บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีท (actinomycetes) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (hypha) แตกกิ่งก้านเป็นโครงข่ายซับซ้อนเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เซลล์ของแอคติโนมัยสีทมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยสร้างสปอร์ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้มเรียกว่า โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) หรือโคนิเดีย (conidia) แต่ถ้ามีถุงหุ้มเรียก สปอร์แรงกิโอ-สปอร์ (sporangiospore) อยู่ในถุงสปอร์แรงเกียม (sporangium) สปอร์ของแอคติโนมัยสีทอาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเรียงตัวกันเป็นสายยาว ไม่ทนต่อความร้อน แต่ทนต่อความแห้งช่วยให้รอดพ้นจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม ซึ่งความแตกต่างของสปอร์ของแอคติโนมัยสีทสามารถใช้ในการจำแนกแอคติโนมัยสีท มีองค์ประกอบของเบสใน DNA หรือปริมาณ GC ในเซลล์อยู่ระหว่าง 63-78 เปอร์เซ็นต์ (Madigan, Martinko, and Parker, 2000, p. 519)

แอคติโนมัยสีทมีลักษณะคล้ายแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งจะมีทั้งแบบเซลล์เดี่ยวจนไปถึงเส้นใยที่แตกกิ่งเป็นแขนง และแตกหักเป็นท่อนสั้นๆ มีลักษณะคล้ายเส้นใยของเชื้อรา แต่มีขนาดเล็กเท่ากับเซลล์ของแบคทีเรีย (งามนิจ นนทโส, ม.ป.ป., หน้า 186)

ลักษณะของแอคติโนมัยสีทที่คล้ายกับเชื้อรา

1. เส้นใยของแอคติโนมัยสีทมีการแตกกิ่งเป็นแขนงคล้ายเส้นใยของเชื้อรา
2. แอคติโนมัยสีทหลายจีนัสมีการสร้างเส้นใยที่เจริญอยู่ในอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งตรงปลายจะมีโคนิเดียคล้ายกับเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา
3. การเจริญของแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวมีลักษณะการเจริญแบบกลุ่มก้อนมากกว่าการเจริญแบบเซลล์เดี่ยวๆ
4. การเพิ่มจำนวนของแอคติโนมัยสีทจะคล้ายกับเชื้อรา คือ มีการเจริญที่ส่วนปลาย (apical growth)

ลักษณะของแอคติโนมัยสีทที่คล้ายกับพวกแบคทีเรีย

1. มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกัน คือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร

2. ส่วนที่ขาดออกเป็นท่อนๆ (fragment) จะมีลักษณะรูปร่าง การติดสีย้อมและลักษณะทางสรีรวิทยา คล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium* และ Coryneform

3. ถูกทำลายได้โดยแบคเทอริโอฝาจ (bacteriophage) และสารปฏิชีวนะประเภทเดียวกับที่ทำลายแบคทีเรีย

4. เป็นเซลล์ที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (prokaryotic cell)

5. ผนังเซลล์ไม่มีไคตินหรือเซลลูโลส แต่เป็นสารประกอบ polymer ของน้ำตาล กรดอะมิโน ซึ่งคล้ายกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria)

แอคติโนมัยสีทเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย และมีความสำคัญต่อธรรมชาติโดยช่วยย่อยสลายซากของสิ่งมีชีวิต และปลดปล่อยแร่ธาตุต่าง ๆ ให้อยู่ในรูปที่สิ่งมีชีวิตต่างๆ ในธรรมชาติสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเจริญของพืช อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์กลุ่มสำคัญที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีความหลากหลาย และมีการนำมาใช้กันมากในสถาบันวิจัยต่างๆ โรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งยังนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนและสัตว์ (Waksman, 1950, pp. 1-2)

