

ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท *Streptomyces* sp. PM-R01 ที่แยกได้จากทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองในจังหวัดจันทบุรี

Antibacterial activity of endophytic actinomycetes, *Streptomyces* sp. PM-R01, isolated from native durian varieties in Chanthaburi province

วิญญู ปักดี^{1*} และ จิรภัทร จันทมาลี²

Winyou Puckdee^{1*} and Jirapat Chanthamalee²

Received: 12 July 2024 ; Revised: 9 August 2024 ; Accepted: 10 September 2024

บทคัดย่อ

ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียส่งผลกระทบต่อทั่วโลก ขณะเดียวกันสถานการณ์ระดับโลกพบว่าการค้นพบยาชนิดใหม่ๆ มีอัตราที่น้อยลง หนึ่งในแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพัฒนาเป็นยาได้มาจากเชื้อกลุ่มแอกติโนมัยซีท วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองในจังหวัดจันทบุรีที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดได้ และระบุชนิดของแอกติโนมัยซีทนั้น วิธีการศึกษาประกอบด้วยการแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากเนื้อเยื่อทุเรียนด้วยการฆ่าเชื้อที่พื้นผิว จากนั้นทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธีการขีดขวางและเลือกแอกติโนมัยซีทที่มีฤทธิ์ดีที่สุดสำหรับสกัดสารสกัดหยาบเพื่อใช้หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (MIC และ MBC) ด้วยวิธี Broth microdilution และทำการระบุชนิดแอกติโนมัยซีทด้วยการศึกษาฐานพันธุกรรมและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ผลการวิจัยพบว่าสามารถแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท โดยมีเฉพาะเชื้อไอโซเลท PM-R01 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* TISTR 2372 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้และมีระยะยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 14.33 ± 2.33 และ 13.00 ± 1.00 mm ตามลำดับ หลังการสกัดสารสกัดหยาบพบว่าสารสกัดมีค่า MIC มากกว่า 1,024 $\mu\text{g/ml}$ และที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98 เมื่อทำการระบุชนิดพบว่าเชื้อไอโซเลท PM-R01 มีความคล้ายกับเชื้อ *Streptomyces ardesiacus* NRRL B-1773^T ที่ร้อยละ 99.65 ผลการวิจัยทั้งหมดสรุปได้ว่าเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ซึ่งคล้ายกับเชื้อ *Streptomyces ardesiacus* มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาและพัฒนาสารสกัดหยาบของเชื้อนี้เพิ่มเติมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คำสำคัญ: เอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีท, ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย, ทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง, จันทบุรี, *Streptomyces ardesiacus*

Abstract

Background: The emergence of antibiotic-resistant bacteria poses a global health crisis, exacerbated by the declining rate of novel antibiotic discovery. Actinomycetes, bacteria renowned for producing diverse bioactive compounds, offer a promising source of potential drug leads. **Objective:** This study aimed to isolate and identify endophytic actinomycetes from native durian (*Durio zibethinus* L.) cultivars in Chanthaburi Province, Thailand, to evaluate their antibacterial activity. **Methods:** Endophytic actinomycetes from durian tissue were isolated using surface sterilization. Antibacterial activity was assessed through a Perpendicular streak method.

¹ อาจารย์, สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี 22000

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์, สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี 22000

¹ Lecturer, Division of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000

² Assistant Professor, Division of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000

* Corresponding author: Winyou Puckdee, Division of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Mueang, Chanthaburi 22000 Email: winyou.p@rbru.ac.th

The most effective isolate underwent crude extract preparation and determination of MIC and MBC values against test bacteria via broth microdilution. Identification of the active isolate was conducted using morphological traits and 16S rRNA gene sequencing. **Results:** Ten isolates of endophytic actinomycetes were obtained from native durian varieties in Chanthaburi Province, Thailand. Among these, only isolate PM-R01 exhibited antibacterial activity against *Bacillus cereus* TISTR 2372 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, with average inhibition zones of 14.33 ± 2.33 mm and 13.00 ± 1.00 mm, respectively. The MIC of PM-R01 crude extract was above 1,024 $\mu\text{g/ml}$. At this concentration, the extract achieved 98% bacterial kill. The identification of PM-R01 revealed 99.65% similarity to *Streptomyces ardesiacus* NRRL B-1773^T. **Conclusion:** These findings suggest that PM-R01 is *Streptomyces ardesiacus* as a promising source for antibacterial agents. Further studies are needed to elucidate the extract's composition and evaluate PM-R01's efficacy against a broader range of microorganisms.

Keywords: Endophytic actinomycete, antibacterial activity, native durian varieties, Chanthaburi Province, *Streptomyces ardesiacus*

บทนำ

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียหลาย ๆ ชนิดเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อทั่วโลก เป็นปรากฏการณ์ที่ทั้งเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติและเกิดจากความกดดันจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสม ปัจจุบันสามารถพบเชื้อที่สามารถดื้อยาปฏิชีวนะได้มากกว่า 2 กลุ่ม ซึ่งหากไม่สามารถควบคุมหรือชะลอการดื้อยาได้อาจทำให้วงการสาธารณสุขมีลักษณะเหมือนย้อนกลับไปสู่ยุคก่อนการพบยาปฏิชีวนะได้ ทำให้เกิดปัญหาใหญ่กับระบบสาธารณสุขจนอาจถึงกับเป็นความล้มเหลวของระบบสาธารณสุขในอนาคตได้ (World Health Organization, 2022) ขณะเดียวกันสถานการณ์ระดับโลกพบว่ายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ (ยาตัวใหม่ ๆ) ถูกค้นพบได้ในอัตราที่น้อยลงมาก (Ventola, 2015) จนไม่ทันต่อการต่อสู้กับเชื้อที่ดื้อยา ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างมากที่จะต้องหาสารและแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ เพื่อแก้ไขหรือลดความรุนแรงของสถานการณ์การดื้อยานี้ โดยสารออกฤทธิ์เหล่านี้ต้องมีประสิทธิภาพในการรักษาทดแทนยาปฏิชีวนะชนิดเดิมที่มีเชื้อดื้อยาไปแล้ว

แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษามาก เนื่องจากสามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ได้ในจำนวนมาก (Bérdy, 2005) และมักเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compound) มีฤทธิ์ต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial) ต้านมะเร็ง (Anticancer) ต้านการอักเสบ (Anti-Inflammatory) หรือแม้แต่ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เป็นต้น แอคติโนมัยซีทมักพบในดินและในระบบนิเวศต่าง ๆ เช่น ในดินรอบรากพืชในน้ำจืด ในน้ำทะเล ในถ้ำ นอกจากนี้ยังพบได้ภายในเนื้อเยื่อสัตว์หรือเนื้อเยื่อพืชโดยในเนื้อเยื่อพืชสามารถพบได้จากส่วนราก เหง้า ต้น กิ่ง ใบ หรือแม้แต่ในส่วนของผล เรียกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่พบในเนื้อเยื่อพืชและไม่ก่ออันตรายต่อเนื้อเยื่อ

ของพืชว่าเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท (Endophytic actinomycetes) ซึ่งสามารถแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์และสามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีประโยชน์ได้ (Wink et al., 2017)

จากอดีตถึงปัจจุบันมีรายงานการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทในดินอย่างแพร่หลายมาก ซึ่งยากที่จะพบเชื้อชนิดใหม่หรือสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทจากพืชในท้องถิ่น ประกอบกับทุเรียนเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกมากในจังหวัดจันทบุรี และยังมี การปลูกทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองด้วย ซึ่งมีลักษณะเด่นคือทั้งแข็งแรง ทนต่อโรค อายุยืน ทนต่อสภาพอากาศและศัตรูพืช และจากการศึกษารายงานการแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากพืชพบว่ายังมีผู้ที่สนใจแยกเชื้อจากทุเรียนไม่มาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดจันทบุรี และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในมนุษย์บางชนิด

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. การแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากใบ กิ่ง และรากของทุเรียนพันธุ์กระปุกทองดี นกหยิบ และพวงมณี ด้วยวิธี Surface sterilization

นำตัวอย่างชิ้นส่วนใบ กิ่ง และรากของทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บจากอำเภอลอง อำเภอมะนัง และอำเภอกาฬสินธุ์ จังหวัดจันทบุรี พันธุ์ละ 5 ตัวอย่าง จากนั้นล้างตัวอย่างด้วยน้ำประปา 1 ครั้ง และล้างต่อด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตัดตัวอย่างให้ได้ขนาดประมาณ 1.0×1.0 cm แล้วแช่ตัวอย่างในสารละลาย 0.1% (v/v) Tween 20 นาน 1 นาที แช่ใน 70% (v/v) Alcohol นาน 5 นาที แช่ใน 6% (v/v) Sodium hypochlorite นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 น้ำๆ ละ 30 วินาที และแช่ใน 10% (w/v) Sodium

bicarbonate นาน 10 นาที ตามลำดับ แล้วผึ่งตัวอย่างให้แห้งบนผ้าขาวบางปลอดเชื้อ นำน้ำกลั่นที่ใช้ล้างชิ้นตัวอย่างน้ำที่สามปริมาตร 200 µl เกลี่ยลงบนอาหาร International *Streptomyces* Project-2 agar (ISP-2 agar) (Shirling & Gottlieb, 1966) และนำชิ้นตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวแล้ว ป้ายบนอาหาร ISP-2 agar เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อที่พื้นผิว ซึ่งไม่ควรมีเชื้อใดๆ เจริญ จากนั้นวางชิ้นตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวแล้วลงบนอาหาร Humic acid vitamin (HV) agar (Otoguro *et al.*, 2001) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ สังเกตการเจริญของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทรอบชิ้นเนื้อเยื่อพืช ซึ่งมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร ISP-2 agar และเก็บเชื้อในรูปแบบของสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อที่บริสุทธิ์ใน 20% (v/v) Glycerol ที่อุณหภูมิ -70 °C

