครวิทย์, 2550)

โดยสรุปจากผลการทดสอบทั้งหมด 3 เทคนิค จะพบว่าดินเป็นแหล่งที่สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ สำหรับฤทธิ์ใน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของจีนัส *Bacillus* spp. อาจเกิดความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์กับแบคทีเรียและเชื้อรา ก่อโรคหลายชนิด วิธีในการควบคุมสิ่งมีชีวิตคู่แข่ง (biocontrol) ของ *Bacillus* spp. จะประกอบไปด้วยการต่อต้าน (antagonism) ,การแข่งขัน (compitition), การปล่อยโปรตีนที่มีฤทธิ์ไปต่อต้านหรือยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial) เช่น bacteriosin, chitinase, glucanase เป็นต้น มีการสร้างสารปฏิชีวนะ, สารที่ต่อต้านฟังไจ และสารระเหยจาก secondary metabolism pathway เป็นต้น

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมต่าง ๆ นิยมใช้จุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตกันอย่างกว้างขวางทั่วโลก เนื่องจากจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหารและการเกษตร เช่น amylase, protease, pectinase, lipase และ สารต้านจุลินทรีย์ เป็นต้น แต่สำหรับการวิจัยด้านเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในประเทศไทยเรา ความก้าวหน้าทางด้านนี้ยังมีไม่มากนักและยังมีช่องทางพัฒนาได้อีกมาก

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้นำดินทั้งสิ้น 100 ตัวอย่างข้างต้น มาการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญ ๆ ทั้งสิ้น 8 ชนิดคือ เอนไซม์ที่สามารถย่อย Chitin, Chitosan, Starch, Cellulose, Skim milk, Gelatin, Tween 20, และTween 80 โดยวิธี direct spot agar พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีฤทธิ์ที่น่าสนใจในส่วนของการทดสอบฤทธิ์การสร้างเอนไซม์ที่สำคัญ ๆ ทั้งสิ้น 76 ไอโซเลท เมื่อทำการศึกษาลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีแกรม โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกชนิดของจุลชีพออกเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ Gram positive bacilli with spore forming 35 ไอโซเลท, Gram positive coccobacilli 10 ไอโซเลท , Gram negative bacilli 18 ไอโซเลท, Gram variable 11 ไอโซเลท, และ fungi ในกลุ่ม septate hyphae 2 ไอโซเลท โดยพบว่ามีการสร้างเอนไซม์ย่อย Starch (amylase), Cellulose (cellulase) Gelatin (gelatinase), และ skim milk (proteinase) มากที่สุด (ตารางที่ 4.10-4.14)

ผลการทดสอบในครั้งนี้แตกต่างกับผลงานวิจัยของจาตุรงค์ และ สุพรรนี (2553) ที่คัดแยก *Bacillus* spp. ได้จากตัวอย่างดินและนำมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ proteinase และ chitinese และพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ chitinese ได้น้อยกว่า proteinase (จาตุรงค์ และ สุพรรนี, 2553)

ขณะที่ ผลการทดสอบคัดแยก alkalotolerant *Bacillus* spp. ที่ได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อกระดาษ พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและผลิต alkali proteinase ได้สูง เมื่อนำไป classified พบว่าแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *B. firmus* (UB1) *Bacillus* sp. (UB2) และ *B. pantothenticus*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

(UB3) จัดอยู่ในกลุ่มที่ผลิต alkali proteinase ได้ดีที่สุด เหมาะที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ต่อไป (จาตุรงค์ และ สุพรรนี, 2553)

เอนไซม์ gelatinase เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์เจลลาติน ซึ่งเป็นโปรตีนจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์ได้ บทบาทและการนำเอนไซม์ gelatinase ไปใช้ประโยชน์ในงานเกษตรและอุสาหกรรมคือ นำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำผลไม้และอาหาร โดยใช้เอนไซม์มาช่วยย่อยทำให้น้ำผลไม้ใส เพิ่มปริมาณผลผลิตในน้ำผลไม้ หรือใช้เอนไซม์มาช่วยย่อยโปรตีนจากสัตว์ก่อนให้เด็กเล็กรับประทาน

เอนไซม์ cellulese เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิก หากการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส พบว่าเอนไซม์นี้สร้างได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และรา เป็นต้น บทบาทและการนำเอนไซม์ cellulese ไปใช้ประโยชน์ในงานเกษตรและอุตสาหกรรม คือ นำไปใช้ในอุสาหกรรมผลิตน้ำตาลจากเซลลูโลส (cellulosic sugar) ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพและเคมีภัณฑ์จากวัตถุดิบชีวภาพ ใช้ในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้เอนไซม์ปริมาณมาก ช่วยลดต้นทุนการผลิตด้วย และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพถึง 10-20% นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ cellulase ในน้ำยาซักผ้าโดย cellulase จะไปย่อยเส้นไยผ้าที่เป็นขุยเล็กน้อยตามเนื้อผ้าที่ใช้งานเป็นเวลานาน แต่ไม่ย่อยเส้นไยหลักของผ้าทำให้เนื้อผ้าดูใหม่ปราศจากขุยผ้าที่ทำให้ผ้าดูหมองทำให้ผ้าดูขาวสะอาดและใหม่ขึ้นได้

