บทที่ 4

ผลการทดลอง

การแยกแอคติโนมัยสีท

จากตัวอย่างดินที่เก็บตามป่าของ 5 จังหวัด ในประเทศไทยจำนวน 21 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น ตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติศรีสัชนาลัย จังหวัดสุโขทัย จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างดินจากจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 7 ตัวอย่าง ตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างดินจากจังหวัดน่าน จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินจากจังหวัดพิษณุโลก จำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 137 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน 14 ตัวอย่าง ส่วนอีก 7 ตัวอย่างไม่พบแอคติโนมัยสีท แสดงในตาราง 4

ตาราง 4 จำนวนแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้
ตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติศรีสัชนาลัย จังหวัดสุโขทัย	
SS1	25
SS2	-
SS3	-
ตัวอย่างดินจากจังหวัดเชียงใหม่	
CM1	5
CM2	6
CM3	3
CM4	-
CM5	4
CM6	1
CM7	6

ตาราง 4 (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้
ตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา	
KY1	3
KY2	3
KY3	-
ตัวอย่างดินจากจังหวัดน่าน	
NN1	3
NN2	-
NN3	-
ตัวอย่างดินจากจังหวัดพิษณุโลก	
PL1	11
PL2	3
PL3	41
PL4	23
PL5	-

การทดสอบการเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารสำหรับใช้เลี้ยงแอคติโนมัยสีท

อาหารสำหรับเลี้ยงแอคติโนมัยสีทที่ใช้ทดสอบมีจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ Nutrient Agar (NA), Actinomycete Isolation Agar (AIA), Bennett's medium, Emerson Agar, Glucose Asparagine Agar, Yeast-Extract Glucose Medium, Yeast-Extract Malt-Extract Agar (ISP2) และ Mueller-Hinton Agar เมื่อนำมาศึกษาการเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารแข็งเหล่านี้ พบว่า *M. smegmatis* สามารถเจริญได้บนอาหารทั้ง 8 ชนิด แต่ขนาดโคโลนีของ *M. smegmatis* มีความแตกต่างกันตามชนิดของอาหารที่ใช้ทดลอง แสดงในตาราง 5 และ ภาพ 1

โดย *M. smegmatis* สามารถเจริญดีบนอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium โดยมีขนาดโคโลนีใหญ่กว่าในอาหารชนิดอื่น ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองสามารถเจริญได้ดีในอาหารชนิดนี้ ดังนั้นจึงคัดเลือกอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็ง

i.A5936 99 c.2
สำนักหอสมุด
23 ก.ค. 2552

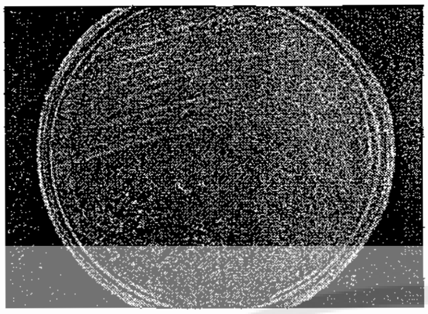
ตาราง 5 การเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเวลา 3 วัน

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญของโคโลนี *M. smegmatis*
Nutrient Agar	+
Actinomycete Isolation Agar	+
Bennett's medium	++
Emerson Agar	++
Glucose Asparagine Agar	++
Yeast-Extract Glucose Medium	+++
Yeast-Extract Malt-Extract Agar	++
Mueller-Hinton Agar	++

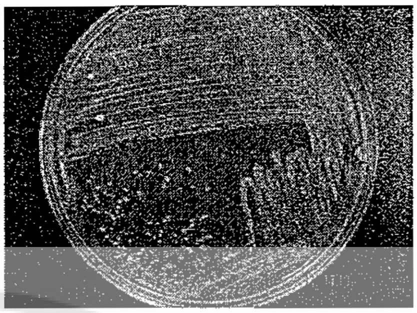
หมายเหตุ: +++ = เจริญดี

++ = เจริญปานกลาง

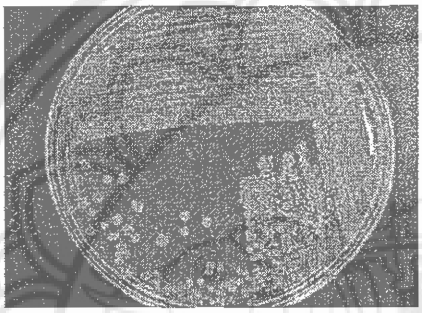
\+ = เจริญน้อย



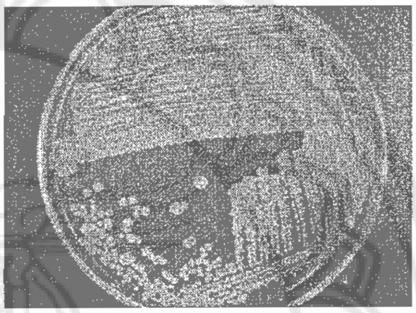
Nutrient Agar (NA)



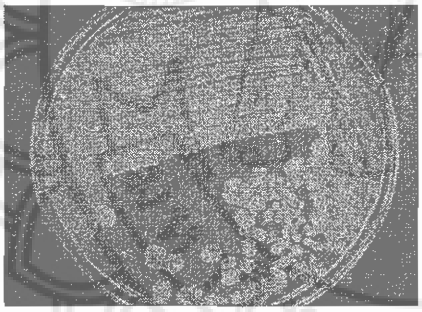
Actinomycete Isolation Agar (AIA)



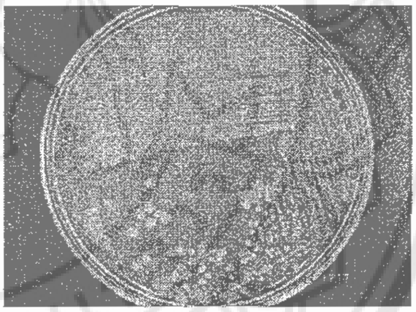
Bennett's medium



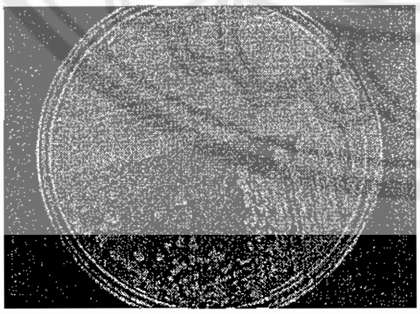
Emerson Agar



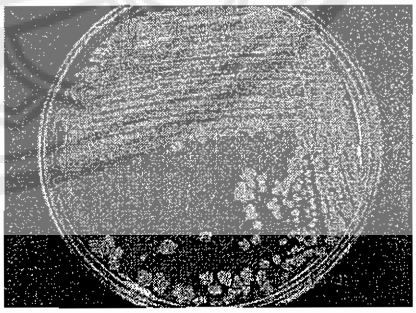
Glucose Asparagine Agar



Yeast-Extract Glucose Medium



Yeast-Extract Malt-Extract Agar



Mueller-Hinton Agar

ภาพ 1 การเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารชนิดต่าง ๆ

การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีทขั้นปฐมภูมิจำนวน 137 ไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 14 ตัวอย่าง พบว่ามี 46 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 33.6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่แยกได้ สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติโนมัยสีทบางไอโซเลทยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบชนิดอื่น โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* มี 15 ไอโซเลท ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* มี 12 ไอโซเลท ยับยั้ง *B. subtilis* มี 48 ไอโซเลท ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* มี 46 ไอโซเลท และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* มี 26 ไอโซเลท โดยคิดเป็น 10.9, 8.6, 35.0, 33.6 และ 18.9 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่แยกได้ ตามลำดับ (ตาราง 6, 7) ทั้งนี้แอคติโนมัยสีททั้ง 137 ไอโซเลทสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้ง 6 ชนิด มีจำนวน 8 ไอโซเลท ยับยั้งได้ 5 ชนิด มีจำนวน 4 ไอโซเลท ยับยั้งได้ 3 ชนิด มีจำนวน 12 ไอโซเลท ยับยั้งได้ 3 ชนิด มีจำนวน 10 ไอโซเลท ยับยั้ง ได้ 2 ชนิด มีจำนวน 14 ไอโซเลท ยับยั้งได้ 1 ชนิด มีจำนวน 20 ไอโซเลท และไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ มีจำนวน 69 ไอโซเลท โดยคิดเป็น 5.8, 2.9, 8.8, 7.3, 10.2, 14.6, และ 50.4 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่แยกได้ ตามลำดับ (ตาราง 8)

ตาราง 6 การทดสอบขั้นปฐมภูมิของแอคติโนมัยสีทจำนวน 137 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบบนอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

รหัสเชื้อ	จุลินทรีย์ทดสอบ					
	M. smegmatis	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*
SS1-1	+	-	-	-	-	-
SS1-2	-	-	-	-	-	-
SS1-3	+	-	-	-	+	+
SS1-4	+	-	-	-	-	-
SS1-5	-	-	-	-	-	-
SS1-6	+	-	-	+	-	+
SS1-7	-	-	-	-	-	-
SS1-8	-	-	-	-	-	-

ตาราง 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	จุลินทรีย์ทดสอบ					
	M. smegmatis	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*
SS1-9	+	-	-	-	+	-
SS1-10	-	-	-	-	-	-
SS1-11	-	-	-	-	-	-
SS1-12	+	-	-	+	+	+
SS1-13	-	-	-	-	-	-
SS1-14	+	+	+	+	+	+
SS1-15	+	-	-	+	+	+
SS1-16	+	-	-	+	+	+
SS1-17	+	+	-	+	+	-
SS1-18	-	-	-	-	-	-
SS1-19	+	+	-	+	-	-
SS1-20	+	-	-	-	-	-
SS1-21	-	-	-	-	-	-
SS1-22	-	-	-	-	+	-
SS1-23	-	-	-	-	-	-
SS1-24	-	-	-	+	-	-
SS1-25	-	-	-	+	+	-
CM1-1	+	-	-	+	-	-
CM1-2	-	-	-	-	-	-
CM1-3	+	-	-	-	+	-
CM1-4	-	-	-	+	+	-
CM1-5	-	-	-	-	-	-
CM2-1	-	-	-	-	-	-
CM2-2	-	-	-	-	-	-
CM2-3	-	-	-	-	-	-
CM2-4	+	-	-	-	-	-

ตาราง 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	จุลินทรีย์ทดสอบ					
	M. smegmatis	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*
CM2-5	-	-	-	-	-	-
CM2-6	+	-	-	-	+	-
CM3-1	-	-	-	+	+	-
CM3-2	+	-	-	-	-	-
CM3-3	-	-	-	-	-	-
CM5-1	-	-	-	-	-	-
CM5-2	-	-	-	-	-	-
CM5-3	+	-	-	+	+	+
CM5-4	+	-	-	+	+	+
CM6-1	-	-	-	-	-	-
CM7-1	+	-	-	-	-	-
CM7-2	+	-	-	+	-	-
CM7-3	-	-	-	-	-	-
CM7-4	-	-	-	-	-	-
CM7-5	-	-	-	-	-	-
CM7-6	-	-	-	-	-	-
KY1-1	+	-	-	+	+	+
KY1-2	+	-	-	-	-	-
KY1-3	-	-	-	-	-	-
KY2-1	-	-	-	+	+	-
KY2-2	+	+	-	+	+	-
KY2-3	-	-	-	-	-	-
NN1-1	+	-	-	+	+	-
NN1-2	-	-	-	-	+	-
NN1-3	-	-	-	-	-	-
PL1-1	-	-	-	-	-	-