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการขีดขวาง (Perpendicular streak method)

นำเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้ขีดลงบนอาหาร Muller hinton agar (MHA) โดยใช้พื้นที่ 1 ใน 4 ส่วนของเพลต บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นานอย่างน้อย 3 วัน หรือนานกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ และเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบก่อนวันทดสอบ 24 ชั่วโมง ได้แก่เชื้อ *B. cereus* TISTR 2372, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753 ในอาหาร Nutrient broth (NB) จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยสารละลาย 0.85 % (w/v) NaCl โดยให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standards No. 0.5 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml จากนั้นใช้ไม้พันสำลีขนาดมาตรฐานปลอดเชื้อชุบเชื้อทดสอบ แล้วขีดตั้งฉากห่างจากรอยขีดของเชื้อแอคติโนมัยซีท 0.5 cm โดยขีดยาวประมาณ 4 cm บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) ส่วนชุดควบคุมมีเฉพาะเชื้อทดสอบเท่านั้น

3. การสกัดสารสกัดหยาบจากเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุดจำนวน 1 ไอโซเลท Streak ให้เต็มผิวหน้าอาหาร ISP-2 agar จำนวน 200 เพลต บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นานจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ จากนั้นตัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญด้วยใบมีดให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก ใส่ลงในโหลแก้วให้ได้ประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของโหล แล้วเติมตัวทำละลาย Ethyl acetate ให้ท่วมชิ้นวัน ปิดฝาให้แน่น แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มากรองผ่านสำลีและกระดาษกรอง Whatman

No. 1 แล้วนำไปประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator ให้เหลือแต่สารสกัดหยาบ ทำการชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดหยาบ

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท

4.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (Minimal inhibitory concentration, MIC)

ทำการทดลองตามมาตรฐานของ CLSI (2018) เริ่มจากเตรียมสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยละลายให้สมบูรณ์ด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และเตรียมให้ได้ความเข้มข้นเป็น 2 ถึง 2,048 µg/ml โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton broth (MHB) ใน 96 well plate ปริมาตร 100 µl ต่อหลุม จากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหาร MHB ให้มีความเข้มข้นเป็น 2×10^5 CFU/ml และเติมลงในแต่ละหลุมปริมาตร 100 µl จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 1 ถึง 1,024 µg/ml ตามลำดับ โดยมีปริมาตรรวมเป็น 200 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ยา Gentamicin ในช่วงความเข้มข้น 0.015625 ถึง 16.00 µg/ml เป็นชุดควบคุมบวก (Positive control) และใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 5 (v/v) เป็นชุดควบคุมลบ (Negative control) สังเกตการเจริญของเชื้อในแต่ละหลุม หากเชื้อเจริญจะทำให้อาหารขุ่น โดยหลุมที่ใส (ไม่ขุ่น) หลุมใดมีความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุด ให้รายงานค่าความเข้มข้นของหลุมนั้นเป็นค่า MIC ในหน่วย µg/ml ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Minimal bactericidal concentration, MBC) และค่าร้อยละของการฆ่าเชื้อของสารสกัดหยาบ

หลังหาค่า MIC แล้ว ทำการดูดสารแขวนลอยของเชื้อทดสอบในทุกหลุมที่ไม่ขุ่นปริมาตรหลุมละ 10 µl แล้วทำการเกลี่ยลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) แต่หากขุ่นทั้งหมดให้ใช้ทุกหลุมที่มีสารสกัดหยาบเข้มข้นสูงสุดแทน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเจริญเป็นโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยสารแขวนลอยจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญเป็นโคโลนีหลุมใดมีความเข้มข้นของสารสกัดต่ำสุดให้รายงานความเข้มข้นของหลุมนั้นเป็นค่า MBC ในหน่วย µg/ml แต่หากพบการเจริญเป็นโคโลนีให้นับจำนวนโคโลนีแล้วทำการคำนวณหาค่าร้อยละของความสามารถในการฆ่าเชื้อของสารสกัดหยาบในความเข้มข้นนั้นๆ แล้วรายงานค่า MBC ของความเข้มข้นนั้นๆ พร้อมค่าร้อยละของความสามารถในการฆ่าเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกโดยเตรียมสไลด์ด้วยวิธี Slide culture

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ต้องการศึกษาที่ด้านข้างทั้ง 4 ด้านของอาหาร ISP-2 agar รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดด้านละ 0.5 cm ซึ่งวางบนสไลด์แก้วแล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ วางทั้งหมดในงานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อพร้อมสำลีให้ความชื้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C สังเกตการเจริญของเชื้อหรือจนกว่าเชื้อจะสร้างสปอร์ จากนั้นนำกระจกปิดสไลด์ออกแล้วนำด้านที่มีเชื้อวางบนหยดสี Lactophenol cotton blue ตรงกลางของสไลด์แผ่นใหม่ นำสไลด์ไปสังเกตลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมบันทึกภาพและใส่สเกลในภาพเพื่ออ้างอิงขนาด

6. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และการสร้าง Phylogenetic tree เพื่อระบุชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ต้องการศึกษาในอาหาร ISP-2 broth สังเกตการเจริญของเชื้อเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยการต้มตามวิธีของ Cook and Meyers (2003) แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ Primer 27F (5'-GAGTT TGATCCTGGCTCAG-3') และ 1525R (5'-AAGGAGG TGATCCAGCC-3') (Chun & Goodfellow, 1995) ใช้อุณหภูมิ Denaturation เป็น 94 °C นาน 30 วินาที ใช้อุณหภูมิ Annealing เป็น 56 °C นาน 30 วินาที และใช้อุณหภูมิ Extension เป็น 72 °C นาน 1 นาที 45 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยการทำให้ Gel electrophoresis ผลผลิต PCR ที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา GenepHlow™ PCR Cleanup Kit (Geneaid, Taiwan) แล้วตรวจสอบผลผลิต Purified PCR โดยการทำให้ Gel electrophoresis อีกครั้ง จากนั้นนำผลผลิต Purified PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ที่บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ Primer ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ 27F, 692F, 800R และ 1492R นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาประกอบรวมลำดับให้สมบูรณ์ แล้ววิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank และ EzBioCloud เพื่อให้ทราบถึงสกุลและชนิดที่ใกล้เคียงของเชื้อแอคติโนมัยซีท จากนั้นนำผลที่ได้จากการ BLAST มาสร้าง Phylogenetic tree

ด้วยโปรแกรม MEGA v7.0 ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ) และใช้ค่า Bootstrap เป็น 1000

ผลการศึกษา

1. เชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากใบ กิ่ง และรากของทุเรียนพันธุ์กระปุกทองดี นกหยิบ และพวงมณี ที่ผ่านการทำ Surface sterilization

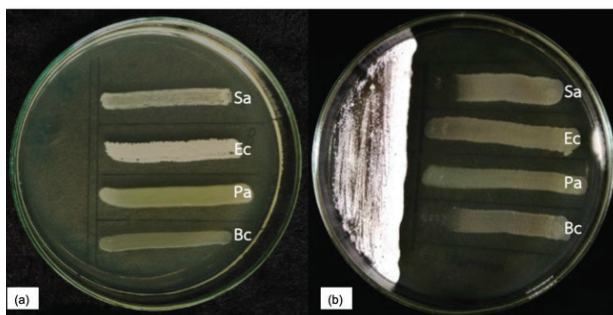
การแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากใบ กิ่ง และรากของทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ กระปุกทองดี นกหยิบ และพวงมณี ที่ผ่านการทำ Surface sterilization บนอาหาร HV agar พบเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทเจริญออกจากเนื้อเยื่อของทุเรียนซึ่งเป็นเส้นใยและสปอร์ขนาดเล็กมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาว เหลือง เทา หรือสีชมพู สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท โดยได้จากพันธุ์พวงมณีและกระปุกทองดีจำนวน 7 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ แต่ไม่สามารถแยกได้จากพันธุ์นกหยิบ ซึ่งได้จากกิ่งของพันธุ์พวงมณีมากที่สุดจำนวน 4 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 40 แสดงใน Table 1 ลักษณะของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีททั้งหมดมี Aerial hyphae เป็นสีขาวหรือสีเทา Substrate hyphae ทั้งหมดมีสีเหลืองอ่อน สปอร์มีทั้งสีขาว เทา และดำ ส่วนโคโลนีมีสีขาวและเหลืองอ่อน

2. ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธีการขีดขวาง (Perpendicular streak method)

เมื่อนำเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีททั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิด กลุ่มแกรมบวก ได้แก่ เชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 กลุ่มแกรมลบ ได้แก่ เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 28753 ด้วยวิธีขีดขวาง พบเชื้อเพียงไอโซเลทเดียว คือ PM-R01 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ แสดงใน Figure 1 โดยมีระยะการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 อยู่ในช่วง 13.00 ถึง 16.00 mm ค่าเฉลี่ยคือ 14.33 ± 2.33 mm และมีระยะการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 อยู่ในช่วง 12.00 ถึง 14.00 mm ค่าเฉลี่ยคือ 13.00 ± 1.00 mm แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 28753 ได้ ดังนั้นจึงเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

Table 1 The endophytic actinomycetes were isolated from leaf, branch and root of native durian varieties (Krapookthongdee, Nokyib and Phuangmanee) by surface sterilization technique.

Native durian varieties	Part of plant			Total
	Leaf	Branch	Root	
Krapookthongdee	KP- L01	KP- S02	KP- R01	3
Nokyib	-	-	-	0
Phuangmanee	PM-L01	PM-S01	PM-R01	7
	PM-L02	PM-S02		
		PM-S03		
		PM-S04		
Total	3	5	2	10

**Figure 1** Preliminary screening for antibacterial activity.

Control was the plate without actinomycetes (a) and 7-day-old endophytic actinomycetes (PM-R01) against *S. aureus* ATCC 25923 (Sa), *E. coli* ATCC 25922 (Ec), *P. aeruginosa* ATCC 28753 (Pa), and *B. cereus* TISTR 2372 (Bc) by Perpendicular streak method (b).

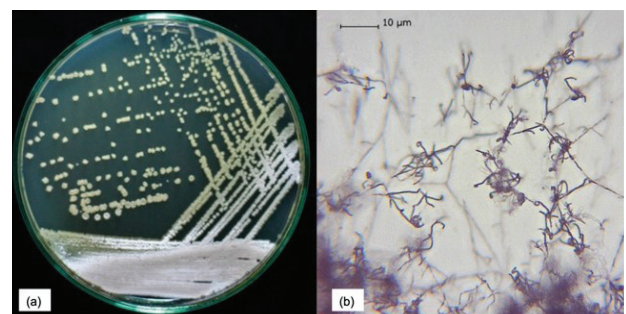
3.ฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 ของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01

นำเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 มาทำการสกัดให้ได้สารสกัดหยาบโดยใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย หลังการสกัดพบว่าได้สารสกัดหยาบเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม เมื่อนำมาเจือจางและทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองในช่วงความเข้มข้น 1 – 1,024 µg/ml ได้ จึงระบุค่า MIC ได้ว่ามากกว่า 1,024 µg/ml แต่หลังจากถ่ายสารแขวนลอยของเชื้อที่มีสารสกัดหยาบความเข้มข้น 1,024 µg/ml ลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) แล้วทำการเกลี่ยเชื้อ พบว่าแบคทีเรียทดสอบเจริญได้ โดยพบโคโลนีของเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 อยู่ในช่วง 2 - 3 โคโลนี เฉลี่ย 2.67 ± 0.58 โคโลนี ส่วนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 พบโคโลนีอยู่ในช่วง 15 - 23 โคโลนี เฉลี่ย 18.00 ± 4.36

โคโลนี หลังนำจำนวนโคโลนีมาคำนวณหาค่าร้อยละของการฆ่าเชื้อสามารถระบุได้ว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,024 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ที่ร้อยละ 99.73 และ 98.20 ตามลำดับ หรือสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98 ภายหลังสัมผัสกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1,024 µg/ml (MBC มากกว่า 1,024 µg/ml)

4. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01

เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 พบว่าโคโลนีของเชื้อนี้เมื่ออายุน้อยมีสีเหลือง มีการสร้าง Substrate mycelium เป็นสีเหลืองและขาว และ Aerial mycelium เป็นสีเทา ดัง Figure 2(a) เมื่อสังเกตลักษณะเส้นใยของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสายสปอร์เรียงตัวแบบ Whorls และมีแขนงแบบ Umbels ที่เรียกว่า Verticillati แสดงใน Figure 2(b)

**Figure 2** Cultural and morphological characteristics of the endophytic actinomycete isolate PM-R01. Cultural characteristic of isolate PM-R01 on ISP-2 agar after 7 days (a). Microscopic characteristics of isolate PM-R01 observed through a light microscope (b).

5. ชนิดของเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 ที่ได้จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และการสร้าง Phylogenetic tree

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยการทำ PCR พบว่าได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 bp โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker และเมื่อส่งผลผลิต PCR ที่บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าได้นิวคลีโอไทด์จำนวน 1,522 เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปฝากไว้ในฐานข้อมูล Genbank ได้ Accession

number คือ LC381944 และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank และ EzBioCloud พบว่าเชื้อนี้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces ardesiacus* NRRL B-1773 (Type strain) ที่ร้อยละ 99.65 และเมื่อทำการสร้างและวิเคราะห์ Phylogenetic tree โดยใช้เชื้อ *Kitasatospora seate* KM 6054 (Type strain) เป็น Outgroup ได้ผลดัง Figure 3