เอนไซม์ amylase เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์พันธะในโมเลกุลของแป้ง (starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นเดกซ์ทริน (dextrin) และน้ำตาล (sugar) ไดแซ็กคาไรด์ การนำเอนไซม์ amylase มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นเริ่มต้นในยุโรปและอเมริกาโดยเริ่มแรกได้นำเอนไซม์ amylase มาใช้ในการแปรรูปแป้ง โดยพบว่าเอนไซม์สามารถเปลี่ยนแป้งไปเป็น syrups ได้เหมือนกับการใช้กรดและความร้อน แต่จะให้ yield มากกว่าและยังสามารถช่วยลด cost จากการใช้ความร้อนเป็นระยะเวลานานอีกด้วย จึงเป็นที่นิยมใช้กันเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน วัตถุประสงค์ในการนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากสามารถเปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้บริสุทธิ์กว่าการใช้สารเคมีหรือกรด ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณลักษณะคงที่ และที่สำคัญคือไม่มีการปนเปื้อนสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ที่ได้มาจากการใช้สารเคมี อีกทั้งยังเร่งการย่อยแป้งและใช้เร่งการหมักให้เกิดได้สูงสุด และช่วยป้องกันไม่ให้ขนมปังแห้งแข็ง นอกจากนั้นยังช่วยปรับปรุงด้านความยืดหยุ่นในอุตสาหกรรมอาหารได้ด้วย

เอนไซม์ Protease เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีนให้เป็นอะมิโนแอซิด ในอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นม นิยมใช้เอนไซม์ Proteaseในการตกตะกอนโปรตีนและช่วยเพิ่ม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รสชาติและสัมผัสให้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ เพื่อช่วยเพิ่มคุณค่าแก่อาหารสัตว์อีกด้วย

จากผลการทดสอบทั้งหมดสรุปได้ว่า จากตัวอย่างดินในแหล่งต่างๆ จำนวนทั้งสิ้น 100 ตัวอย่าง สามารถแยกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มดื้อยาและเชื้อราก่อโรคได้ทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท จำแนกชนิดได้เป็น *Bacillus* spp. 2 ไอโซเลท *Pseudomonas* spp. 1 ไอโซเลท และ *Burkholderia* spp. 1 ไอโซเลท และแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ที่สำคัญๆ ทั้งสิ้น 76 ไอโซเลท

จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีประโยชน์และการนำไปใช้งานหลายด้าน ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเพียงคุณสมบัติเบื้องต้นของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบและความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญๆในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น ดังนั้น หากต้องการพัฒนานำไปสู่การใช้ได้จริงจำเป็นต้องทำการศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ของจุลินทรีย์ เช่น ความสามารถในการผลิตสารต้าน จุลินทรีย์เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมแบบต่างๆ คุณสมบัติทางชีวเคมีและองค์ประกอบทางเคมีของสารสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น รวมทั้งความคงทนต่อการแปรรูปและเก็บรักษา

ในส่วนความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ที่สำคัญๆในระดับห้องปฏิบัติการ หากต้องการพัฒนานำไปสู่การใช้ได้จริง จำเป็นต้องพัฒนาการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยอาศัยข้อดีหลายๆ อย่างของเอ็นไซม์ เช่น chiral specificity, การเกิดปฏิกิริยาในอุณหภูมิปกติ, ลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายหรือเป็นพิษ เป็นต้น การวิจัยด้านเอ็นไซม์นี้ควรให้ความสำคัญกับการค้นหาและพัฒนาเอ็นไซม์ตัวใหม่ๆ ที่มีคุณลักษณะที่ดีกว่าตัวที่มีอยู่เดิม เช่น ความทนทานต่ออุณหภูมิสูง, ทนต่อสภาวะ กรด-ด่าง, ทนต่อโลหะหนัก หรือตัวทำละลายอินทรีย์, ทำงานได้ที่อุณหภูมิต่ำมากๆ หรือ ในสารละลายที่มีเกลือมาก, หรือเอ็นไซม์ที่มี kinetic properties ที่ดีกว่าเดิม เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นกับลักษณะการใช้งานในแต่ละกรณี

นอกจากนี้งานวิจัยที่ควรให้ความสนใจอีกอย่างหนึ่งคือ การใช้ประโยชน์ของเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวเนื่องจากการเกษตร เช่น เอ็นไซม์สำหรับใช้ผสมในอาหารสัตว์, อุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรม textile, อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ มากไปกว่านั้นจุลินทรีย์ยังมีบทบาทในการจัดการสิ่งแวดล้อม โดยนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียและขยะในแหล่งชุมชน เช่น ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือจากฟาร์มปศุสัตว์ปรับปรุงคุณภาพดินให้ใช้ในการเพาะปลูก เป็นต้น เพื่อสามารถนำไปสู่การใช้งานได้จริงในอนาคต

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บรรณานุกรม

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และ สมใจ ศิริโภค. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปส . คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.(2541) : 18-32

จักรพันธ์ สุวรรณพิมพ์ และ สุพรรณี แก่นสาร อะโอกิ (2009).Screening of Proteolytic Amylolytic and Lipolytic *Bacillus* spp. Isolated from Soil Agricultural Sci. J. 40 : 1 (Suppl.) : 389-392.

จาตุรงค์ จงจีน และ สุพรรนี แก่นสาร อะโอกิ. การคัดเลือก Bacillus spp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสจากดิน. ว วิทย์ กษ. 2553(3/1):317–20.

จริยา จันทร์ไพแสง นิพนธ์ ทวีชัย สุดาวรรณ เชยชมศรี ทิพย์วดี อรรถธรรม และสมนึก วงศ์ทอง. (2534). การแยกและจำแนกสายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในประเทศไทย. ใน เอกสารการประชุมทางวิชาการสาขาพืช ครั้งที่ 29 กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณกัญภัทร จินดาทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. เอนไซม์ไลเปส การผลิต และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 2549(26):115.