สามารถพบแอคติโนมัยสีทได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน กองปุ๋ยหมัก วัสดุเน่าเปื่อยอื่นๆ ดินตะกอนจากแหล่งน้ำต่างๆ รวมทั้งดินใต้ทะเล ในแม่น้ำ ลำธาร ทะเลสาบ และทะเล ในดินจะพบแอคติโนมัยสีทประมาณ 10-33 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียในดิน ปริมาณโดยเฉลี่ยของแอคติโนมัยสีทอยู่ระหว่าง 10^5-10^8 เซลล์ต่อดินแห้ง 1 กรัม กลุ่มที่พบมากที่สุด คือ *Streptomyces* และ *Nocardia* ปริมาณของแอคติโนมัยสีทเกี่ยวข้องกับสมบัติทางฟิสิกส์ของดิน ปริมาณอินทรียวัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน โดยทั่วไปดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง มีความเป็นด่างเล็กน้อยและค่อนข้างแห้ง จะมีปริมาณแอคติโนมัยสีทค่อนข้างสูง เช่นดินบริเวณป่า และดินในพื้นที่การเกษตร ส่วนดินที่มีความเป็นกรดสูงหรือมีน้ำขัง จะมีปริมาณของแอคติโนมัยสีทน้อยกว่า (สมศักดิ์ วังใน, 2528, หน้า 18; สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2549, หน้า 64)

Xu, Li และ Jiang (1996) พบว่าในสภาพที่ดินแห้งและไม่สมบูรณ์ จะทำให้จำนวนแอคติโนมัยสีทลดลง แต่จำนวนของ *Streptomyces* เพิ่มขึ้นมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ Hayakawa, Ishizawa และ Nonomura (1988) ยังพบว่านอกจาก *Streptomyces* ที่พบในดินถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ชนิดของแอคติโนมัยสีทยังขึ้นอยู่กับปริมาณฮิวมัส และลักษณะของกรดฮิวมิก โดยในดินที่มีกรดฮิวมิกสูงจะพบ *Microbispora* และ *Streptosporangium* ส่วนดินที่มีกรดฮิวมิกต่ำจะพบ *Saccharomonospora*

แอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส แต่สามารถพบแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง โดยพบได้ทั่วไปในดินหลายประเภท และในเศษซากพืชที่เน่าเปื่อยและสะสมมาเป็นเวลานาน รวมทั้งวัสดุจากธรรมชาติบริเวณที่มีความร้อนสูง เช่น กองปุ๋ยหมัก มูลสัตว์ ฟางหรือหญ้าแห้ง ขานอ้อย และเมล็ดพืช เป็นต้น (Cross, 1968; Nolan and Cross, 1988)

ค่าพีเอชที่แอคติโนมัยสีทสามารถเจริญได้อยู่ในช่วงระหว่าง 5.0–9.0 โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติโนมัยสีทจะอยู่ในช่วงที่เป็นกลาง (Basilio, et al., 2003) นอกจากนี้แอคติโนมัยสีทสามารถเจริญได้ในสภาพที่เป็นกรด มีค่าพีเอชระหว่าง 3.5–6.5 โดย ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญในสภาพที่กรดจะอยู่ในช่วงระหว่าง 4.5-5.5 และสามารถพบแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ในสภาพของดินที่เป็นด่างมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงระหว่าง 8.0-9.0 (Khan and William, 1975)

การแยกแอคติโนมัยสีทเพื่อการคัดเลือก

การแยกแอคติโนมัยสีทจากดินเพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ จำเป็นต้องลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งทำได้โดยการเติมสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา หรือควบคุมองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Porter, 1960)

องค์ประกอบของอาหารที่ควบคุมการเจริญของแอคติโนมัยสีทประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยแอคติโนมัยสีทสามารถใช้ D-glucose, D-mannose, starch, dextrin และ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Pridham and Gottlieb, 1948)

El-Nakeeb และ Lechevalier (1963) ใช้อาหารที่มี arginine เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วน Hsh และ Lockwood (1975) ใช้ colloidal chitin 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการแยกแอคติโนมัยสีท

การเติมสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา เป็นวิธีหนึ่งในการแยกแอคติโนมัยสีท โดย Crook และคณะ (1950) ใช้วิธีเติม sodium propionate 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Dulaney และ คณะ (1955), Corke และ Chase (1956) ใช้สารปฏิชีวนะ cyclohexamide เติมลงในอาหารที่ใช้แยกแอคติโนมัยสีท เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