ตาราง 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	จุลินทรีย์ทดสอบ					
	M. smegmatis	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*
PL1-2	+	-	-	-	+	-
PL1-3	-	-	-	-	-	-
PL1-4	-	-	-	-	-	-
PL1-5	+	-	-	-	-	-
PL1-6	+	+	+	+	+	+
PL1-7	-	-	-	-	-	-
PL1-8	-	-	-	-	-	-
PL1-9	-	-	-	-	-	-
PL1-10	+	-	-	-	+	-
PL1-11	-	-	-	-	-	-
PL2-1	-	-	-	-	-	-
PL2-2	-	-	-	-	-	-
PL2-3	-	-	-	-	-	-
PL3-1	+	-	-	+	+	+
PL3-2	+	-	-	-	-	-
PL3-3	-	-	-	-	-	-
PL3-4	-	-	-	-	-	-
PL3-5	-	-	-	-	-	-
PL3-6	-	-	-	+	-	-
PL3-7	-	-	-	-	-	-
PL3-8	-	-	-	-	-	-
PL3-9	-	-	-	+	+	-
PL3-10	-	-	-	+	+	-
PL3-11	-	-	-	+	-	-
PL3-12	-	-	-	-	-	-
PL3-13	+	+	+	+	+	+

ตาราง 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	จุลินทรีย์ทดสอบ					
	M. smegmatis	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*
PL3-14	-	-	-	-	-	-
PL3-15	-	-	-	-	-	-
PL3-16	-	-	-	+	+	+
PL3-17	+	-	-	+	+	+
PL3-18	-	-	-	-	-	-
PL3-19	-	-	-	-	-	-
PL3-20	-	-	-	-	-	-
PL3-21	-	-	-	-	-	-
PL3-22	-	-	-	+	+	+
PL3-23	+	-	-	+	+	-
PL3-24	+	-	-	+	+	-
PL3-25	+	+	+	+	+	+
PL3-26	-	+	+	+	+	+
PL3-27	-	+	+	+	+	+
PL3-28	-	-	-	-	-	-
PL3-29	+	-	-	+	+	+
PL3-30	-	-	-	-	-	-
PL3-31	-	-	-	-	-	-
PL3-32	+	-	-	-	-	-
PL3-33	-	-	-	-	-	-
PL3-34	-	-	-	-	-	-
PL3-35	-	-	-	+	+	-
PL3-36	+	+	+	+	+	-
PL3-37	+	+	+	+	+	+
PL3-38	+	+	+	+	+	+
PL3-39	+	+	+	+	+	+

ตาราง 6 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	จุลินทรีย์ทดสอบ					
	M. smegmatis	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*
PL3-40	-	-	-	+	+	-
PL3-41	-	-	-	-	-	-
PL4-1	+	+	+	+	+	+
PL4-2	-	-	-	-	-	-
PL4-3	-	-	-	+	-	-
PL4-4	+	-	-	+	+	-
PL4-5	-	-	-	-	-	-
PL4-6	-	-	-	-	-	+
PL4-7	-	-	-	-	-	-
PL4-8	-	-	-	-	-	-
PL4-9	-	-	-	+	-	-
PL4-10	-	-	-	-	-	-
PL4-11	-	-	-	-	-	-
PL4-12	-	-	-	-	-	-
PL4-13	-	-	-	-	-	-
PL4-14	-	-	-	-	-	-
PL4-15	-	-	-	-	-	-
PL4-16	-	-	-	+	-	-
PL4-17	+	-	-	-	-	-
PL4-18	-	+	+	+	+	+
PL4-19	+	-	-	+	+	+
PL4-20	-	-	-	-	-	-
PL4-21	-	-	-	-	-	-
PL4-22	-	-	-	-	-	-
PL4-23	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ+ = ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบใกล้แนวการเจริญของแอคติโนมัยสีท

\- = พบการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบใกล้แนวการเจริญของแอคติโนมัยสีท

ตาราง 7 จำนวนการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยการทดสอบขั้นปฐมภูมิของแอคติโนมัยสีทจำนวน 137 ไอโซเลท บนอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

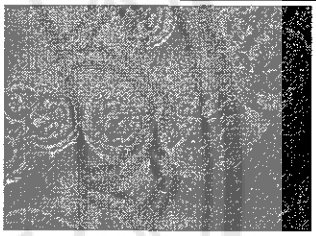
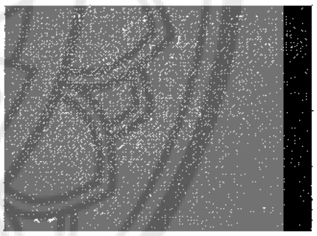
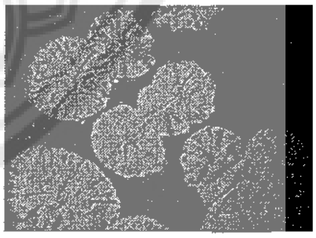
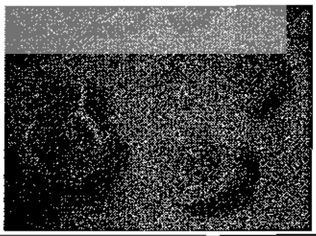
จุลินทรีย์ทดสอบ	จำนวนไอโซเลทของแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (%)
M. smegmatis	46 (33.6)
E. coli	15 (10.9)
P. aeruginosa	12 (8.6)
B. subtilis	48 (35.0)
S. aureus	46 (33.6)
C. albicans	26 (18.9)

ตาราง 8 จำนวนแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในการทดสอบขั้นปฐมภูมิ

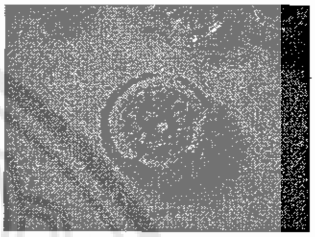
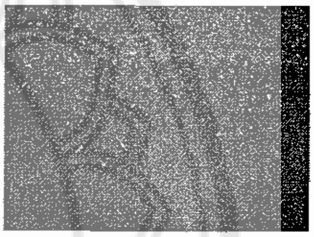
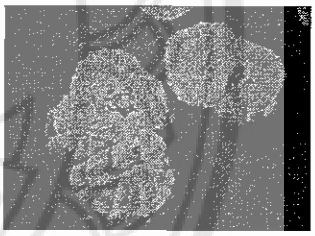
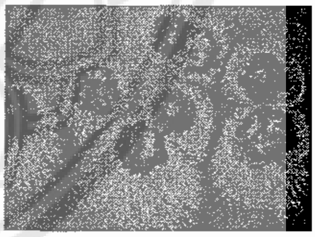
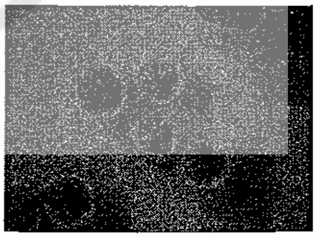
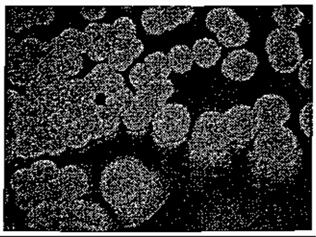
จำนวนจุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกยับยั้งการเจริญ (ชนิด)	จำนวนไอโซเลทของแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (%)
6	8 (5.8)
5	4 (2.9)
4	12 (8.8)
3	10 (7.3)
2	14 (10.2)
1	20 (14.6)
0	69 (50.4)

ในการทดสอบขั้นปฐมภูมิของแอคติโนมัยสีททั้ง 137 ไอโซเลทที่แยกได้ พบว่ามีจำนวน 46 ไอโซเลท หรือ 33.6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ได้ จึงนำมาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีลักษณะดังแสดงในตาราง 9

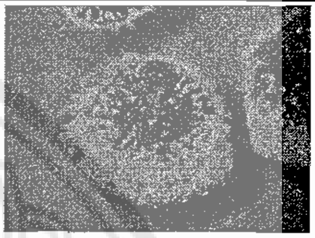
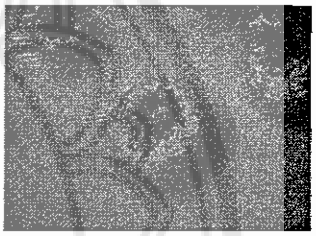
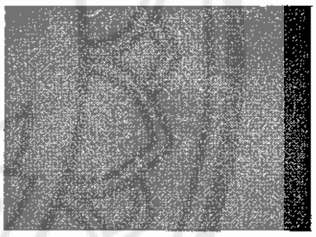
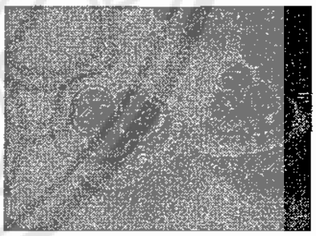
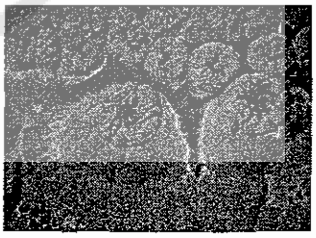
ตาราง 9 **ลักษณะของแอคติโนมัยสีทที่ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* จากการทดสอบขั้นปฐมภูมิ**

รหัสเชื้อ	ลักษณะของแอคติโนมัยสีท				
	สีของสปอร์	สีของเส้นใยที่เจริญในอาหาร	สีที่ละลายลงในอาหาร	เส้นใยอากาศ	ภาพโคโลนี
SS1-1	เทา	เหลือง	ไม่มี	มี	
SS1-3	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
SS1-4	ขาว	แดง	ม่วงแดง	มี	
SS1-6	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	

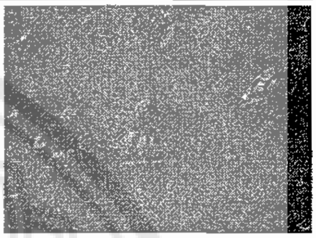
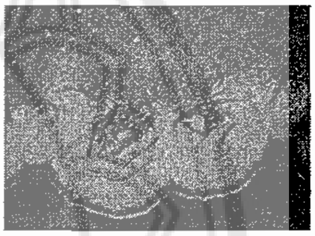
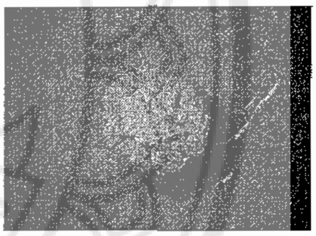
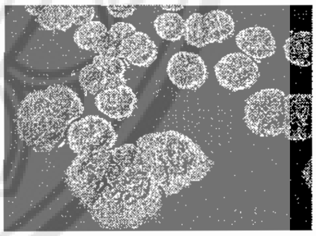
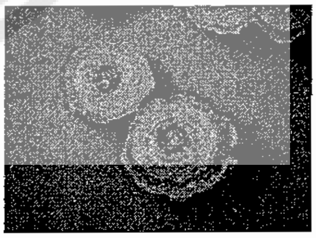
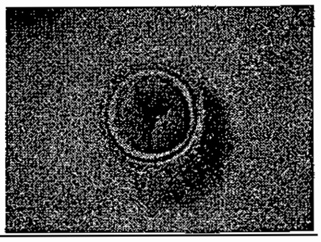
ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะของแอคติโนมัยสีท				
	สีของสปอร์	สีของเส้นใยที่เจริญในอาหาร	สีที่ละลายลงในอาหาร	เส้นใยอากาศ	ภาพโคโลนี
SS1-9	เทา	เหลือง	ไม่มี	มี	
SS1-12	ไม่มี	เหลือง	ไม่มี	ไม่มี	
SS1-14	ขาวอมม่วง	แดง	ม่วง	มี	
SS1-15	ขาว	ม่วง	ม่วง	มี	
SS1-16	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
SS1-17	ขาวอมม่วง	แดง	ม่วง	มี	