ดวงพร คันธโชติ (2537). อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2547) จุลชีววิทยาทั่วไป พิมพ์ครั้งที่ 4 สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นที หลีกชั่ว, วิรัญชน ตวงสุวรรณ.(2553) การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน. ภาควิชาจุล ชีววิทยา คณะ เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

บัวสาย เพชรสุริยวงศ์ นงพงา คุณจักร และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์ (2554).การแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียจากดินที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราใน เอกสารการประชุมทางวิชาการสาขาพืช กรุงเทพฯ :มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประภัสสร สุรวัฒนาวรรณ. เรื่องน่ารู้ไคติน-ไคโตซาน. [อินเทอร์เน็ต]. แหล่งที่มา http://poodangparoy.com/citin_citozane.html สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2556

พรรณกร อิ่มวิทยา (2536) เชื้อราก่อโรคในคน.ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. พิมพ์ครั้งที่ 2:134, 363 หน้า

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

พรพรรณ อู่สุวรรณ (2550).การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น,วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. Gelatin เจลาติน [อินเทอร์เน็ต]. สืบค้น จาก: www.foodnetworksolution.com สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2556

พิจิตรา ตั้งเขื่อนขันธ์, รสรินทร์ รุจนานนท์ และอัญชลี อานาทสมบูรณ์ (2548). การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิต เอนไซม์เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2556

ภัทริดา โปฎกชลอ ลิ้มสุวรรณ, วัชริยา ภูรีวิโรจน์, กุลนิติ ชูเชิด (2554). ผลของการใช้แบคทีเรียสกุล Bacillus spp. ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคAeromonas hydrophila และ Streptococcus agalactiae ในปลานิล (Oreochromis niloticus). เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาประมง. 2554:65–72.

ยุพดี ชัยสุขสันต์. (2527) เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา Trichoderma viride สายพันธุ์ TISTR 3161. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วรรณดี บัญญัตรัชต และ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ (2551).การคัดเลือกเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากดินที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และการบ่งเอกลักษณ์โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราช สุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สำนักพระราชวัง

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย http://www.rspg.org/microbiology/micro_01.htm สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2556

วิภาดา เงินถาวร, สุรพงษ์ คล้ายบุตร, ภูวดล บางรักษ์, วรางคณา จุ้งลก และ มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. การตรวจคัดกรองฤทธิ์ต้านมะเร็งจากแบคทีเรียสกุลสเตรปโตมัยซีท. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2553;22(1): 37-44 วีระสทิธิ์ กัลป์ยากฤต, อนันต์ บุญปาน และปรียานุช บวรเรืองโรจน์. การจำแนกแบคทีเรียที่ สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ และ ศึกษาสมบัติของเอนไซม์. การประชุมทาง วิชาการครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์;30มกราคม-2กุมภาพันธ์2549;มหาวทิยาลยัเกษตรศาสตร์,กรงุเทพฯ,2549. สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2556

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต; ปรียานุช บวรเรืองโรจน์ (2545).การแยกแบคทีเรียชอบเกลือที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสชอบเกลือเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา, การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 40 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร หน้า 366-73.

สุขุมวัฒณ์ พีระพันธ์ และ ญาณี ด่านดำรงค์รักษ์ (2550) Screening of Effective Antagonistic Bacteria to Inhibit Some Plant Pathogens of Rice.รายงานผลการวิจัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. 2549.

สุเทพ ไวครุฑธา การใช้ประโยชน์จากทรัพยากรจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2556

สุรัตนา อำนวยผล, ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์, (2543) การศึกษาสารปฏิชีวนะของเชื้อ Micromonospora : รายงานผลการวิจัย ภาควิชาเภสัชเวท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.สืบค้น จาก http://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/2175 สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2556

สำนักงานเลขานุการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. เชื้อแบคทีเรีย MRSA [อินเทอร์เน็ต]. สืบค้น จาก: webdb.dmsc.moph.go.th สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2556

อรวรรณ์ บุตรดีพรพรรณ อู่สุวรรณ, กัญญา สอนสนิท (2556). การคัดเลือกเชื้อบาซิลลัสโพรไบโอติกจากทางเดินอาหารของกุ้งก้ามกรามจากคลองธรรมชาติในจังหวัดนครปฐม. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2556(1):10–20.

อาภัสสรา ชมิดท์. (2537) ชีวเคมี. สหมิตรออฟเซท

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, พรทิพย์ พึ่งม่วง, สมหญิง งามอุรุเลิศ และ พจมาน ผู้มีสัตย์. (2548) การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2550) สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ในทะเลในประเทศไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ [อินเทอร์เน็ต]. สืบค้น จาก: http://research.trf.or.th/node/1701 สืบค้นเมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2556

Alexander M. 1967. Introduction to soil microbiology. Toppan Printing Co(S) Pte. Ltd. Singapore:169-181.

Amyes, S.G.B. and Thomson, C.J. (1995). Antibiotic resistance in the ICU; the eve ofdestruction. *British Journal of Intensive Care. 5,* 263-271.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Barefoot SF, Klaenhammer TR (1984). Purification and characterization of the Lactobacillus acidophilus bacteriocin lactacin B. Antimicrob Agents Chemother. Sep;26(3):328–334.

Bisaria, V.S., Ghose, T.K., (1981). Bidegradation of cellulolosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme Microbial Technology 3, 90-104.