Porter และคณะ (1960) ใช้ทั้ง nystatin และ cycloheximide อย่างละ 50 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร จะยับยั้งการเจริญของเชื้อราในดิน ไม่มีผลต่อการเจริญของแอคติโนมัยสีท ส่วน Ottow (1972) พบว่าถ้าใส่ rose bengal 350 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 ลิตร จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและลดการเจริญของเชื้อรา

Athalye, Lacey และ Goodfellow (1981) ใส่ rifampicin 5 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร และ novobiocin 25 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ส่วน Takizawa, Colwell และ Hill (1993) ใส่ nalidixic 10 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร สามารถลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียอื่นๆ ได้

Shain และ Ugur (2003), Srivibool และคณะ (2004), Thakur และคณะ (2007), Ceylan, Okmen และ Ugur (2008) ใช้อาหาร actinomycetes isolation agar ซึ่งมี sodium propionate, sodium caseinate และ asparagines เป็นส่วนผสมในการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินพื้นที่ทางการเกษตร บริเวณรอบรากพืช บริเวณป่า และบริเวณชายฝั่ง ซึ่งลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเชื้อรา

การเตรียมตัวอย่างดินก่อนนำไปแยกแอคติโนมัยสีทเป็นอีกวิธีที่ลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งกระตุ้นการงอกของสปอร์ที่อยู่ในระยะสงบ (dormant spore) ซึ่งการเตรียมตัวอย่างดินมีอยู่หลายวิธีดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 การเตรียมตัวอย่างดินก่อนนำไปแยกแอคติโนมัยสีท

การเตรียมตัวอย่างดิน	เอกสารอ้างอิง
ทางกายภาพ	
- ผึ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-30 วัน	Xu and Jiang, 1996
- ให้ความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที	Seong, Choi and Baik, 2001
- ให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที	Sirivibool *et al.*, 2004
- ให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง	Seong, Choi and Baik, 2001, Sirivibool *et al.*, 2004
- ให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที	Athalye, Lacey and Goodfellow, 1981

ตาราง 1 (ต่อ)

การเตรียมตัวอย่างดิน	เอกสารอ้างอิง
- นำไป centrifuge ที่ 4500 rpm เป็นเวลา 1 นาที	Ho and Ko, 1980
ทางเคมี	
- Phenol 1.5 เปอร์เซ็นต์	Seong, Choi and Baik, 2001
- $CaCO_3$ ในอัตราส่วน 10 : 1 w/w	Shain and Ugur, 2003
- NaCl 0.9 เปอร์เซ็นต์	Thakur *et al.*, 2007
ทางกายภาพร่วมกับทางเคมี	
- $CaCO_3$ ในอัตราส่วน 10 : 1 w/w และให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง	Ceylan, Okmen and Ugur, 2008

สารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีท

สารปฏิชีวนะ (antibiotics) เป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา ยีสต์ แอคติโนมัยสีท และแบคทีเรีย มีคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพต่างจากสารปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ขึ้น (Waksman, 1944) สารปฏิชีวนะถูกค้นพบเป็นจำนวนมากในช่วงปี พ.ศ. 2513 แต่ลดจำนวนลงในช่วงปลายปี พ.ศ. 2523 - 2533 ซึ่งสาเหตุในการลดจำนวนของสารปฏิชีวนะมาจากการลดความพยายามในการคัดเลือกสารปฏิชีวนะ (Saadoun and Gharaibeh, 2003)

สารปฏิชีวนะประมาณ 2 ใน 3 หรือประมาณกว่า 4,000 ชนิดของสารปฏิชีวนะที่พบในธรรมชาติมาจากแอคติโนมัยสีท ซึ่งถูกนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น aminoglycosides, anthracyclines, chloramphenicol, β-lactams, macrolides และ tetracyclines เป็นต้น (Okami and Hotta, 1988, pp. 33-34)

ในปี พ.ศ. 2537 สารปฏิชีวนะที่ได้จากแอคติโนมัยสีทมีประมาณ 8,000 ชนิด มาจาก *Streptomyces* มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีท (Tanaka and Omura, 1990) โดยแอคติโนมัยสีทที่อยู่ในดินสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของสารปฏิชีวนะที่ได้จากแหล่งธรรมชาติอื่นๆ (Okami and Hotta, 1988)