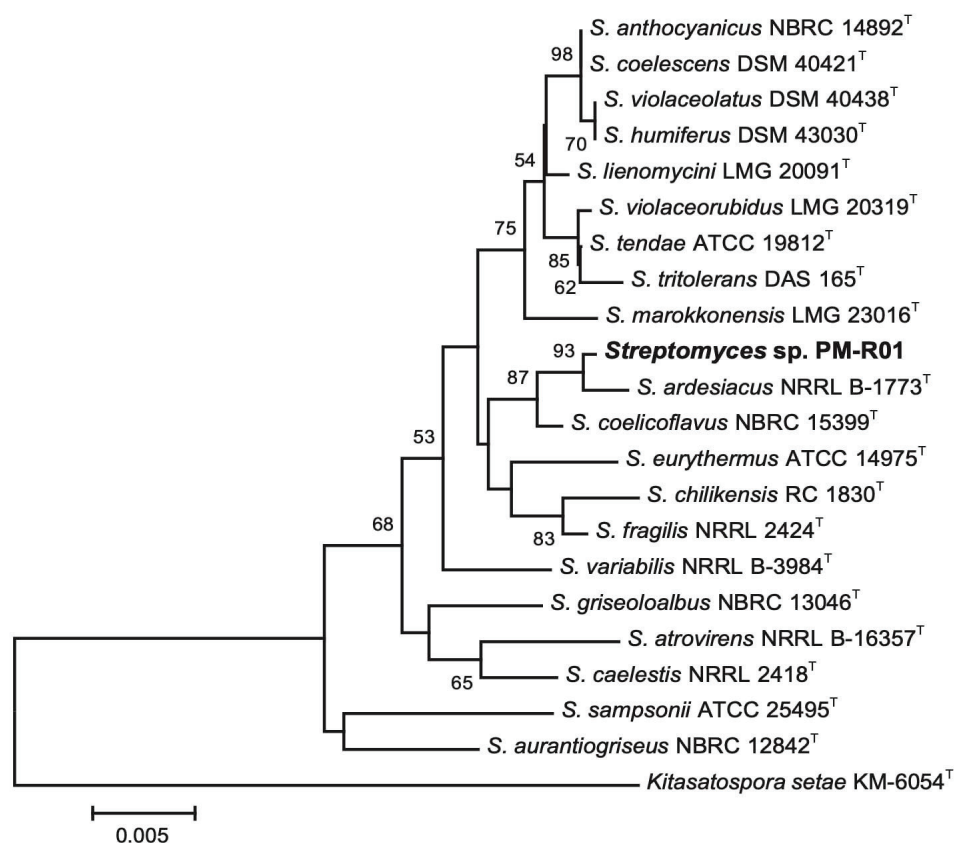


Figure 3 Phylogenetic tree based on nearly completed 16S rRNA gene sequences showing the relative positions of isolate PM-R01 and its closest type strains of *Streptomyces* species. The tree was constructed using the neighbour-joining (NJ) method. Bar indicates the nucleotide substitutions per site.

วิจารณ์และสรุปผล

การแยกเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดจันทบุรี ได้แก่พันธุ์กระปุกทองดี นกหยิบ และพวงมณี จากส่วนใบ กิ่ง และราก ด้วยการฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อเยื่อ และวางเนื้อเยื่อบนอาหาร HV agar พบว่าสามารถแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอกติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท โดยแยกได้จากพันธุ์พวงมณี จำนวน 7 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 70 ได้จากส่วนใบ 2 ไอโซเลท กิ่ง 4 ไอโซเลท และราก 1 ไอโซเลท ได้จากพันธุ์กระปุกทองดี จำนวน 3 ไอโซเลท

คิดเป็นร้อยละ 30 โดยได้จากแต่ละส่วน ๆ ละ 1 ไอโซเลท แต่ไม่สามารถแยกได้จากทุเรียนพันธุ์นกหยิบ โดยสรุปสามารถแยกเชื้อได้มากที่สุดจากกิ่งของพันธุ์พวงมณีจำนวน 4 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 40 และเพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้นั้นเป็นเชื้อเอนโดไฟต์จริงจึงตรวจสอบด้วยการนำน้ำกลั่นที่ใช้เป็นน้ำล้างเนื้อเยื่อน้ำที่ 3 จากการทำ Surface sterilization ปริมาตร 200 µl ทำการเกลี่ยบนอาหาร ISP-2 agar และการนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาป้ายหรือกลิ้งบนอาหาร ISP-2 agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ

ห้องเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งจากการทดลองไม่พบเชื้อใดๆ เจริญบนอาหารทดสอบ ทำให้เชื่อได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้นั้นเป็นเชื้อกลุ่มเอนโดไฟติกจริง (Mingma *et al.*, 2014) การวิจัยนี้ผู้วิจัยแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท์ได้ในจำนวนที่ไม่มาก ทั้งนี้เนื่องจากผู้วิจัยไม่ได้ทำการบดตัวอย่างเนื้อเยื่อของทุเรียนก่อนนำไปทำการแยกเชื้อบนอาหารที่เหมาะสม อย่างเช่นงานวิจัยของ Mingma *et al.* (2014) จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้เชื้อออกจากเนื้อเยื่อพืชได้ยากและทำให้ปริมาณเชื้อที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของทุเรียนน้อย

การแยกเชื้อที่ได้นั้นจำนวนที่ไม่มากนักคล้ายกับงานวิจัยของ Gos *et al.* (2017) ที่แยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท์จากพืชสมุนไพรชื่อ *Vochysia divergens* ในประเทศบราซิล ได้เชื้อจำนวน 10 ไอโซเลท และจัดอยู่ใน 8 สกุล ประกอบด้วยสกุล *Actinomadura* (2 ไอโซเลท), *Aeromicrobium*, *Microbacterium*, *Microbispora* (2 ไอโซเลท), *Micrococcus*, *Sphaerisorangium*, *Streptomyces* และ *Williamsia*

หลังทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในเบื้องต้น พบว่าเฉพาะเชื้อแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลท PM-R01 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ แต่ไม่มีไอโซเลทใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 28753 ซึ่งอาจเป็นเพราะแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นของ Peptidoglycan เพียงอย่างเดียวซึ่งไม่ซับซ้อนทำให้สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิที่เชื้อแอคติโนมัยซีท์สร้างขึ้นผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ง่าย ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าที่ประกอบด้วยชั้น Outer membrane, Periplasmic space และ Peptidoglycan ซึ่งกันหรือขัดขวางไม่ให้สารต่างๆ เข้าสู่เซลล์ได้ง่าย (Madigan *et al.*, 2009) โดยผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท์ในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taechowisan *et al.* (2017) ที่แยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท์จากต้นกระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A.) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25932, *B. cereus* ATCC 7064 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้เช่นกัน หรือกรณีที่แยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท์จากต้นกระเทียม (*Zingiber zerumbet* (L.) Smith) คือเชื้อ *Streptomyces zerumbet* W14 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 และ Methicillin Resistance *S. aureus* (MRSA) Sp6 (Clinical isolate) เช่นกัน (Taechowisan *et al.*, 2019)

เมื่อทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลท PM-R01 โดยใช้ Ethyl acetate

เป็นตัวทำละลาย เนื่องจาก Ethyl acetate เป็นสารอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารขั้วกลางซึ่งจะสามารถดึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้วกลางด้วยกันออกมาได้มากและง่ายต่อการระเหยตัวทำละลายออก (Asmah *et al.*, 2020; Darya *et al.*, 2022) จากนั้นทำการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยวิธี Broth microdilution จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบนี้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ได้ในช่วงความเข้มข้น 1 ถึง 1,024 µg/ml จึงสรุปได้เพียงว่าสารสกัดหยาบนี้สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ได้โดยมีค่า MIC มากกว่า 1,024 µg/ml ส่วนค่า MBC ของสารสกัดหยาบนี้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,024 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ที่ร้อยละ 99.73 และ 98.20 ตามลำดับ เท่านั้น คือยังพบโคโลนีของเชื้อทั้ง 2 ชนิด (พบโคโลนีของเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 อยู่ในช่วง 2 - 3 โคโลนี ส่วนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 พบโคโลนีอยู่ในช่วง 15 - 23 โคโลนี) และเนื่องจากการทดลองนี้ใช้เชื้อทดสอบเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1×10^5 CFU/ml ทำให้คำนวณจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตได้เท่ากับร้อยละ 0.27 และ 1.80 ตามลำดับ ซึ่งจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตเกินกว่าร้อยละ 0.1 จึงมีค่า MBC มากกว่า 1,024 µg/ml โดยอาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดหยาบนี้มีคุณสมบัติเป็นแบบ Bacteriostatic (Pankey & Sabath, 2004) และยังพบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบนี้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ได้น้อยกว่ายา Gentamicin เนื่องจากยาที่ความเข้มข้น 0.0625 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ที่ร้อยละ 100 ซึ่ง Gentamicin เป็นยาต้านแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มอะมิโนไกลัยโคไซด์ กลไกการออกฤทธิ์ของยานี้คือการเชื่อมต่อกับไรโบโซม (Ribosome) ที่หน่วยย่อย 30S ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดความผิดพลาดในการอ่านรหัสของทีอาร์เอ็นเอ (t-RNA) และทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนเพื่อการเจริญเติบโตได้ (Yoshizawa *et al.*, 1998)

หลังจากศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งจากลักษณะโคโลนี ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA การสร้างและวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ร่วมกับเชื้อใกล้เคียงที่เป็นเชื้อต้นแบบ (Type strain) ของเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีท์ไอโซเลท PM-R01 ทำให้ทราบว่าเชื้อนี้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* หรือ *Streptomyces ardesiacus* NRRL B-1773 (Type strain) ที่ร้อยละ 99.65 และเมื่อทำการสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมพบว่าเชื้อมีลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ตรงกันกับเชื้อแอคติโนมัยซีท์ *Streptomyces ardesiacus* NRRL B-1773 ที่ปรากฏในหนังสือ Bergey's manual of systematic

bacteriology Vol. 5 The Actinobacteria คือลักษณะโคโลนีของเชื้อนี้เมื่ออายุน้อยมีสีเหลือง มีการสร้าง Substrate mycelium เป็นสีเหลืองและขาว และ Aerial mycelium เป็นสีเทา ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีสายสปอร์เรียงตัวแบบ Whorls และมีแขนงแบบ Umbels ที่เรียกว่า Verticillati (Goodfellow *et al.*, 2012) จากการเทียบเคียงชนิดของเชื้อที่ได้พบในงานวิจัยนี้มีความแตกต่างไปจากงานวิจัยการคัดแยกเชื้อเอนโดไฟติกแบคทีเรียจากเปลือกของผลทุเรียนของ Suhandono *et al.* (2014) ที่แยกเชื้อได้จำนวน 16 ไอโซเลท แบ่งได้เป็นหลายกลุ่มและหนึ่งในนั้นเป็นเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีท พบจำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งผลจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Gordonia terrae*, *Brachybacterium rhamnsum* และ *Kocuria kristinae* แต่ไม่พบเชื้อสกุล *Streptomyces* เลย

งานวิจัยทั้งหมดนี้สรุปได้ว่าสามารถแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองในจังหวัดจันทบุรีได้ โดยได้เชื้อแอคติโนมัยซีทจากรากของทุเรียนพันธุ์พวงมณีที่มีความคล้ายกับเชื้อ *Streptomyces ardesiacus* ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ และสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1,024 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98 ดังนั้นจึงบอกได้ว่าเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซีทไอโซเลท PM-R01 มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้ และควรนำเชื้อนี้ไปศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราอื่นๆ เพิ่มเติม หรือยับยั้งเชื้อไวรัส ยับยั้งเชื้อกลุ่มปรสิต ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ หรือยับยั้งเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์ α -glucosidase, α -amylase, Nitric oxide synthase หรือ Cyclooxygenase หรืออาจนำไปศึกษาถึงความเป็นพิษของสารสกัดหยาบกับเซลล์ปกติ และควรทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีในสารสกัดหยาบเพื่อให้ทราบถึงชนิดและโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ต่างๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ปีงบประมาณ 2566 ขอขอบคุณคณาจารย์เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยเฉพาะนางสาวนิตยา วรรณจนา และนายวาทีน ลิ้มประยูร ขอขอบคุณเจ้าของสวนทุเรียนที่ให้ความอนุเคราะห์เนื้อเยื่อทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรวิ วัชรจริยกุล ภาควิชาเคมี ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมี ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ปฏิบัติการ และขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จาวรรณ เมตตากุล พิทักษ์ ภาควิชาเคมี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจแก้ไขบทความ

เอกสารอ้างอิง

- Asmah, N., Suniarti, D. F., Margono, A., Mas'ud, Z. A., & Bachtiar, E. W. (2020). Identification of active compounds in ethyl acetate, chloroform, and *N*-hexane extracts from peels of *Citrus aurantifolia* from Maribaya, West Java, Indonesia. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 11(3), 107-112.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1-26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Chun, J., & Goodfellow, M. (1995). A Phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), 240-245.
- CLSI. (2018). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI Standard M07* (11th ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cook, A. E., & Meyers, P. R. (2003). Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 1907-1915.
- Darya, M., Abdolrasouli, M. H., Yousefzadi, M., Sajjadi, M. M., Sourinejad, I., & Zarei, M. (2022). Antifouling coating based on biopolymers (PCL/PLA) and bioactive extract from the sea cucumber *Stichopus hermanni*. *AMB Express*, 12, 1-12, Article 24. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01364-3>
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer New York.
- Gos, F. M. W. R., Savi, D. C., Shaaban, K. A., Thorson, J. S., Aluizio, R., Possiede, Y. M., . . . Glienke, C. (2017). Antibacterial activity of endophytic actinomycetes isolated from the medicinal plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-17, Article 1642. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01642>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock biology of microorganisms* (12th ed.). Pearson/Benjamin Cummings.

- Mingma, R., Pathom-aree, W., Trakulnaleamsai, S., Thamchaipenet, A., & Duangmal, K. (2014). Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from *Leguminosae* plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 271-280. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1451-9>
- Otoguro, M., Hayakawa, M., Yamazaki, T., & Imura, Y. (2001). An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineospora* spp. in soil and plant litter. *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 118-130. [https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01372.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01372.x)
- Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864-870. <https://doi.org/10.1086/381972>
- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(3), 313-340. [https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313](https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313)
- Suhandono, S., & Utari, I. B. (2014). Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from durian arillus (*Durio zibethinus* Murr.) var. Matahari. *Microbiology Indonesia*, 8(4), 161-169. <https://doi.org/10.5454/mi.8.4.3>
- Taechowisan, T., Chaisaeng, S., & Phutdhawong, W. S. (2017). Antibacterial, antioxidant and anticancer activities of biphenyls from *Streptomyces* sp. BO-07: an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A. *Food and Agricultural Immunology*, 28(6), 1330-1346. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1339669>
- Taechowisan, T., Puckdee, W., & Phutdhawong, W. S. (2019). *Streptomyces zerumbet*, a novel species from *Zingiber zerumbet* (L.) Smith and isolation of its bioactive compounds. *Advances in Microbiology*, 9(3), 194-219. <https://doi.org/10.4236/aim.2019.93015>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pt*, 40(4), 277-283.
- Wink, J., Mohammadipanah, F., & Hamed, J. (2017). *Biology and biotechnology of actinobacteria*. Springer International Publishing.
- World Health Organization. (2022). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>
- Yoshizawa, S., Fourmy, D., & Puglisi, J. D. (1998). Structural origins of gentamicin antibiotic action. *The EMBO Journal*, 17(22), 6437-6448-6448. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6437>