Brown, J. C., Shanahan, P. M. A., Jesudason, M. V., *et al.* (1996). Mutations responsible for reduced susceptibility to 4-quinolones in clinical isolates of multi-resistant *Salmonella* Typhi in India. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy37*, 891–900.

Cherif A, Chehimi S, Limem F, Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D and Boudabous A (2003) Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, Bacillus thuringiensis ssp. entomocidusHD9. J. Appl. Microbiol. 95, 990-1000.

Cherif A. Ouzar HO, Daffonchio D. Cherif C., Ben Slama AH K., S. Jaoua AB.(2011) A novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. Letters in Applied Microbiology. (4):243–7.

Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A (2004). Bacteriocin-like substance production by Bacillus licheniformis strain P40. Lett. Appl.M. 38: 251-256.

Claus, D., and Berkeley, R.C.W. (eds). (1986). Genus Bacillus Cohn 1872. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (Vol.2). (pp.1105-1139). P.H.A., Sneath, et al. USA : Williama & Wilkins, Baltimore.

Dalhoff A. (1994). Quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* development during therapy and clinical significance, *Infection. 22*,111–121.

Dashtban M, Schraft H, Qin W. 2009. Fungal Bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspective. Int. J. Biol. Sci. 5: 578-595.

Fan LT, Gharpuray MM, Lee Y-H. (1987) Cellulose hydrolysis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. London..

Fergus, C. L. (1969) The cellulolytic activity of themophilic fungi and actinomycetes. Mycologia. (61):120-9.

Fleming, H. P., J. L. Etchells, and R. L. Costilow. (1985).Microbial inhibition by an isolate of Pediococcus from cucumber brines. Appl. Microbiol. 30:1040-42.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Garbutt, J.(1997). Essentials of Food Microbiology. Arnold, London, England.

Gilman J.C. (1957). Manual of soil fungi. The Iowa State University Press. Iowa USA.:450

Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. (1995). Dictionary of the fungi. CAB international,New York, USA.

Hassan YSMA, Kalsom NAU, H. Ariffin. Production and characterization of cellulose by *Bacillus pumilus* EB3. International Journal of Engineering and Technology. 2006(3):47–53.

Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., *et al.* (1997). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 40*, 135-46.

Isaac, S. and D. Jennings. 1995. Microbial Culture. Bios Scientific Publishers Limited. UK. 133 pp.

Kazemi A R-AS, Shahbazi M SA, Ghasemi Y. Isolation, identification, and media obtimization of high- level cellulose production by *Bacillus* sp. BCCS A3, in a fermentation system using response surface methodology. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2014(2):107–18.

Klyosov AA. (1990) Trends in biochemistry and enzymology of cellulase degradation. Biochemistry. 29, 10577-85.

Krongsakda Phakthanakanok (2006)ไอน้ำซีม์กับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร, Asia Pacific Food Industry Thailand, Vol.3, No.21, September-October 2006, pp. 27-30

Larry, T., Bernard, H., Pedro, C., Nathan, E., Steven, H. and Ronald, W. Complete cellulase system in the marine bacterium Saccharophaus degradans strain 2-40TJournal of Bacteriology. 2006.(11):3849-61.

Lechevalier R AF, Corke CT HC, Waksman SA. Candicidin. A new antifungal antibiotic. Mycologia. 1953(45):155–71

Maria Ghani AA, Afsheen Aman RRZ, Nadir Naveed Siddiqui SAUQ. Isolation and characterization of different strains of Bacillus licheniformis for the production of commercially significant enzymes. Pak J Pharm Sci. 2013(4).

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Nuttapol Noirungsee, Rudolf Müller and Pahol Kosiyachinda(2009).Identification and Characterization of Bacteria with High Adhesion to Hydrocarbon Ability Poster presentation, science exhibition 2009,Faculty of Science, Mahidol University

Oscariz JC, Lasa I, Pisabarro AG (1999). Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. FEMS Microbiol. Lett. 178: 337-341.

Raper K.B. and Fennell D.I. (1965). The genus Aspergillus. Williams&Wilkins Baltimore USA.:686

Robbers J., Speedie M., and Taylor V. (1996). *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams and Wilkins. pp. 1-14.

Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., and Chambliss, G.H. (1998). Bacillus. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections Systematic Bacteriology. 2: 709-729.

Samuelsson O. (2004). *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*. Stockholm: 5th Swedish Pharmaceutical Press.

Sarker PK TS, Deb P SS, Mohsina K. Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from Bacillus licheniformis P003 [อินเทอร์เน็ต]. http://www.springerplus.com. [อ้างถึง 21 พฤศจิกายน 2013]. สืบค้นจาก: http://www.springerplus.com

Priest, F.G. (1993). Systematica and ecology of Bacillus, *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria : biochemistry, physiology and molecular genetics, A.I., Sonenshein, J.A., Hoch, R., Losick (eds). pp 3-16. American Society for Microbiology,Washington, DC.

Turnbull, P.C.B., Kramer, J.M., and Melling, J. (1990). Bacillus. Topley & Wilson's Principle of Bacteriology, Virology and Immunity. 2: 187-210.

Swan, D.G., Rodriguez, A.M., Vilches, C., Mendez, C., and Salas, J.A. (1994). Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. Mol. Gen. Genet. 242: 358-362.

Lechevalier, R., Acker, F., Corke, C.T., Haenseler, C.M., and Waksman, S.A. (1953). Candicidin, a new antifungal antibiotic. Mycologia. 45: 155-171.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., and Okami, Y. (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. J. Antibiot (Tokyo). 15(5): 200-209.

Williams, S. T., Goodfellow, M. & Alderson, G. Genus*Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1989(4).

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., and van Boekel, M.A.J.S. (1999). Dairy Technology:Principles of Milk Properties and Processes.Marcel Dekker, Inc., New York.

Zukowski M.M. (1992). Production of commercially valuable products R.H. Doi, M. McGoughlin (Eds.), Biology of bacilli, applications to industry, Butterworth-Heinemann, Boston pp. 311–37.

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

การเตรียมอาหาร

Nutrient agar (NA)

Beef extract 3 กรัม

Peptone 5 กรัม

Agar 15 กรัม

ละลายน้ำกลั่น 500 มล. ปรับ pH 6.8-7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่อง autoclave ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15-20 นาที

Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน และปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2-7.6 นำไปเข้าเครื่อง autoclave ฆ่าเชื้อที่ความอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ121 ˚C เป็นเวลา 15 นาที

Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar	39.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่อง autoclave ฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 ˚C เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Luria Bertani (LB) broth

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันนำไปเข้าเครื่อง autoclave ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121˚C เป็นเวลา 15-20 นาที

Basal mineral salts medium+ 1% glucose

$(NH_4)_2SO_4$	2.64	กรัม
KH_2PO_4	2.38	กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	5.65	กรัม
$MgHO_4.7H_2O$	1	กรัม
Trace salts solution	1	มิลลิลิตร
Bacto agar	15	กรัม
Glucose	10	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่อง autoclave ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

Trace salts solution

$CuSO_4.5H_2O$	0.64	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.11	กรัม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

$MgC_{12}.4H_2O$ 0.79 กรัม

$ZnSO_4.7H_2O$ 0.15 กรัม

Distilled water 100 มิลลิลิตร

Yeast extract-malt extract agar

Bacto yeast extract 4.0 กรัม

Bacto malt extract 5.0 กรัม

Glucose 4.0 กรัม

Agar 20 กรัม

Distilled water 1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 500 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

Starch agar

Basal mineral salts medium 1,000 ml

Soluble starch 10 g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

Gelatin agar

Basal mineral salts medium 1,000 ml

Bacto gelatin 4 g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

Skim milk agar

Basal mineral salts medium 1,000 ml

นมผง 50 g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Chitin selective media

Basal mineral salts medium	1,000	ml
Collodidal Chitin	10	g (dry weight)

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

การเตรียม Collodidal Chitin

- Chitin 10 g ผสมกับ acetone 20 ml และ conc. HCl ปริมาตร 200 ml คนให้เข้ากันโดยใช้ magnetic bar กวนตลอดเวลาในอ่างน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำไปกรองผ่านผ้าขาวบาง 2-3 ชั้น แล้วนำไปใส่ใน 50% ethanol ปริมาตร 600 ml ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic bar กวนตลอดเวลา เพื่อตกตะกอนไคติน
- ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 1N NaOH จากนั้นเก็บ Collodidal Chitin ไว้ที่ 4°C

Chitosan selective media

Basal mineral salts medium	1,000	ml
Collodidal Chitosan	10	g (dry weight)

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

การเตรียม Collodidal Chitosan

- Chitosan 10 g ละลายใน 1% CH_3COOH ปริมาตร 300 ml คนให้เข้ากันโดยใช้ magnetic bar กวนตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.0 ด้วย 1N NaOH จากนั้นเก็บ Collodidal Chitosan ไว้ที่ 4°C

Cellulose selective media

Basal mineral salts medium	1,000	ml
Cellulose	10	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

หมายเหตุ Cellulose ต้องละลายด้วยน้ำร้อนก่อนนำมาละลายใน Basal mineral salts medium

Tween 80 agar

Basal mineral salts medium	1,000	ml
Tween 80	10	ml

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

CaCl2	0.1	g
Phenol red	0.1	g

ละลายส่วนประกอบ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

หมายเหตุ Tween 80 แยกนึ่งฆ่าเชื้อ

Tween 20 agar

Basal mineral salts medium	1,000	ml
Tween 20	10	ml
$CaCl_2$	0.1	g
Phenol red	0.1	g

ละลายส่วนประกอบ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

หมายเหตุ Tween 20 แยกนึ่งฆ่าเชื้อ

Tryptic soy broth

TSB	3	g
Glycerol	15	ml
น้ำกลั่น	85	ml

ละลายส่วนประกอบทั้งหมด ดูดใส่ Vial tube หลอดละ 1.5 ml แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

Blood agar

Beef heart infusion	500	g
Tryptose	10	g
NaCl	5	g
Agar	2	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 500 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ข้างนอกให้พออุ่น กระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 50°C เติมเลือด 5% (v/v) ลงใน warm sterilized blood agar เขย่าให้เข้ากัน

MacConkey agar

Peptone	17	g

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Proteose	3	g
Lactose	10	g
Bile salt NO.3	1.5	g
Neutral red	0.03	g
Crystal violet	0.001	g
Agar	13.5	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 500 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C, 15-20 นาที

สูตรการเตรียมสารเคมี

0.2 aqueous Congo red

Congo red	2	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

1M NaCl

NaCl	58.5	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Iodine solution

Iodine	1	g
KI	2	g
น้ำกลั่น	300	ml

$MgCl_2$ solutoin

$MgCl_2$	150	g
Conc. HCl	200	ml
น้ำกลั่น	800	ml

1N NaOH

NaOH	40	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

50% Ethanol

95% Ethanol	526	ml
น้ำกลั่น	474	ml

Idole/TSB/broth = Triptic soy Broth (T7)