Moncheva และคณะ (2000) พบว่าอัตราส่วนของสารปฏิชีวนะที่ได้จาก non-streptomycete actinomycetes (rare actinomycetes) เพิ่มขึ้นถึง 30-50 เปอร์เซ็นต์ของแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ

การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีทเริ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของระยะการเจริญที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential phase) ใน batch culture (Malik and Vining, 1970) ซึ่งอาจผลิตในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีสารอาหารอยู่น้อย ทำให้เจริญช้าและมีอัตราการเจริญ (growth rate) ต่ำ มีการผลิตสารปฏิชีวนะได้ ซึ่งในสภาพธรรมชาติการผลิตสารปฏิชีวนะอาจเป็นประโยชน์ต่อการอยู่รอด เนื่องจากมีอาหารจำกัดสำหรับการเจริญ (Gottlieb, 1976) สารปฏิชีวนะบางชนิดเช่น edeine, bacitracin, gramicidin, tyrocidines, และ polymyxins เกิดขึ้นในขณะที่มีการสร้าง endospore แต่ในแอคติโนมัยสีทจีนัส *Streptomyces* การสร้างสารปฏิชีวนะบางชนิดเกิดขึ้นในขณะที่มีการสร้างโคนิเดีย ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการสร้างสปอร์ หรือเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดในช่วงระยะการงอกของสปอร์ (Demain and Pirct, 1979)

องค์ประกอบของอาหารโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน มีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่ง Pandey, Shukla และ Majumdar (2005) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณสารปฏิชีวนะมากที่สุดคือ Dextrose 2 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาเป็น maltose, sucrose และ soluble starch ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณสารปฏิชีวนะมากที่สุดคือ $(NH_4)H_2PO_4$ 0.68 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาเป็น yeast extract, peptone และ $NaNO_3$ และพบอีกว่าการเจริญของแอคติโนมัยสีทไม่มีความสัมพันธ์กับการสร้างสารปฏิชีวนะ สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยหนึ่งโดยอาหารที่มีความเป็นด่างจะให้สารปฏิชีวนะในปริมาณที่สูง

การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ

แอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญ หรือทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นเช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยสีทอื่นๆ จากการศึกษาเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ดิน สังเกตพบบริเวณรอบๆ โคโลนีของแอคติโนมัยสีทมีบริเวณใส (clear zone) ที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งเกิดจากแอคติโนมัยสีทผลิตสารที่เป็นพิษที่เรียกว่า "สารปฏิชีวนะ" ในบางครั้งการทดสอบสารจากแอคติโนมัยสีทแสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบในจานเพาะเชื้อ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปรากฏว่าไม่สร้างสารปฏิชีวนะ (Waksman, 1950, p. 107)

การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทสำหรับสร้างสารปฏิชีวนะมีวิธีที่รวดเร็วและมีความไว ซึ่งแบ่งการคัดเลือกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (primary screening) มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาระดับความสามารถของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ทดสอบ เพื่อใช้ในการตัดสินใจเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีท ส่วนขั้นตอนที่สองเป็นการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ (secondary screening) มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของแอคติโนมัยสีทในการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของอาหารแตกต่างกัน สำหรับวิธีที่

ใช้ในการคัดเลือกแอคติโนมัยสีทในขั้นปฐมภูมินิยมใช้วิธี streak plate ซึ่งวิธีนี้จะขีดเชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นเส้นตรงไว้ตรงกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4-7 วัน จากนั้นนำจุลินทรีย์ทดสอบขีดจากขอบของแอคติโนมัยสีทไปยังขอบของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ส่วนวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวที่อยู่ในฟลาสก์ และเก็บตัวอย่างในวันที่ 3, 5 และ 7 ของการเลี้ยงมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ (Emerson, et al., 1946)

การทดสอบสารปฏิชีวนะในขั้นทุติยภูมิหลังจากเลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลว นิยมใช้วิธี agar plate diffusion ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ แบบที่ 1 เรียกว่า agar blocks วิธีนี้จะใช้แท่งทรงกระบอกปลายเปิด (cylindrical pieces) เจาะชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง นำชิ้นวุ้นที่ได้ไปวางบนอาหารแข็งในจานอาหารที่มีการลงจุลินทรีย์ทดสอบ นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง เพื่อให้สารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีทที่อยู่ในชิ้นวุ้นแพร่สู่อาหารแข็งในจานอาหาร จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ สังเกตบริเวณใส แบบที่ 2 เรียกว่า well diffusion วิธีนี้ใช้ cork borer เจาะอาหารแข็งในจานอาหารที่ลงจุลินทรีย์ทดสอบแล้วให้เป็นหลุม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และรองก้นหลุมด้วย water agar จากนั้นนำอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงแอคติโนมัยสีทที่นำปั่นแยกแอคติโนมัยสีทออกหยดลงในหลุม นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง เพื่อให้สารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยสีทที่อยู่อาหารเหลวแพร่สู่อาหารแข็งในจานอาหาร จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ สังเกตบริเวณใส (Nedialkova and Naidenova, 2004) แบบที่ 3 disc diffusion วิธีนี้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Beer และ Sherwood (1945) เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบความไว (sensitivity) ของสารปฏิชีวนะต่อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยใช้หยดสารปฏิชีวนะลงบนกระดาษกรองวงกลมผึ่งให้แห้ง นำไปวางบนอาหารแข็งที่อยู่ในจานเพาะเชื้อที่ได้ลงจุลินทรีย์ทดสอบไว้แล้ว ซึ่ง Loo, Skell และ Thornberry (1945) ได้นำวิธีนี้ไปใช้ในการทดสอบความไวของสารปฏิชีวนะ streptomycin ต่อ *Bacillus subtilis*

ลักษณะทั่วไปของมัยโคแบคทีเรีย

มัยโคแบคทีเรีย (Mycobacteria) อยู่ในจีนัส *Mycobacterium* ซึ่งเป็นจีนัสเดียวของแฟมิลี่ Mycobacteriaceae และจัดอยู่ในกลุ่ม aerobic actinomycetes เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง มีขนาดประมาณ 0.2-0.6 x 1-10 ไมโครเมตร เซลล์อาจมีการเรียงตัวเป็นสายยาวและมีการแตกกิ่งได้ ไม่สามารถเคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ผนังเซลล์ประกอบด้วยกรด mycolic ซึ่งเป็นสารไขมัน

ในปริมาณที่สูง ทำให้ย้อมติดสีแกรมได้ยาก มักเห็นการติดสีไม่สม่ำเสมอ มีลักษณะคล้ายจุดขนาดไม่เท่ากันเรียงต่อกัน (beaded rod) และอาจเห็นรูปร่างเซลล์ที่ไม่ติดสี (ghost cell) ด้วยคุณสมบัติทนต่อการล้างสีด้วยกรด การย้อมสีแบบทนกรดจึงสามารถช่วยให้ตรวจพบเชื้อได้ เชื้อมัยโคแบคทีเรียมีอัตราการเจริญช้ากว่าแบคทีเรียทั่วไป มีระยะเวลาแบ่งตัว (generation time) ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงจนนานกว่า 20 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปแบ่งเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ดังนี้ (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549, หน้า 327-329)

1. *Mycobactrium tuberculosis* complex เชื้อในกลุ่มนี้พบอาศัยเฉพาะในคน และจัดเป็นเชื้อก่อโรคมีอัตราการเจริญช้า และต้องใช้เวลาเพาะเชื้อนาน 4-8 สัปดาห์จึงสามารถเห็นโคโลนีได้บนอาหารวุ้น เชื้อในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อ *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* และ *M. microti*

2. Non-tuberculous mycobacteria (NTM) ได้แก่เชื้อมัยโคแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากกลุ่ม *M. tuberculosis* complex ส่วนใหญ่พบอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อม แต่หลายชนิดสามารถก่อโรคในคนได้ สามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามระบบของ Ruyon's classification ดังนี้

2.1 เชื้อกลุ่มที่มีอัตราการเจริญช้า (slow-grower mycobacteria) ต้องใช้เวลาในการเพาะเชื้อนานกว่า 7 วันจึงสามารถเห็นโคโลนีบนอาหารวุ้นได้ บางชนิดอาจใช้เวลานานถึง 4-8 สัปดาห์ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามความสามารถในการสร้างเม็ดสีคือ

2.1.1 Photochromogen (Runyon group I) สามารถสร้างเม็ดสีสีเหลืองส้มเฉพาะเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในที่มีแสง เช่นเชื้อ *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae* และ *M. asiaticum*

2.1.2 Scotochromogen (Runyon group II) สามารถสร้างเม็ดสีได้เมื่อเจริญอยู่ทั้งในที่มืดและที่มีแสง เช่นเชื้อ *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. szulgai* และ *M. gordonae*

2.1.3 Non-photochromogen (Runyon group III) ไม่สามารถสร้างเม็ดสีได้ไม่ว่าเจริญอยู่ในที่มืดหรือที่มีแสง เช่นเชื้อ *M. avium* complex (MAC), *M. ulcerans*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. malmoense* และ *M. celatum*

2.2 เชื้อกลุ่มที่มีอัตราเจริญเร็ว (rapid-grower mycobacteria หรือRunyon group IV) สามารถเห็นโคโลนีบนอาหารวุ้นได้ภายใน 7 วัน เช่นเชื้อในกลุ่ม *M. fortuitum-chelonae* complex (เช่นเชื้อ *M. fortuitum*, *M. chelonae* และ *M. abscessus*) และ *M. smegmatis*

นอกจากนี้ยังมีเชื้อ *M. leprae* (เชื้อก่อโรคเรื้อน) ซึ่งมีคุณสมบัติและลักษณะการก่อโรคที่ต่างจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น ๆ และไม่สามารถเพาะเชื้อได้ด้วยอาหารเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการ จึงไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มตามระบบดังกล่าว

จากรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี พ.ศ. 2540 มีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 7.96 ล้านคน เป็นผู้ป่วยวัณโรคปอด 3.52 ล้านคน และมีผู้ตายด้วยวัณโรค 1.87 ล้านคน (Dye, et al., 1999) และในปี พ.ศ. 2551 สถานการณ์วัณโรคในปัจจุบัน 1 ใน 3 ของประชากรทั่วโลกติดเชื้อวัณโรคแล้ว มีผู้ป่วยวัณโรคประมาณ 14.4 ล้านคน ครึ่งหนึ่งเป็นกลุ่มที่กำลังแพร่เชื้อ และในแต่ละปีมีผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 9.15 ล้านคน โดยร้อยละ 95 อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา มีผู้เสียชีวิตด้วยวัณโรคปีละประมาณ 1.65 ล้านคน โดยร้อยละ 98 อยู่ในประเทศที่ยากจน และจากการจัดอันดับกลุ่มประเทศที่มีปัญหาวัณโรค 22 ประเทศ พบว่าประเทศอินเดียมีปัญหาวัณโรคมากที่สุด รองลงมาคือ จีนและอินโดนีเซีย สำหรับประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับที่ 18 มีผู้ป่วยวัณโรคประมาณ 125,000 คน เป็นผู้ป่วยรายใหม่ปีละ 90,000 คน และประมาณ 40,000 คนเป็นผู้ป่วยที่เสมหะบวก เสียชีวิตปีละ 13,000 คน จากการเฝ้าระวังการดื้อยาของวัณโรคในปี พ.ศ. 2549 พบผู้ป่วยวัณโรครายใหม่มีเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multi-drug resistant TB: MDR-TB) ร้อยละ 1.6 และในปี พ.ศ. 2550 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล รายงานการพบผู้ป่วยวัณโรคจำนวน 13 คน ติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง (extensively drug resistant TB: XDR-TB) (ปราชญ์, 2551)

สารต้านมัยโคแบคทีเรีย

วัณโรคเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งมีผู้ติดเชื้อกระจายไปทั่วโลก เป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุข ปัจจุบันได้มีความพยายามลดจำนวนผู้ติดเชื้อ โดยการรักษาทางเคมีบำบัด (chemotherapy) ซึ่งในอดีตใช้ยาปฏิชีวนะ streptomycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะตัวแรกที่ใช้ในการรักษาวัณโรค ถูกค้นพบโดย Waksman ในปี พ.ศ. 2437 แต่การรักษาด้วย streptomycin เพียงอย่างเดียวก่อปัญหาทำให้เชื้อมีการดื้อต่อยา ทำให้การรักษาไม่ได้ผล ต่อมาในปี พ.ศ. 2493 มีการค้นพบยาสำหรับใช้รักษาวัณโรคคือ isoniazid (INH) และ pyrazinamide (PZA) ในการรักษา วัณโรคต้องใช้เวลาอย่างน้อย 6 เดือน และต้องใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน การรักษาที่ไม่ครบตามกำหนดเวลาได้ก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยา ทำให้ยากต่อการรักษา (Mckinney, 2000)

การใช้จุลินทรีย์สำหรับเป็นแหล่งผลิตสารปฏิชีวนะต้านมัยโคแบคทีเรีย เป็นความคิดที่เกิดขึ้นมานาน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2428 Cantani เป็นคนแรกที่ใช้ saprophytic bacteria ในการต่อสู้กับ

วัณโรค มี saprophytic และ phathogenic microorganism หลายชนิดที่สามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของ *M. tuberculosis* ซึ่งสารเหล่านี้รู้จักกันในชื่อของ "สารปฏิชีวนะ" ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 สารปฏิชีวนะที่ได้จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการรักษาวัณโรค

เชื้อรา	แอคติโนมัยสีท	แบคทีเรีย
Aspergillic acid	Actinomycin	Ayfivin
Aspergillin	Anti-smegmatis factor	Bacillin
Biformin	Litmocidin	Endosubstilisin
Clitocybine	Mycomycin	Esperin
Diploicin	Neomycin	Eumycin
Enniatin	Nocardin	Gramicidin
Gliotoxin	Streptin	Licheniformin
Helvolic acid (Fumigacin)	Streptothricin	Micrococcin
Javanicin	Streptomycin	Nisin
Lactaroviolin	Mannosidostreptomycin	Polypic acid
Lateritiin		Subtilin
Mycocidin		
Nebularin		
Polyporin		
Usnic acid		
Ustin		

ที่มา: Waksman, 1950

การค้นพบสารปฏิชีวนะต้านมัยโคแบคทีเรียเพื่อใช้ในการรักษาวัณโรคระหว่างปี พ.ศ. 2515 – 2541 มีเพียง 8 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะต้านจุลินทรีย์อื่น และในปี พ.ศ. 2548 ได้ลดจำนวนลงเหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ (Berdy, 2005)

สารปฏิชีวนะต้านมัยโคแบคทีเรียอาจได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และจากธรรมชาติ เช่น พืชสมุนไพรพื้นเมือง และแบคทีเรีย โดยเฉพาะแอคติโนมัยสีท ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 สารปฏิชีวนะต้านมัยโคแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ

แหล่งของสารปฏิชีวนะต้านมัยโคแบคทีเรีย	ชื่อสาร/ชื่อชนิด	เอกสารอ้างอิง
การสังเคราะห์ทางเคมี	thiocarlide	Phetsuksiri, et al., 1999
	N-Octanesulfonylacetamide	Parrish, et al., 2001
	Bis-arylsulfonamide	Wilkinson, et al., 2007
พืช	*Strobilanthes cusia*	Mitscher and Baker, 1998
	Euclea natalensis	Kooy, Meyer and Lall, 2006
	Lantana hispida	Arellanes et al., 2007
	Evodia elleryana	Barrows, et al., 2007
	Salvia chamelaeagnea	Kamatou, et al., 2007
แบคทีเรีย	*Staphylococcus epidermidis*	Fregnan and Smith, 1962
	Streptomyces sp.	Gordon, Kelly and Miller, 1962
	Streptomyces griseus var. *erizensis*	Reusser, 1967
	Streptomyces hygroscopicus subsp. *hiwasaensis*	Kamogashira, Nishida and Sugawara, 1983
	Actinomadura sp.	Ciciliato, et al., 2004
	Nocardia sp.	Pucci, et al., 2004