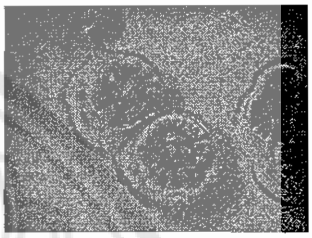
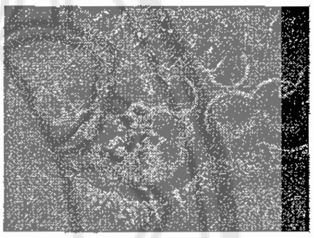
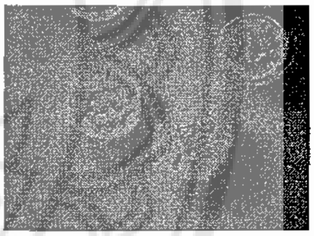
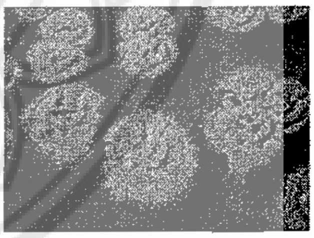
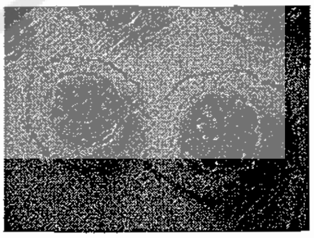
ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะของแอคติโนมัยสีท				
	สีของสปอร์	สีของเส้นใยที่เจริญในอาหาร	สีที่ละลายลงในอาหาร	เส้นใยอากาศ	ภาพโคโลนี
SS1-19	ขาว	เหลือง	เหลือง	มี	
SS1-20	ขาว	เหลือง	เหลือง	มี	
CM1-1	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
CM1-3	เทา	ดำ	ไม่มี	มี	
CM2-4	เทา	ดำ	ไม่มี	มี	
CM2-6	เทา	เหลือง	ไม่มี	มี	

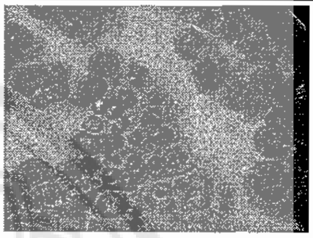
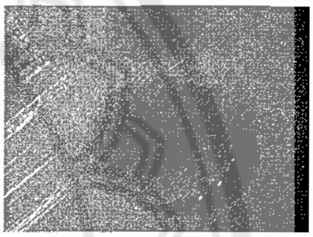
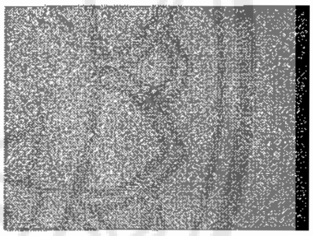
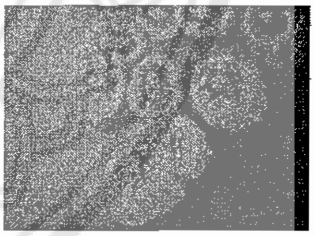
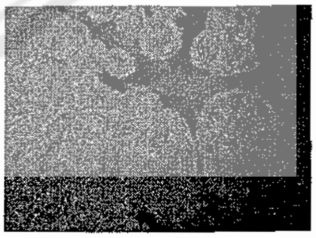
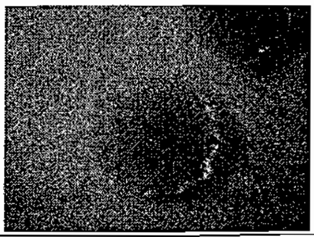
ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะของแอคติโนมัยสีท				
	สีของสปอร์	สีของเส้นใยที่เจริญในอาหาร	สีที่ละลายลงในอาหาร	เส้นใยอากาศ	ภาพโคโลนี
CM3-2	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
CM5-3	ขาว	เหลือง	เหลือง	มี	
CM5-4	ขาว	เหลือง	เหลือง	มี	
CM7-1	ขาว	แดง	แดงม่วง	มี	
CM7-2	ขาว	เหลือง	เหลือง	มี	
KY1-1	เทา	เหลือง	ไม่มี	มี	

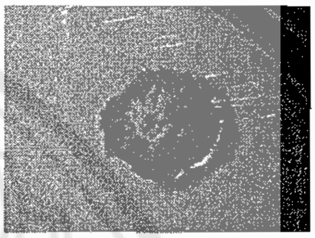
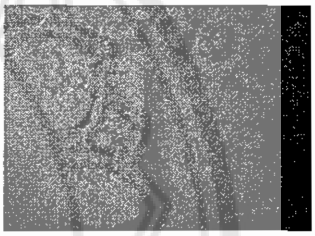
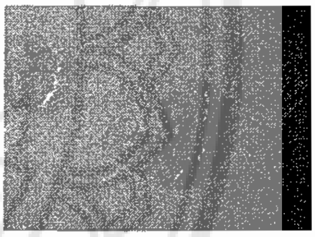
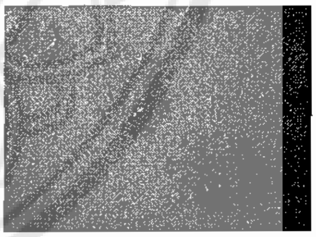
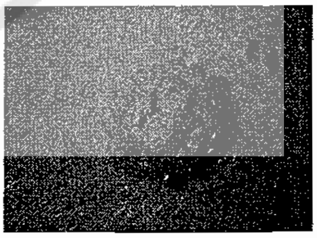
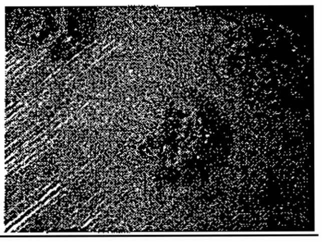
ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะของแอคติโนมัยสีท				
	สีของสปอร์	สีของเส้นใยที่เจริญในอาหาร	สีที่ละลายลงในอาหาร	เส้นใยอากาศ	ภาพโคโลนี
KY1-2	เทา	ดำ	ไม่มี	มี	
KY2-2	ขาว	ม่วงอ่อน	ม่วง	ใส	
NN1-1	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL1-2	ขาว	ส้ม	เหลืองแดง	มี	
PL1-5	เทา	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL1-6	เทา	เหลือง	ไม่มี	มี	

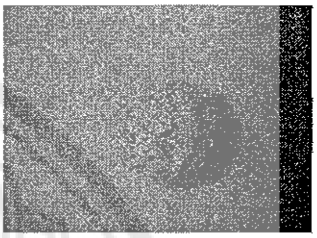
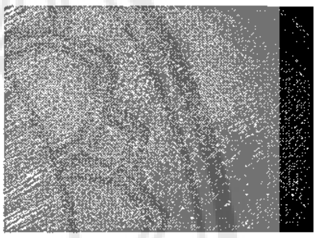
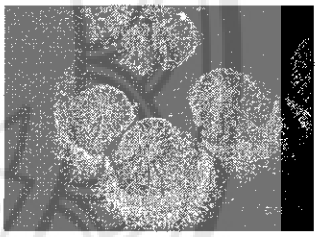
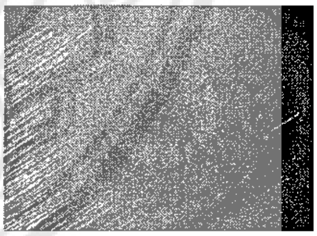
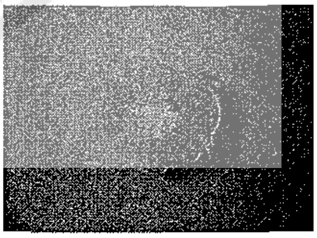
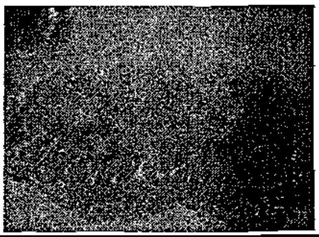
ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะของแอคติโนมัยสีท				
	สีของสปอร์	สีของเส้นใยที่เจริญในอาหาร	สีที่ละลายลงในอาหาร	เส้นใยอากาศ	ภาพโคโลนี
PL1-10	เทา	ดำ	ไม่มี	มี	
PL3-1	ขาว	ส้ม	ไม่มี	มี	
PL3-2	ไม่มี	เหลือง	ไม่มี	ไม่มี	
PL3-13	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL3-17	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL3-23	ไม่มี	เหลือง	ไม่มี	ไม่มี	

ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ลักษณะของแอคติโนมัยสีท				
	สีของสปอร์	สีของเส้นใยที่เจริญในอาหาร	สีที่ละลายลงในอาหาร	เส้นใยอากาศ	ภาพโคโลนี
PL3-24	ขาว	น้ำเงินม่วง	ไม่มี	มี	
PL3-25	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL3-29	ขาว	เหลืองอ่อน	ไม่มี	มี	
PL3-32	ไม่มี	ครีม	ไม่มี	ไม่มี	
PL3-36	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL3-37	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	

ตาราง 9 (ต่อ)

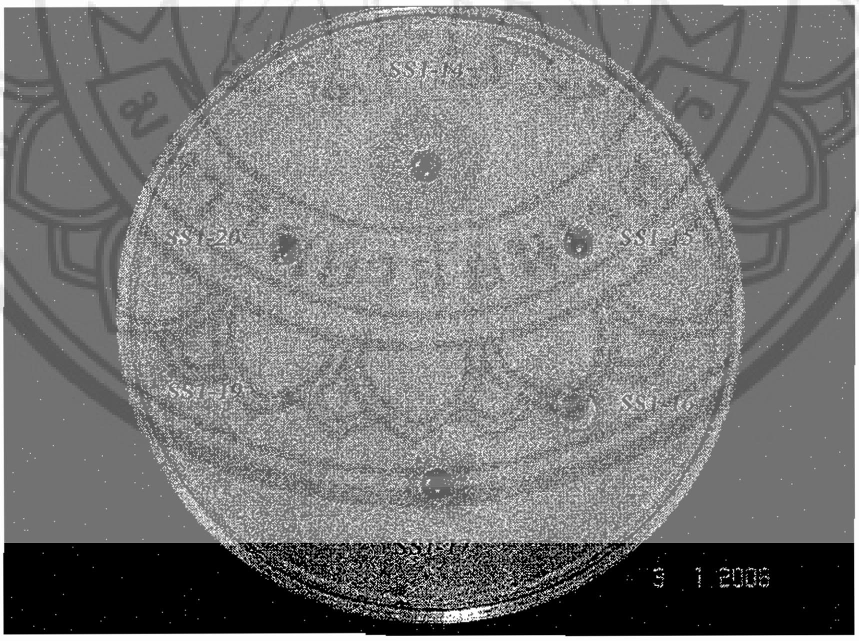
รหัสเชื้อ	**ลักษณะของแอคติโนมัยสีท**				
	สีของสปอร์	**สีของเส้นใยที่เจริญในอาหาร**	**สีที่ละลายลงในอาหาร**	**เส้นใยอากาศ**	**ภาพโคโลนี**
PL3-38	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL3-39	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL4-1	ขาวอมม่วง	ม่วง	แดง	มี	
PL4-4	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL4-17	ขาว	เหลือง	ไม่มี	มี	
PL4-19	เหลือง	เหลือง	ไม่มี	มี	