คำนวณชั่งตามอัตราส่วนข้างกระป๋อง 30 g/1L

T7 3 กรัม

DW 100 มิลลิลิตร

ชั่งตามอัตราส่วนข้างกระป๋อง ผสมกับ DW คนให้เข้ากันดี และไม่ต้องปรับ pH (7.3±0.2)แบ่งใส่ Tube 13x100 mm. screow cab ปิดฝา นำไป Autoclave 121°C นาน 15 นาที

MR-VP Broth (M7)

0.5 mL Tube 13x100 mm. ฝาสีเหลือง pH 6.9±0.2

MR VP(M7) 1.7 กรัม

DW 100 มิลลิลิตร

คนให้เข้ากันดีไม่ต้องต้ม และไม่ต้องปรับ pH (7.3±0.2) แบ่งใส่ Tube 13x100 mm. screow cab ปิดฝาคลุมด้วยกระดาษรัดยางนำไป Autoclave 121°C นาน 15 นาที

OD = Decarboxylase medium base + L-Ornithine

2 ml. ฝาสีชมพู pH 6.8

Decarboxylase medium base (D2) ในตู้เย็น

DW

L-Ornithine (O1)

วิธีทำ ผสม Decarboxylose base และ DW คนให้เข้ากันดีต้มพอเดือด ใส่น้ำตาล L-Ornithine ละลายให้หมด แบ่งใส่ Tube Autoclave 121°C นาน 10 นาที

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Glucose OF (P14)

10 g/L

น้ำตาล Glucose 1% ต้ม นาน 10 นาที

ต้ม P14 กับน้ำกลั่น จนเดือด ใส่น้ำตาล 1% คนให้ละลาย แบ่ง 2 ml/tube

TSI = Typtic Soy Iron Agar (T9)

ใส่ 4 cc. tube scraw cab 13x100 mm. Slant pH 7.4±0.2

1. ชั่งใน Beaker
2. ต้มใน Micro wave จนเดือดและ agar ละลาย
3. ปรับ pH7.4 แบ่งใส่ tube 4 cc. และปิดฝา
4. นำไป Autoclave 121°C นาน 15 นาที
5. จากนั้นนำมาวางเอียงโดยใช้ Pipete 5,10 ml. รองที่คอ tube
6. รอจนกว่า media แข็งตัวหรือเย็นลง แล้วจึงเก็บในตู้เย็นหรือนำไปใช้

Motile = Motilelity Test Medium (M6)

ใส่ 2 ml. tube 13x100 mm. ฝาม่วง pH 7.3±0.2

1. ชั่งใน Beaker
2. ต้มใน Microwave จนเดือดและ agar ละลาย
3. แบ่งใส่ tube 2 cc. และปิดฝาสีม่วง
4. คลุมด้วยกระดาษรัดหนังยาง
5. นำไป Auto clave 121°C นาน 15 นาที

LIA = Lysine Iron Agar (L6)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ใส่ 4 cc. tube scraw cab 13x100 mm. Slant pH 6.7±0.2

1. ชั่งใน Beaker

2. ต้มใน Micro wave จนเดือดและ agar ละลาย

3. ปรับ pH7.4 แบ่งใส่ tube 4 cc. และปิดฝา

4. นำไป Autoclave 121°C นาน 15 นาที

5. จากนั้นนำมาวางเอียงโดยใช้ Pipete 5,10 ml. รองที่คอ tube

6. รอจนกว่า media แข็งตัวหรือเย็นลง แล้วจึงเก็บในตู้เย็นหรือนำไปใช้

Urease = Urea Ager base (U1)

2-3 ml. Tube sterile 13x100 scow cab

ก่อนทำให้ sterile DW. Flask 125 ml. และ ช้อนตักสาร

ส่วนที่ 1 Urease arag base (ตู้เย็น) 29 กรัม

DW sterile 100 มิลลิลิตร เก็บใน Flask sterile 125 ml.

**ไม่ต้องต้มคนให้ละลายแล้วกรองผ่าน Millipore filter เก็บใน Flash sterile

ส่วนที่ 2 Bacto agar (agar powder) 3 กรัม

DW 180 มิลลิลิตร **ใส่ใน Flask ขนาด 250 ml.

คลุมด้วยกระดาษ รัดหนังยาง นำไป Autoclave 121°C นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น 40 -50 C

วิธีทำ ดูดส่วนที่ 1ด้วย Syringe 20 ml. มา 20 ml. ผสมในส่วนที่ 2 ที่ทิ้งให้เย็น40-50 C จากนั้นใช้ Syringe 20 ml. ดูดจากส่วนที่ผสมแล้ว มาแบ่งใส่ Tube sterile 13x100 screow cab ประมาณ 2-3 ml. ด้วยวิธีการทำ Aseptic technique ปิดฝาแล้วเอียง Tube ทันที รอให้เย็น เก็บในตู้เย็น

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวกที่ 1 ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive bacilli with spore forming ที่มีฤทธิ์ในการเชื้อทดสอบ และมีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์

ลำดับที่	Isolate	Gram's stain	Hemolysis zone บน Blood Agar	Biochemical								Identifation
				Catalase	Motile	Glucose OF	Manitol	Indole	Citrate	VP	NO_3	
1	18	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
2	23	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
3	24	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
4	39	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
5	75	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
6	196	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
7	290	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
8	294	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
9	299	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
10	303	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
11	309	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
12	315	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
13	318	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
14	325	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
15	326	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
16	329	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*

+ คือ Positive, - คือ Negative, V คือ Variable

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลำดับที่	Isolate	Gram's stain	Hemolysis zone บน Blood Agar	Biochemical								Identifation
				Catalase	Motile	Glucose OF	Manitol	Indole	Citrate	VP	NO_3	
17	336	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
18	337	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
19	340	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
20	341	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
21	346	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
22	354	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
23	368	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
24	372	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
25	373	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
26	376	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
27	383	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
28	384	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
29	386	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
30	388	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
31	394	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
32	395	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
33	401	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*

+ คือ Positive, - คือ Negative, V คือ Variable

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลำดับที่	Isolate	Isolate	Hemolysis zone บน Blood Agar	Biochemical								Motile
				Catalase	Motile	Glucose OF	Manitol	Indole	Citrate	VP	NO_3	
34	404	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
35	405	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
36	410	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
37	411	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
38	412	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
39	418	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
40	421	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	-/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
41	423	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/+	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
42	424	Gram positive bacilli with spore forming	β – Hemolysis	+	Motile	+/+	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*
43	428	Gram positive bacilli with spore forming	β - Hemolysis	+	Motile	+/-	V	V	V	V	V	*Bacillus spp.*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวกที่ 2 ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive coccobacilli ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์

ลำดับที่	Isolate	Gram's stain	Colony ให้ pigment สีส้มแดง คล้ายหยดน้ำ	ย้อมติดสี Partial Acid fast bacilli	Oxidase	Identifation
1	162	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
2	295	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
3	297	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
4	304	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
5	306	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
6	307	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
7	319	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
8	323	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
9	331	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
10	333	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.
11	401	Gram positive coccobacilli	√	√	+	*Rhodococcus* sp.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวกที่ 3 ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์

ลำดับที่	Isolate	Gram's stain	Biochemical											
			Catalase	Oxidase	Motile	Glucose OF	Fluorescent Pigment	48 h โคโลนีจิบย่น	Manitol	TSI	AD , LD, NO_3	Gel	Glucose fermenter	Identifation
1	10	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	−	+	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Burkholderia* spp.
2	17	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	−	+	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Burkholderia* spp.
3	38	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	−	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
4	69	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	−	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
5	70	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	−	+	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Burkholderia* spp.
6	191	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	−	+	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Burkholderia* spp.
7	225	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	−	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
8	226	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	−	+	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Burkholderia* spp.
9	277	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	−	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวกที่ 3 ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ (ต่อ)

ลำดับที่	Isolate	Gram's stain	Biochemical											
			Catalase	Oxidase	Motile	Glucose OF	Fluorescent Pigment	48 h โคโลนีจีบย่น	Manitol	TSI	AD , LD, NO_3	Gel	Glucose fermenter	Identifation
10	278	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	–	+	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Burkholderia* spp.
11	293	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
12	303	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	–	+	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Burkholderia* spp.
13	310	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
14	353	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
15	357	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
16	360	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
17	361	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
18	362	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวกที่ 3 ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram negative bacilli ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ (ต่อ)

ลำดับที่	Isolate	Gram's stain	Biochemical											
			Catalase	Oxidase	Motile	Glucose OF	Fluorescent Pigment	48 h โคโลนีจิบย่น	Manitol	TSI	AD , LD, NO_3	Gel	Glucose fermenter	Identifation
19	364	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
20	366	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
21	367	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
22	369	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
23	378	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
24	385	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
25	393	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
26	413	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.
27	420	Gram negative bacilli	+	+	Motile	+/-	+	–	+	K/N	±, ±, ±	+	GNF	*Pseudomonas* spp.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวกที่ 4 ผลการทำ Identification ของแบคทีเรียกลุ่ม Gram variable ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์

ลำดับที่	Isolate	ลักษณะ colony	Gram's stain	Hemolysis zone บน Blood Agar	Biochemical			Identifation
					Catalase	Motile	Glucose OF	
1	374	BA: colony สีขาว-เหลือง	Gram variable	β - Hemolysis	+	Motile	-/-	*Pimelobacter spp.*
2	379	BA colony สีเหลือง	Gram variable	β - Hemolysis	+	Motile	+/+	*Oerskovia spp.*
3	387	BA: colony สีขาว-เหลือง	Gram variable	β – Hemolysis	+	Motile	-/-	*Pimelobacter spp.*
4	390	BA: colony สีเหลือง-ส้ม	Gram variable	β – Hemolysis	+	Motile	+/+	*Cellulomonas spp.*
5	391	BA: colony สีขาว-เหลือง	Gram variable	β – Hemolysis	+	Motile	-/-	*Pimelobacter spp.*
6	392	BA: colony สีขาว-เหลือง	Gram variable	β – Hemolysis	+	Motile	-/-	*Pimelobacter spp.*
7	399	BA: colony สีเหลือง-ส้ม	Gram variable	β – Hemolysis	+	Motile	+/+	*Cellulomonas spp.*
8	400	BA: colony สีเหลือง	Gram variable	β – Hemolysis	+	Motile	+/+	*Oerskovia spp.*
9	406	BA: colony สีเหลือง-ส้ม	Gram variable	β - Hemolysis	+	Motile	+/+	*Cellulomonas spp.*
10	415	BA: colony สีเหลือง	Gram variable	β - Hemolysis	+	Motile	+/+	*Oerskovias spp.*
11	416	BA colony สีเหลือง-ส้ม	Gram variable	β - Hemolysis	+	Motile	+/+	*Cellulomonas spp.*

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวกที่ 5 ผลการทำ Identification ของเชื้อรา ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบและมีความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์

ลำดับที่	Isolate	ลักษณะ colony	Lactophenol cotton blue stain	ลักษณะก้านชู	Identifation
1	40	YM : colony สีเขียว-เทา เป็นกำมะหยี่	Septate hyphae	คล้ายนิ้วมือ	*Penillium* spp.
2	43	YM : colony สีเขียว-เทา เป็นกำมะหยี่	Septate hyphae	คล้ายนิ้วมือ	*Penillium* spp.

มหาวิทยาลัยรังสิต
Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

คำนำหน้า ☐ นาย ☑ นาง ☐ นางสาว

ตำแหน่งทางวิชาการ ☐ ศ. ☐ รศ. ☐ ผศ. ☐ อื่นๆ _____ดร._____

ชื่อผู้วิจัย พรรณนภา

นามสกุลผู้วิจัย เภาทอง

ชื่อภาษาอังกฤษ Pannapa

นามสกุลภาษาอังกฤษ Powthong

ที่อยู่(บ้าน) 84/27 หมู่ 5 ตำบล บางพูน อำเภอ เมือง จังหวัด ปทุมธานี

รหัสไปรษณีย์(บ้าน) 12000

โทรศัพท์(บ้าน) 037-314527

แฟกซ์ (บ้าน) -

ที่อยู่ (ที่ทำงาน) 52/347 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต หมู่บ้านเมืองเอก ถนนพหลโยธิน ต. หลักหก อ. เมือง จ. ปทุมธานี

จังหวัด(ที่ทำงาน) ปทุมธานี

รหัสไปรษณีย์(ที่ทำงาน) 12000

โทรศัพท์(ที่ทำงาน) 0-2997-2222 ต่อ 1434

แฟกซ์(ที่ทำงาน) 0-2997-2200 ต่อ 5577

E-Mail Address : pannapa_pt@yahoo.com

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ปริญญาตรี

สาขา คณะเทคนิคการแพทย์

ปีที่จบ 2544

สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล

ประเทศ ไทย

ปริญญาเอก

สาขา เวชศาสตร์เขตร้อน

ปีที่จบ 2549

สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล

ประเทศ ไทย

Post Doctoral fellowship under the Tokyo Biochemical Research Foundation (TBRF) at Department of Appropriate Technology Development and Transfer, Research Institute, International Medical Center of Japan Ministry of Health Labour and Welfare of Japan.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

_____-_____

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

1. Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes**,** Parasitology International, Vol. 55 , 107-112, 2006.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2. Population genetic structure of Plasmodium falciparum in the Thai-Myanmar border region - microsatellite DNA analysis, Malar J. 2008 Oct 21; 7:212.

3. Evaluation of endophytic fungi extract for their antimicrobial activity from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. Int J Pharm Biomed Res 2012, 3(2), 132-136.

4. Early adhesion molecule induction by cytoadherence of malaria-infected red blood cells and comodulation of immune cells: the roles of parasite adhesion and time course, preparing for submit.

5. Evaluation of of the Endophytic Fungi Extract for their Antimicrobial activity from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research (IJPBR). 2012, 3(2), 132-136.

6. Screening of Antimicromicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers., J Agri Sci Tech. Vol. 15, Supplementary issue, December 2013.

7. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Endophytic Fungi Isolated from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. International Journal of Phytomedicine (IJPM). 2013,Vol. 5.102-7.

8. Antibacterial and Probiotic Properties of lactic acid bacteria isolated from chicken intestine, entrails of swine, and soil against gastrointestinal and urogenital pathogenic bacteria, World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS). 2014, Vol. 3.

9. Antibacterial activity of Probiotic bacteria isolated from Thai treditional fermented food on gastrointestinal and urogenital pathogenic bacteria, preparing for submit.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่ด้วย)

1. Oral Presentation on "Early induction of adhesion molecule in endothelial cells by *P. falciparum* -infected red blood cells (PRBC) with the co-stimulation of immunocompetent cells" Joint International Tropical Medicine Meeting 2005, Bangkok, 30 November – 2 December 2005.

2. Oral Presentation on "Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes" RGJ Seminar Series XLI , Trends and research in Parasitology, Bangkok, 2 Feb 2006.

3. Oral Presentation on "Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the Thai-Myanmar border region - microsatellite DNA analysis" Joint International Tropical Medicine Meeting 2007, Bangkok, 29-30 November 2007.

4. Poster Presentation on "การตรวจกรองฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นแคบ้าน" (Screening of Antimicromicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers.) RSU conference 2010

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่ด้วย)

1. Poster Presentation on "Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes" Molecular Parasitology Meeting 2006, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA , 10-14 September 2006.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2. Oral Presentation on “Microsatellite DNA polymorphisms flanking pfcrt of *Plasmodium falciparum* suggested different modes of evolution of chloroquine resistance in Thailand and Vietnam” 48 th Annual meeting of Japanese society of tropical medicine, Oeta prefecture, Japan, 12-13 October 2007.

3. Oral Presentation on “Microsatellite DNA analyses revealed different genetic population structures of Plasmodium falciparum isolates from patients with different clinical outcomes – A study in the Thai-Myanmar border region” 77th Annual Meeting of Japanese Society of Parasitologists (JSP) 2008, Nagasaki prefecture, 2-4 April 2008.

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล(โปรดระบุรางวัลที่ได้รับด้วย)

1.การตรวจกรองฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นแคบ้าน (Screening of Antimicromicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers.

ได้รับรางวัลการเสนอผลงานวิจัย ประเภทโปสเตอร์ดีเด่น ประจำปี 2553 ที่ RSU conference 2010

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

_____-_____

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

จุลชีววิทยา, จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก, โลหิตวิทยา, ปรสิตวิทยา, และอณูชีววิทยา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University