แอคติโนมัยสีทจำนวน 46 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* จากการทดสอบขั้นปฐมภูมิ เมื่อนำมาทดสอบในขั้นทุติยภูมิโดยวิธี agar well diffusion (ภาพ 2-9) เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* พบว่ามี 8 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยพบบริเวณใสเกิดขึ้นรอบๆ หลุมที่หยดน้ำหมักจากการเลี้ยง แอคติโนมัยสีท โดยไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* คือ SS1-14, SS1-16, SS1-17, KY2-2, PL3-36, PL3-37, PL3-39 และ PL4-1 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเรียงตามลำดับดังนี้ 17±0.0,10±0.0, 11±0.3, 17±0.0, 8±0.0, 13±0.3, 10±0.3 และ 17±0.0 มิลลิเมตร และมีรูปแบบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยไอโซเลท SS1-14, PL3-37, PL3-39 และ PL4-1 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้ง 6 ชนิด ไอโซเลท PL3-36 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิดโดยยับยั้ง *M. smegmatis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ไอโซเลท SS1-16, SS1-17 และ KY2-2 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ 4 ชนิด โดยไอโซเลท SS-17 และ KY2-2 ยับยั้ง *M. smegmatis*, *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ไอโซเลท SS1-16 ยับยั้งเชื้อ *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *C. albicans* แสดงในตาราง 10

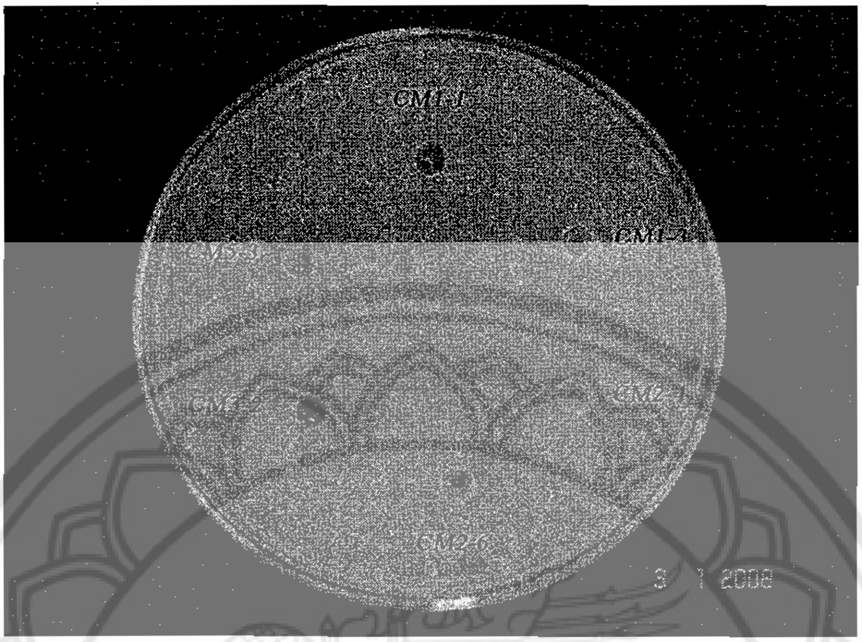
ตาราง 10 รูปแบบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยแอคติโนมัยสีท 8 ไอโซเลทที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ในการทดสอบขั้นทุติยภูมิ

รหัสเชื้อ	จุลินทรีย์ทดสอบ					
	M. smegmatis	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*
SS1-14	+	+	+	+	+	+
SS1-16	+	-	-	+	+	+
SS1-17	+	+	-	+	+	-
KY2-2	+	+	-	+	+	-
PL3-36	+	+	+	+	+	-
PL3-37	+	+	+	+	+	+
PL3-39	+	+	+	+	+	+
PL4-1	+	+	+	+	+	+

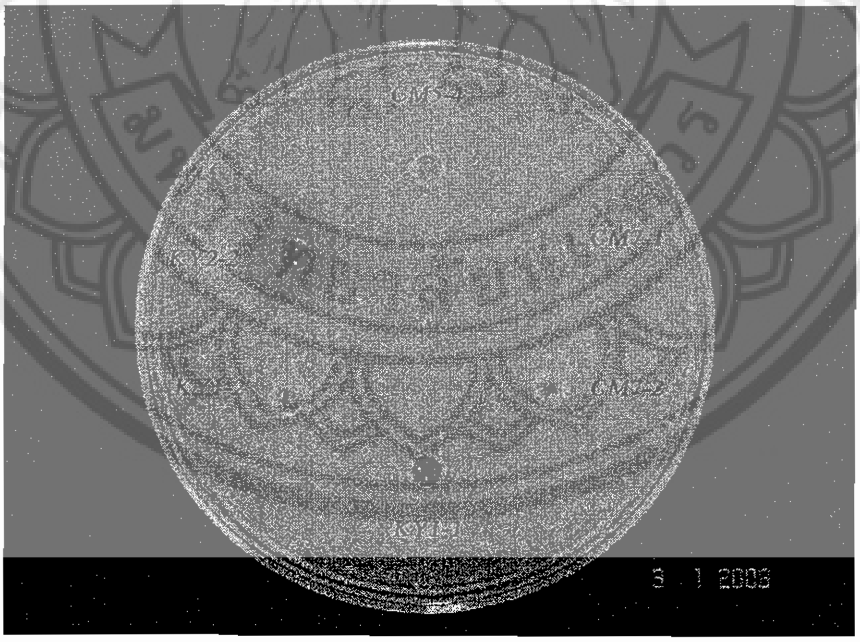
ภาพ 2 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท SS1-1, SS1-3, SS1-4, SS1-6, SS1-9 และ SS1-12 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis*



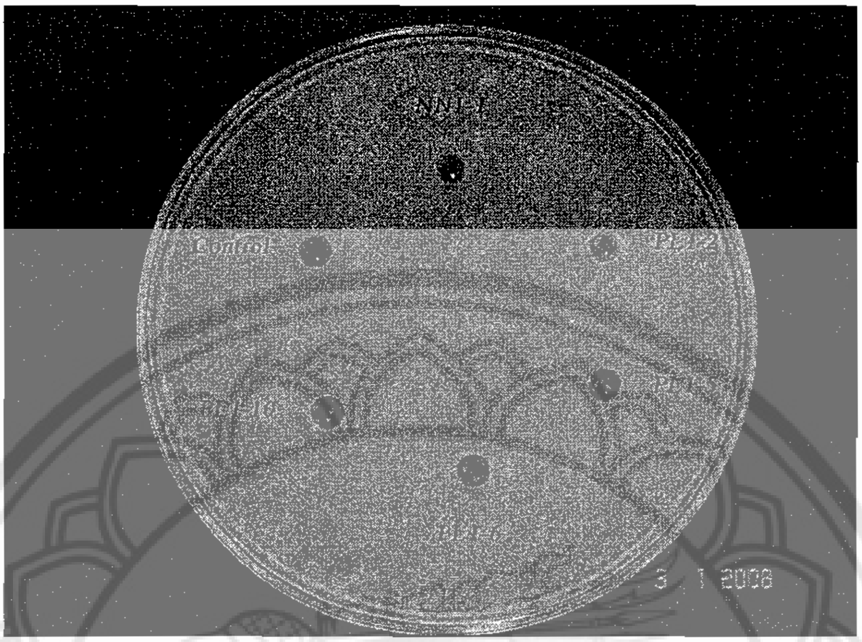
ภาพ 3 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท SS1-14, SS1-15, SS1-16, SS1-17, SS1-19 และ SS1-20 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis*



ภาพ 4 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CM1-1, CM1-3, CM2-4, CM2-6, CM3-2 และ CM5-3 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis*



ภาพ 5 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CM5-4, CM7-1, CM7-2, KY1-1, KY1-2 และ KY2-2 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis*



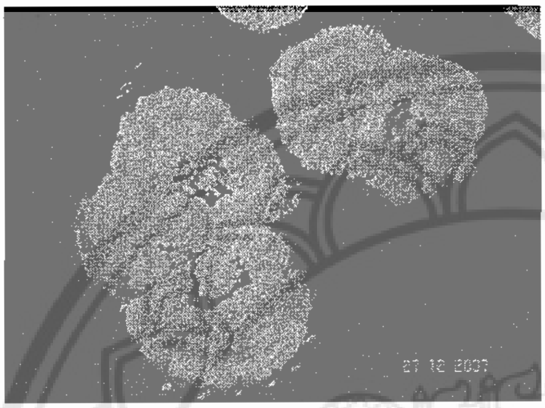
ภาพ 6 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท NN1-1, PL1-2, PL1-5, PL1-6, PL1-10 และ control ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis*

ภาพ 7 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PL3-1, PL3-2, PL3-13, PL3-17, PL3-23 และ PL3-24 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis*

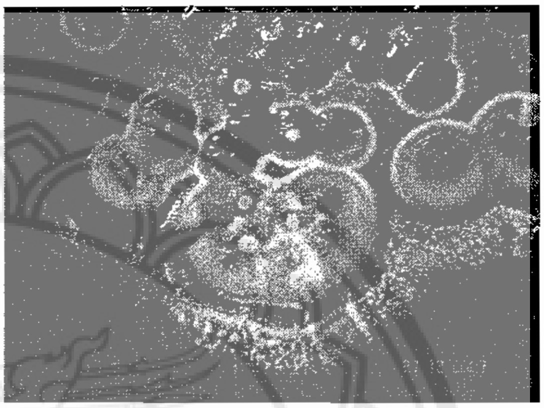
ภาพ 8 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PL3-25, PL3-29, PL3-32, PL3-36, PL3-37 และ PL3-38 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis*

ภาพ 9 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PL3-39, PL4-1, PL4-4, PL4-17, PL4-19 และ control ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis*

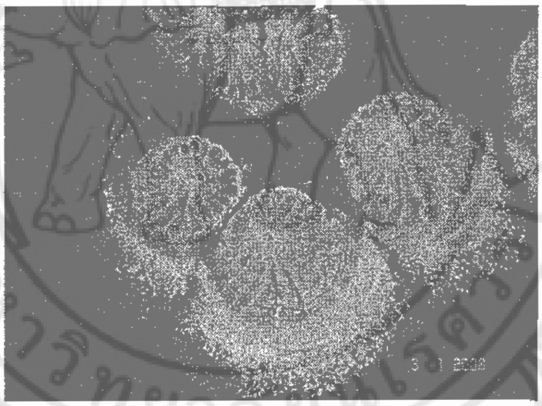
จากแอคติโนมัยสีท 8 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ในการทดสอบขั้นทุติยภูมิ พบว่ามี 3 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสกว้างที่สุด มีขนาด17±0.0 มิลลิเมตร คือไอโซเลท SS1-14, KY2-2 และ PL4-1 ซึ่งมีลักษณะโคโลนีดังภาพ 10



SS1-14



KY2-2



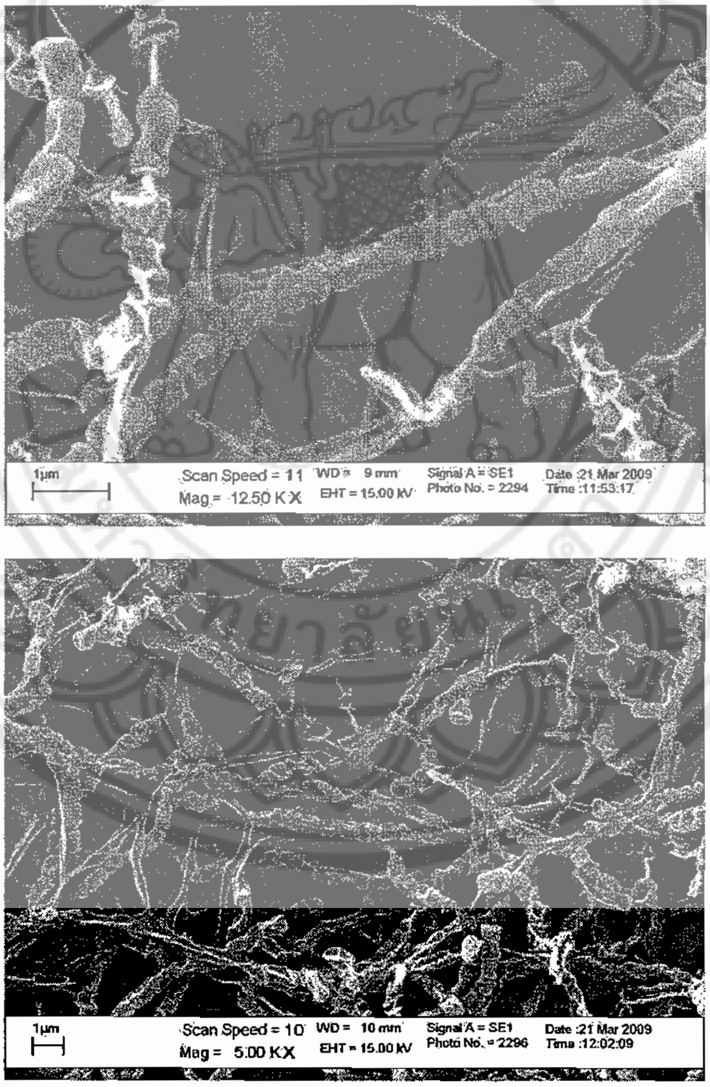
PL4-1

ภาพ 10 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท SS1-14, KY2-2 และ PL4-1 บนอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium

จากรูปแบบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในตาราง 10 ไอโซเลท SS1-14 และ PL4-1 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิดคือ *M. smegmatis, E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis S. aureus* และ *C. albicans* ส่วนไอโซเลท KY2-2 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 4 ชนิดคือ *M. smegmatis, E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* ซึ่งไอโซเลท KY2-2 สารสร้างปฏิชีวนะที่มีการออกฤทธิ์ในช่วงแคบ โดยสังเกตจากการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้น้อยชนิดกว่า ซึ่ง

คาดว่าสารปฏิชีวนะอาจมีความจำเพาะต่อ *M. smegmatis* ดังนั้นจึงได้เลือกไอโซเลท KY2-2 สำหรับการทดลองต่อไป

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 พบว่ามีสีของสปอร์เป็นสีขาว สีของเส้นใยที่เจริญในอาหารเป็นสีม่วงอ่อน มีสีที่ละลายลงในอาหารเป็นสีม่วง และมีเส้นใยอากาศ เมื่อทำการศึกษาดูลักษณะการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (screening electron microscope : SEM) พบว่ามีการจัดเรียงตัวของสปอร์เป็นสายยาว (ภาพ 11) ซึ่งเป็นลักษณะของแอคติโนมัยสีทในจีนัส *Streptomyces* ดังนั้นจึงคาดว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 น่าจะจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces*



ภาพ 11 ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์ของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำแอคติโนมัยสีท KY2-2 ไปจัดจำแนกโดยวิธี partial 16S rDNA sequence analysis โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่ใช้มีความยาว 534 นิวคลีโอไทด์

```
>ACT107
GTAGGCGGCTTGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGA
TACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCG
CAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAG
GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTT
GGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCC
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATA
TACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
```

นำไปเปรียบเทียบกับลำดับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ BLASTn program จากฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอคติโนมัยสีท KY2-2 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces mediolani* ดังนั้น แอคติโนมัยสีท KY2-2 น่าจะเป็น *Streptomyces mediolani*

การผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือกในถังหมัก

จากการทดสอบขั้นทุติยภูมิของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสกว้างที่สุด และมีรูปแบบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 4 ชนิด ซึ่งน้อยกว่าไอโซเลท SS1-14 และ PL4-1 ดังนั้นจึงได้เลือกไอโซเลท KY2-2 ในการศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะในถังหมัก และวัดการเจริญของแอคติโนมัยสีทในรูปการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ เทียบกับระยะเวลาการสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีทซึ่งทดสอบโดยวิธี agar well diffusion ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 **การเจริญของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ในรูปค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส**

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD 660 nm)	ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (มิลลิเมตร)
0	0.25	7.50	-
3	0.55	7.52	-
6	0.82	7.56	-
9	0.83	7.54	-

ตาราง 11 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD 660 nm)	ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (มิลลิเมตร)
12	2.03	7.93	-
15	2.74	7.93	-
18	3.83	8.33	-
21	4.20	8.26	-
24(1วัน)	5.09	8.14	-
27	5.31	8.06	-
30	6.06	7.88	-
33	5.60	7.63	-
36	6.36	7.81	-
39	5.81	8.01	-
42	6.00	8.19	-
45	5.73	8.09	-
48(2วัน)	5.97	8.18	-
51	6.41	8.23	9±0.4
54	5.84	8.45	15±0.3
57	6.16	9.01	15±0.0
60	6.27	9.22	14±0.0
63	6.60	9.34	14±0.0
66	6.44	9.51	12±0.3
69	6.60	9.43	12±0.3
72(3วัน)	6.82	9.51	12±0.0
78	6.71	9.69	11±0.0
84	6.71	9.57	10±0.0
90	5.75	9.95	10±0.3
96(4วัน)	5.60	9.97	9±0.0
102	5.32	9.98	9±0.0

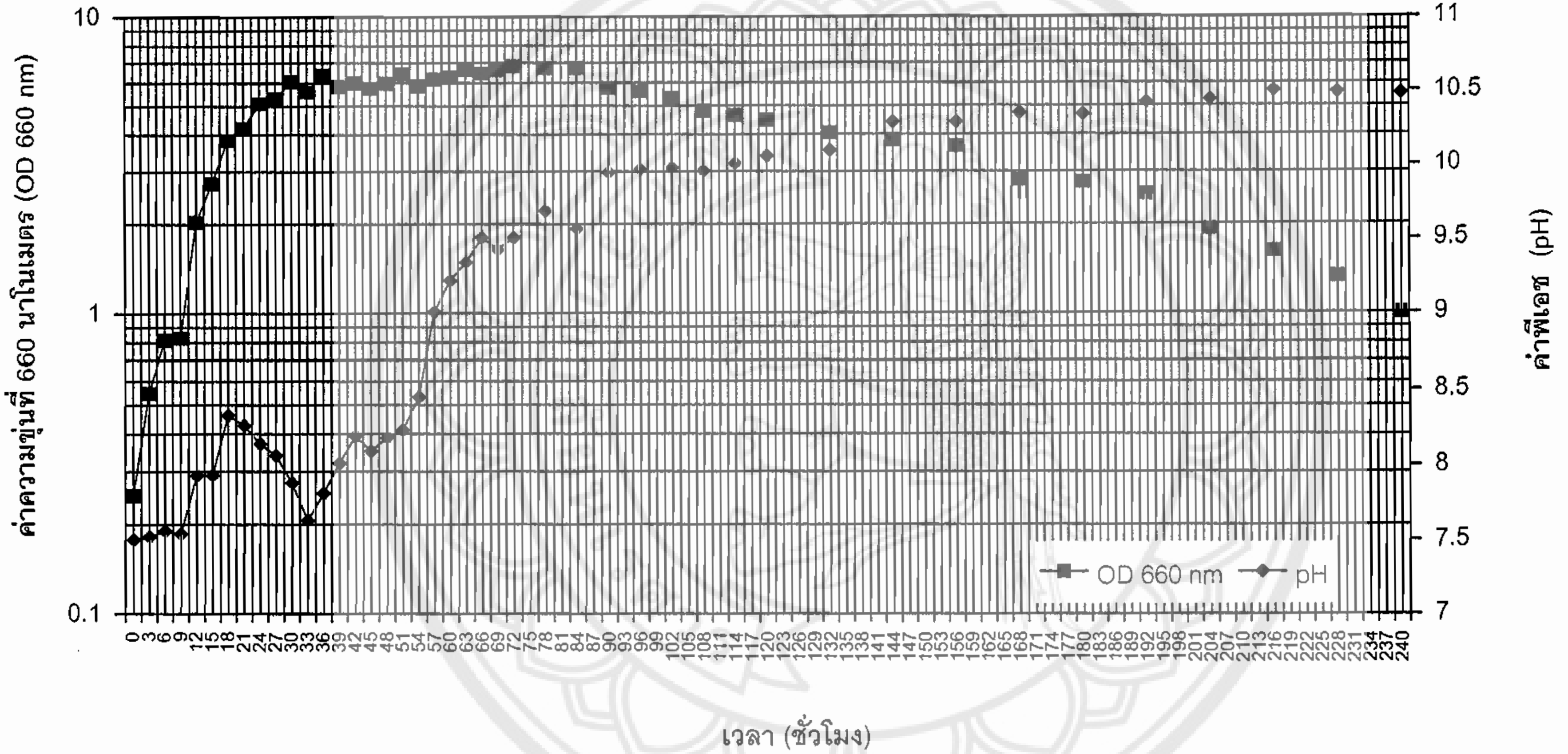
ตาราง 11 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD 660 nm)	ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (มิลลิเมตร)
108	4.80	9.96	9±0.3
114	4.63	10.01	9±0.3
120(5วัน)	4.47	10.06	9±0.0
132	4.05	10.10	9±0.0
144(6วัน)	3.84	10.29	9±0.0
156	3.66	10.29	9±0.0
168(7วัน)	2.81	10.35	9±0.0
180	2.76	10.34	9±0.0
192(8วัน)	2.52	10.42	9±0.0
204	1.92	10.44	-
216(9วัน)	1.61	10.50	-
228	1.32	10.49	-
240(10วัน)	1.00	10.48	-

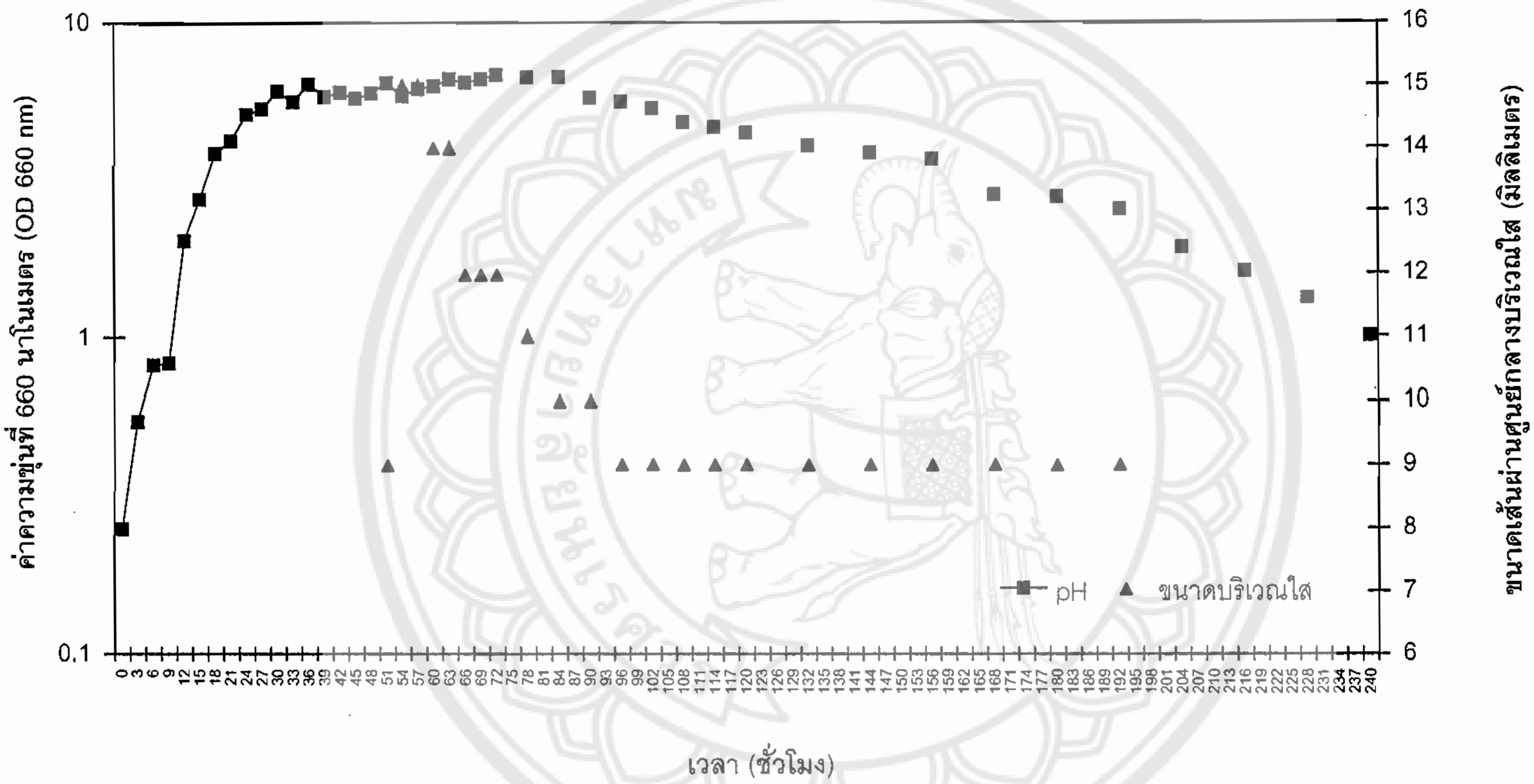
จากข้อมูลค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรในตาราง 11 เมื่อนำมาวาดกราฟการเจริญของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 จะได้กราฟดังภาพ 12 ซึ่งไม่พบการเจริญในระยะ lag phase แต่พบการเจริญในระยะ log phase ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 21 ชั่วโมงก่อนเข้าสู่การเจริญในระยะ stationary phase การเจริญในระยะ stationary phase เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 22 จนถึงชั่วโมงที่ 84 รวมเวลาการเจริญในระยะ stationary phase ประมาณ 43 ชั่วโมงก่อนเข้าสู่การเจริญในระยะ death phase ในชั่วโมงที่ 85 เมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) **จากกราฟการเจริญในระยะ log phase ช่วงชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่าไอโซเลท KY2-2 มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.29 hr^{-1} และระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของแอคติโนมัยสีทเป็น** 2 เท่า (doubling time) เท่ากับ 2.38 ชั่วโมง

จากกราฟความเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชเทียบกับเวลา ดังแสดงในภาพ 12 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเมื่อชั่วโมงที่ 0 มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.50 และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยในชั่วโมงที่ 9 มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.54 แต่หลังจากชั่วโมงที่ 9 ค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 8.33 ในชั่วโมงที่ 18 และค่อยๆ ลดลงจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.63 ในชั่วโมงที่ 33 หลังจากนั้นค่าพีเอชค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 9.51 ในชั่วโมงที่ 66 และหลังจากนั้นค่าพีเอชค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งเท่ากับ 10.48 ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ

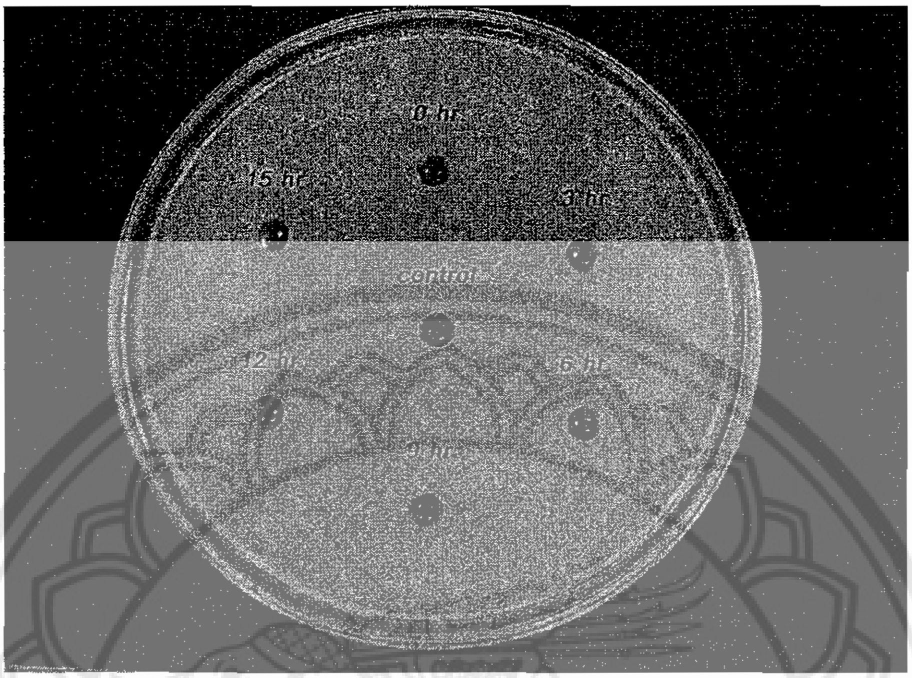
ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ดังแสดงในภาพ 14-20 สังเกตได้จากเกิดบริเวณใสขึ้นบนอาหารแข็งที่มี *M. smegmatis* เป็นเชื้อทดสอบ เมื่อนำขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสมาเทียบกับการเจริญของแอคติโนมัยสีท พบว่าแอคติโนมัยสีทสร้างสารปฏิชีวนะและทำให้เห็นบริเวณใสในชั่วโมงที่ 51 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร และมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเพิ่มขึ้นจนมีขนาด 15 มิลลิเมตรในชั่วโมงที่ 54 ถึงชั่วโมงที่ 57 หลังจากนั้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสลดลงจนมีขนาด 9 มิลลิเมตรในชั่วโมงที่ 96 และคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 192 หลังจากนั้นไม่เห็นบริเวณใสของเชื้อ *M. smegmatis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาพ 13



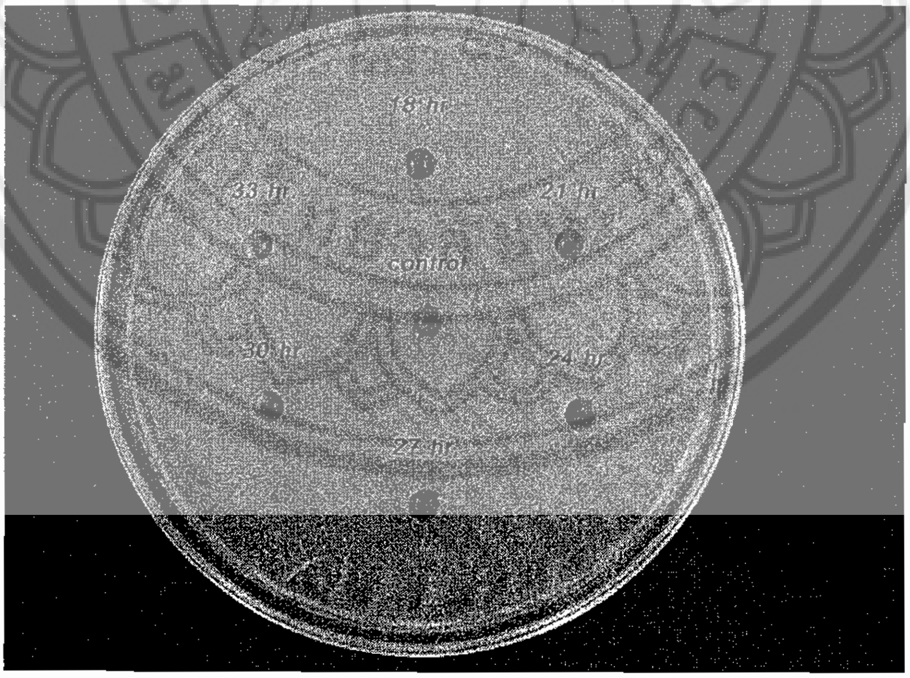
ภาพ 12 กราฟการเจริญของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 และค่าพีเอช (pH) กับเวลา (ชั่วโมง)



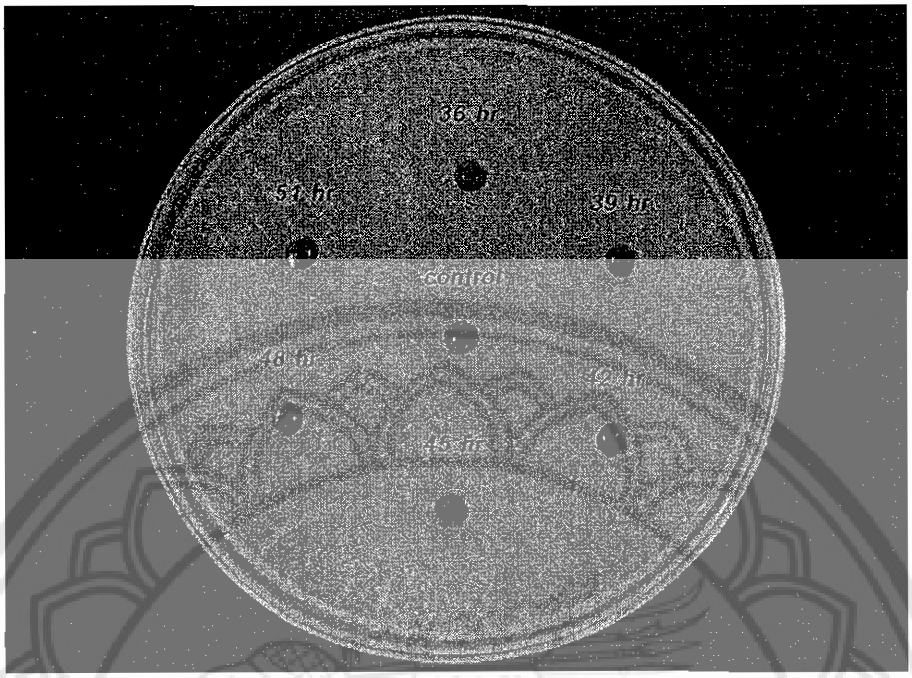
ภาพ 13 กราฟการเจริญของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 และฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่แอคติโนมัยสีทผลิตขึ้นในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis*



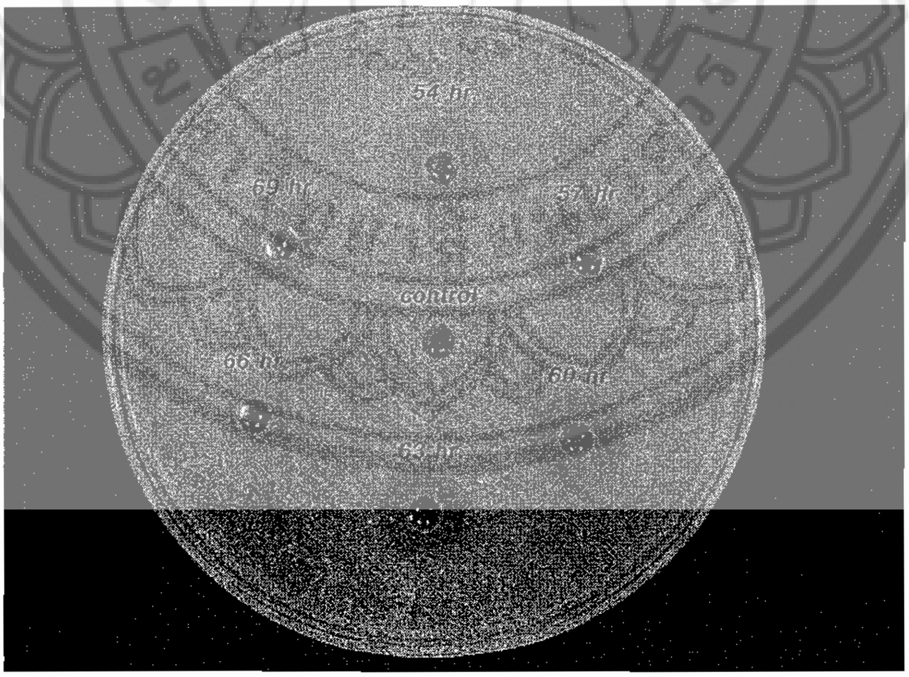
ภาพ 14 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15



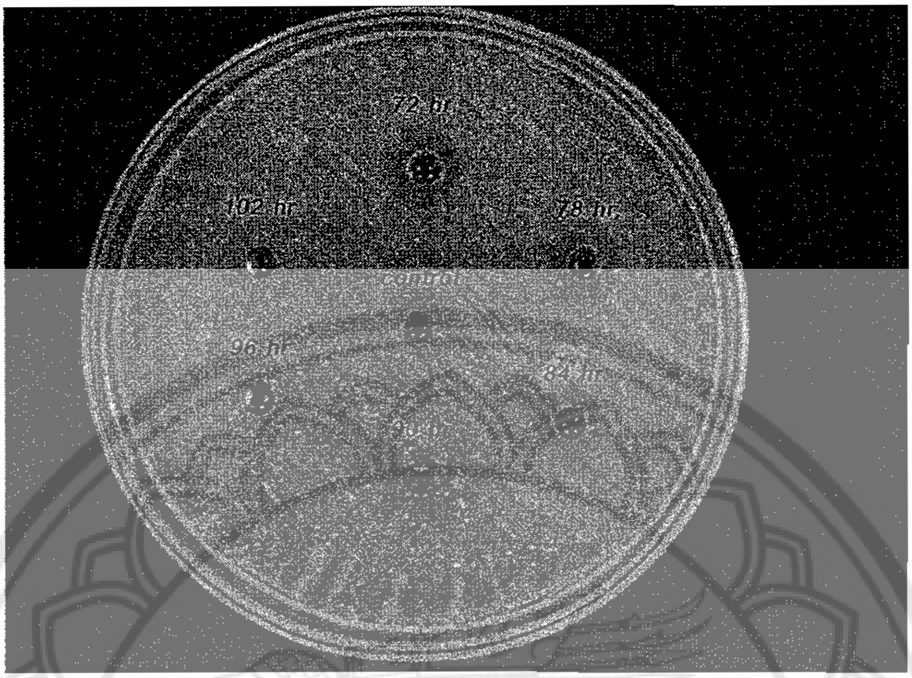
ภาพ 15 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 18, 21, 24, 27, 30 และ 33



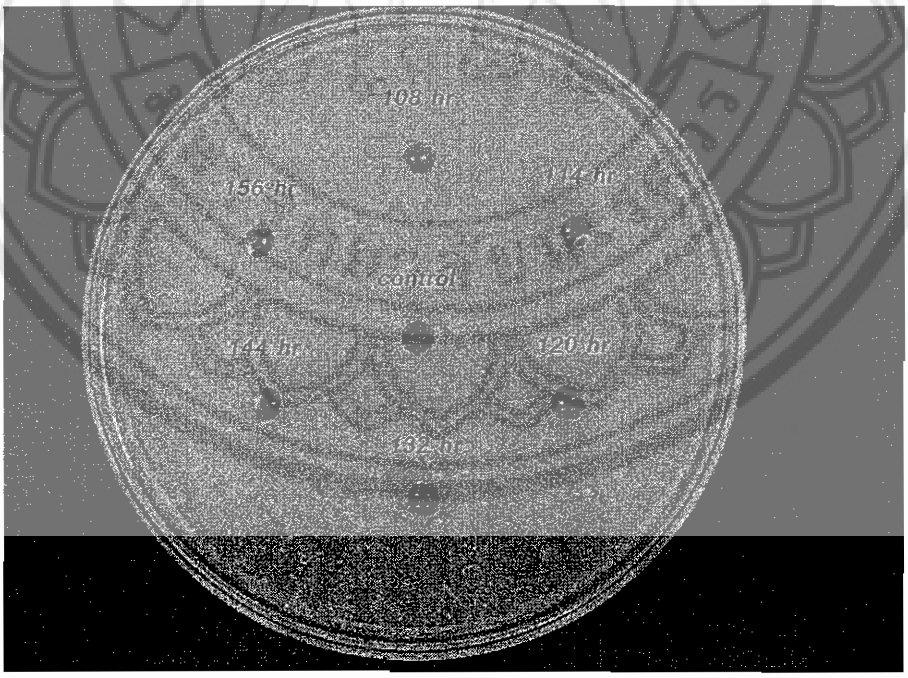
ภาพ 16 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 36, 39, 42, 45, 48 และ 51



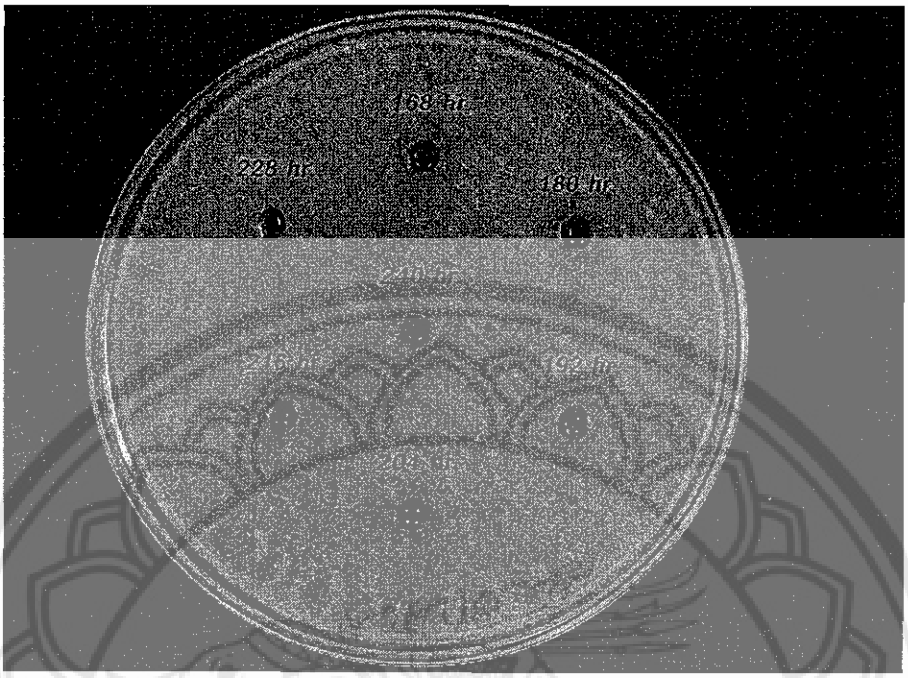
ภาพ 17 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 54, 57, 60, 63, 66 และ 69



ภาพ 18 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 72, 78, 84, 90, 96 และ 102



ภาพ 19 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 108, 114, 120, 132, 144 และ 156



ภาพ 20 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 168, 180, 192, 204, 216, 228 และ 240

จากผลการทดลองในตาราง 11 แอคติโนมัยสีทสร้างสารปฏิชีวนะและทำให้เห็นบริเวณใสในชั่วโมงที่ 51 จนถึงชั่วโมงที่ 192 ตลอดเวลาที่มีสารปฏิชีวนะค่าพีเอชของอาหารจะมีค่าอยู่ระหว่าง 8.23 ถึง10.42 และในช่วงเวลาที่มีปริมาณสารปฏิชีวนะที่ทำให้เห็นบริเวณใสกว้างที่สุด มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 8.45 ถึง 9.01 ดังนั้นจึงได้ทำการควบคุมพีเอชของอาหารในถังหมักในช่วงที่คาดว่ามีการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยเริ่มทำการควบคุมค่าพีเอชของอาหารในชั่วโมงที่ 51อยู่ที่พีเอชเท่ากับ 9.00 จนสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 240 ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส จากการควบคุมพีเอชของอาหาร

เวลา (ชั่วโมง)	อาหารที่มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 9.00		
	ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD 660 nm)	ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (มิลลิเมตร)
0	0.264	7.48	-
12	2.078	7.52	-
24(1วัน)	5.124	8.44	-
36	6.476	8.54	-
48(2วัน)	6.590	8.74	-
60	6.400	9.00	12±0.0
72(3วัน)	6.940	9.00	10±0.0
84	6.930	9.00	10±0.0
96(4วัน)	5.990	9.00	10±0.3
108	5.710	9.00	9±0.0
120(5วัน)	5.020	9.00	9±0.3
132	4.170	9.00	9±0.0
144(6วัน)	4.850	9.00	9±0.0
156	3.920	9.00	9±0.0
168(7วัน)	3.840	9.00	9±0.0
180	3.470	9.00	9±0.0
192(8วัน)	2.250	9.00	9±0.0
204	1.540	9.00	-
216(9วัน)	1.250	9.00	-
228	1.000	9.00	-
240(10วัน)	1.000	9.00	-

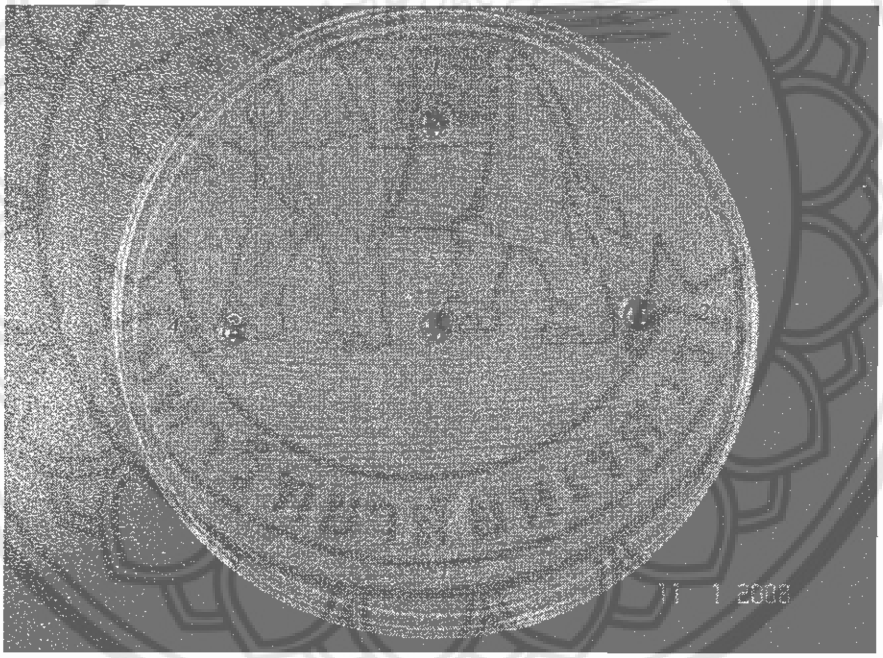
การสกัดสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือก

นำน้ำหมัก(fermentation broth) ที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ของแอคติโนมัยสีทออก นำส่วนน้ำใสมาสกัดด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 ในแต่ละครั้งจะใช้ส่วนน้ำใส 500 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารผสมระหว่างส่วนน้ำใสและ ethyl acetate เทใส่กรวยแยกขนาด 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นกันของส่วนน้ำใส กับชั้นของ ethyl acetate ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที โดยชั้นของ ethyl acetate จะอยู่ส่วนบนของกรวยแยก ซึ่งจะมีสีเหลืองอ่อนๆ ใส เมื่อเทียบกับก่อนสกัดซึ่งจะใสไม่มีสี นำชั้นของ ethyl acetate มาระเหยเอา ethyl acetate ออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 240 มิลลิบาร์ อัตราการหมุน 50 รอบต่อนาที โดยจะเติมส่วนของชั้น ethyl acetate ที่ได้จากกรวยแยกครั้งละ 250 มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไปเครื่องจะค่อยๆระเหย ethyl acetate ออกจนสารละลายที่ใส่เข้าไปเริ่มน้อยลง และมีคราบจับอยู่ตามผนังของขวดที่ใช้ระเหย ปล่อยให้เครื่องทำงานจนสารละลายแห้งติดข้างขวดระเหยหรือเหลือน้อยที่สุด จากนั้นใช้หลอดหยด ค่อยๆ หยด methanol ปริมาตรประมาณ 2-3 มิลลิลิตร ลงไปละลายสารที่ติดข้างขวดระเหย ดูดสารที่ถูกละลายด้วย methanol ซึ่งมีสีแดงอมม่วง ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียว ตั้งทิ้งไว้ให้ methanol ระเหยจนแห้งในที่มืด.ปิดฝาให้แน่น ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ได้มีลักษณะเป็นยางเหนียว สีแดงอมม่วง โดยน้ำหมัก 5 ลิตรสามารถสกัดได้สารปฏิชีวนะ 400 มิลลิกรัม หรือคิดเป็น 80 มิลลิกรัม/ลิตร

การตรวจสอบฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่สกัดได้ ในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยชั่งสารปฏิชีวนะที่สกัดได้มา 60 มิลลิกรัม ละลายด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ 12,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการทดลองได้เปรียบเทียบระหว่าง น้ำหมัก (ส่วนใส) ก่อนการสกัดด้วย ethyl acetate, สารสกัดปฏิชีวนะละลายใน 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO, ส่วนน้ำใสหลังการสกัดด้วย ethyl acetate, สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO, และอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Extract Glucose Medium พบว่าส่วนน้ำใสก่อนการสกัดด้วย ethyl acetate มีบริเวณใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร และสารละลายปฏิชีวนะใน 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO มีบริเวณใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร ดังแสดงในตาราง 13 และภาพ 21

ตาราง 13 การยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยสารสกัดปฏิชีวนะเทียบกับตัวควบคุม

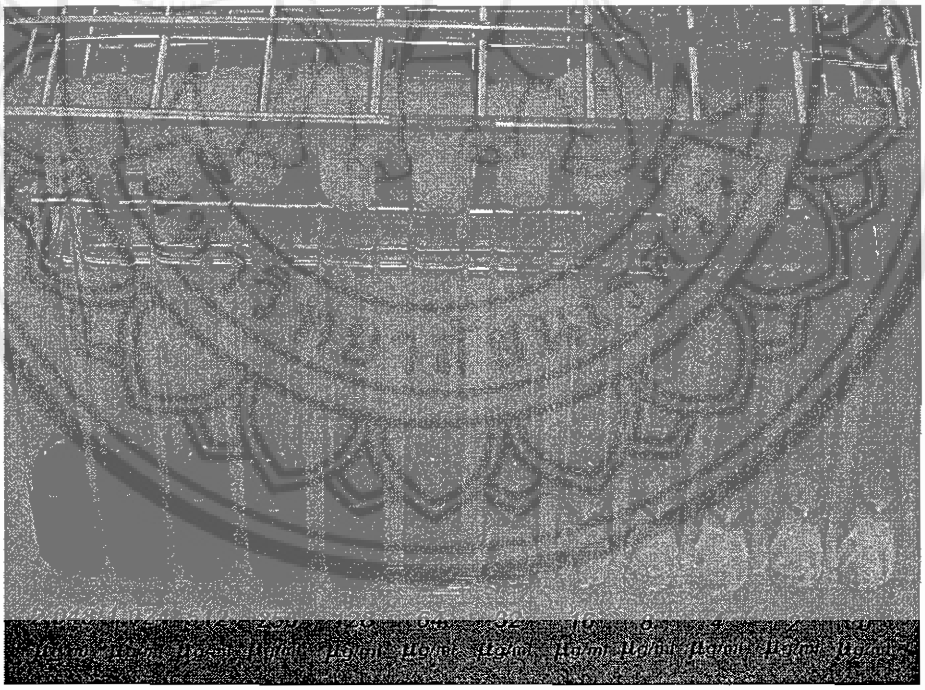
สารทดสอบ	**ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (มิลลิเมตร)**
น้ำหมัก (ส่วนใส) ก่อนการสกัดด้วย ethyl acetate	8
สารสกัดปฏิชีวนะละลายใน 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO	12
ส่วนน้ำใสหลังการสกัดด้วย ethyl acetate	-
สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO	-
อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Extract Glucose Medium	-



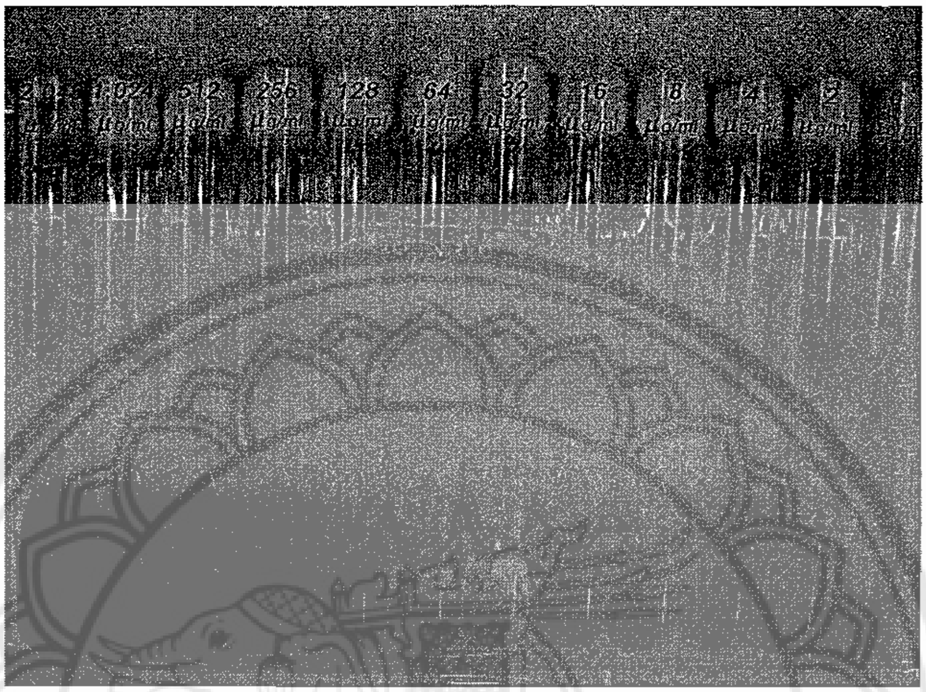
ภาพ 21 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของสารทดสอบ น้ำหมัก (ส่วนใส) ก่อนการสกัดด้วย ethyl acetate (1), สารสกัดปฏิชีวนะละลายใน 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO (2), ส่วนน้ำใสหลังการสกัดด้วย ethyl acetate (3), สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO (4) และอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Extract Glucose Broth (5)

การตรวจสอบความไวของ *M. smegmatis* ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดได้ด้วยการหาค่าMinimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี broth dilution

การตรวจสอบความไวของ *M. smegmatis* ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ด้วยการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration หรือค่า MIC โดยวิธี broth dilution นั้นเป็นการสังเกตการเจริญของ *M. smegmatis* ในอาหาร Mueller-Hinton broth ที่มีสารปฏิชีวนะที่สกัดได้ผสมอยู่ ซึ่งมีความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้คือ 2,048, 1,024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, และ 0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากการสังเกตการเจริญของ *M. smegmatis* พบว่าที่ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ 2,048, 1,024, 128, 64, และ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบการเจริญของ *M. smegmatis* เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าที่มีการเจริญของ *M. smegmatis* ที่ผิวหน้าของอาหาร และพันเป็นสายจากผิวหน้าอาหารลงสู่ก้นหลอด (ภาพ 22) ดังนั้นค่า MIC คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* คือ ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นความไวของ *M. smegmatis* ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 มีค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพ 22 อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ผสมสารสกัดจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ก่อนใส่กล้าเชื้อ *M. smegmatis*



หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง *M. smegmatis* จะเจริญที่ผิวหน้าอาหารหลังจากเขย่าแล้ว เชื้อจะขุ่นทั่วทั้งหลอด

ภาพ 23 การตรวจสอบความไวของ *M. smegmatis* ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดได้ด้วยการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี broth dilution

การสกัดสารปฏิชีวนะด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (Thin-layer chromatography)

การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ออกจากสิ่งเจือปนโดยการทำโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ มีระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ สารผสมระหว่าง ethyl acetate และ methanol ในอัตราส่วน 1:0, 0:1, 1:1, 1:5, 5:1, 1:10, 10:1, 1:15, 15:1, 1:20, 20:1, 1:25 และ 25:1 หลังการหยดสารปฏิชีวนะปริมาตร 5 ไมโครลิตร และผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวางไว้ในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของระบบตัวทำละลายในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าจะเห็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านจุดของสารปฏิชีวนะขึ้นไป พร้อมกับเห็นการเคลื่อนที่ของแถบสีของสารปฏิชีวนะแยกออกจากกัน ตามการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงจุดที่กำหนด นำแผ่น TLC ออกจากขวดแก้วแล้วผึ่งให้ไอ

ของตัวทำละลายระเหยจนแห้ง จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้รังสีอัลตร้าไวโลเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร เพื่อหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เมื่อนำไปส่องภายใต้รังสีอัลตร้าไวโลเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าพื้นหลังของแผ่น TLC จะเป็นสีเขียว และไม่เห็นแถบของสาร แต่เมื่อนำไปส่องภายใต้รังสีอัลตร้าไวโลเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่าเห็นแถบของสารเรืองแสงปรากฏขึ้น โดยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ออกจากกันคือ ระบบตัวทำละลายที่มีสารผสมระหว่าง ethyl acetate และ methanol ในอัตราส่วน 25 : 1 โดยจะเห็นแถบของสารที่เรืองแสง แยกห่างออกจากกันประมาณ 4 แถบ โดยแต่ละแถบจะมีอัตราการเคลื่อนที่ของสาร (ค่า Rf) เท่ากับ 0.28, 0.31, 0.71 และ 0.86 ดังแสดงในภาพ 23

ภาพ 24 แถบของสารปฏิชีวนะที่ถูกสกัดแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลดที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

การทำไบโอออโทกราฟี (Bioautography) **เพื่อตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ** *M. smegmatis* **โดยวิธี** agar diffusion bioautography

การตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของสารปฏิชีวนะที่ถูกแยกออกจากกันบนแผ่น TLC โดยวิธี agar diffusion bioautography จากการทดลองแยกสารปฏิชีวนะด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ ได้หยดสารปฏิชีวนะปริมาตร 10 ไมโครลิตร (120 ไมโครกรัม) หรือคิดเป็นปริมาณสารปฏิชีวนะ 12 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร จากการทำไบโอออโทกราฟีโดยวางแผ่น TLC คว่ำบนอาหารแข็งที่มี *M. smegmatis* เกลี่ยอยู่ผิวหน้าอาหาร หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบบริเวณใสเกิดขึ้นรอบๆ แผ่น TLC ดังภาพ 24 ซึ่งบริเวณใสมีลักษณะค่อนข้างเป็นวงกลมซ้อนเหลื่อมกัน 3 วง เมื่อนำไปเทียบกับภาพ 24 ซึ่งเป็นภาพของแผ่น TLC ภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ที่มีแถบของสารเรืองแสงแยกห่างออกจากกัน 4 แถบ จากการเปรียบเทียบบริเวณที่คาดว่าเป็นจุดศูนย์กลางของบริเวณใสที่ซ้อนเหลื่อมกัน 3วง โดยวงแรกตรงกับแถบเรืองแสงที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.28 และ 0.31 ส่วนวงที่สองตรงกับแถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.71 และวงที่สามจะมีขนาดเล็กตรงกับแถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.86

ภาพ 25 ผลการทำไบโอออโทกราฟี เปรียบเทียบกับแผ่น TLC ภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร