บทที่ 5

อภิปรายผล และสรุปผลการทดลอง

สรุปผลการวิจัย

จากตัวอย่างดินที่เก็บตามป่าของ 5 จังหวัด ในประเทศไทยจำนวน 21 ตัวอย่าง สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 137 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน 14 ตัวอย่าง ส่วนอีก 7 ตัวอย่างไม่พบแอคติโนมัยสีท

การทดสอบการเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารสำหรับเลี้ยงแอคติโนมัยสีท 8 ชนิด ได้แก่ NA, AIA, Bennett's medium, Emerson Agar, Glucose Asparagine Agar, Yeast-Extract Glucose Medium, ISP2 และ Mueller-Hinton Agar พบว่า *M. smegmatis* สามารถเจริญดีบนอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium โดยมีขนาดโคโลนีใหญ่กว่าในอาหารชนิดอื่น ดังนั้น จึงคัดเลือกอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium เพื่อใช้ในการศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็ง

การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีทขั้นปฐมภูมิจากจำนวนแอคติโนมัยสีท 137 ไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างดิน 14 ตัวอย่าง พบว่ามี 46 ไอโซเลท หรือคิดเป็น 33.6 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่แยกได้ สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* นอกจากนี้ยังพบว่าบางไอโซเลทสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบชนิดอื่นได้ โดยยับยั้งการเจริญของ *E. coli* มี 15 ไอโซเลท ยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* มี 12 ไอโซเลท ยับยั้ง *B. subtilis* มี 48 ไอโซเลท ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* มี 46 ไอโซเลท และยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* มี 26 ไอโซเลท คิดเป็น 10.9, 8.6, 35.0, 33.6 และ 18.9 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไอโซเลททั้งหมดที่แยกได้

การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีทขั้นทุติยภูมิโดยวิธี agar well diffusion แอคติโนมัยสีทจำนวน 46 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* จากการทดสอบขั้นปฐมภูมิ เมื่อนำมาทดสอบ เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* พบว่ามี 8 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* คือ SS1-14, SS1-16, SS1-17, KY2-2, PL3-36, PL3-37, PL3-39 และ PL4-1 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเรียงตามลำดับดังนี้ 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 และมีรูปแบบการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ทดสอบ โดยไอโซเลท

SS1-14, PL3-37, PL3-39 และ PL4-1 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้ง 6 ชนิด ไอโซเลท PL3-36 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด โดยยับยั้ง *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* ส่วนไอโซเลท SS1-16 ยับยั้ง *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *C. albicans*

การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทเพื่อทำการผลิตสารปฏิชีวนะในถังหมักได้คัดเลือกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ซึ่งจากการทดสอบขั้นทุติยภูมิมีแอคติโนมัยสีที่ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส 17±0.0 มิลลิเมตร และมีรูปแบบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเพียง 4 ชนิด คือ *M. smegmatis*, *E. coli*, *B.subtilis* และ *S. aureus* ซึ่งต่างจากไอโซเลท SS1-14 และ PL4-1 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้ง 6 ชนิด

การศึกษาลักษณะของแอคติโนมัยสีท KY2-2 พบว่าโคโลนีมีสีของสปอร์เป็นสีขาว สีของเส้นใยที่เจริญในอาหารเป็นสีม่วงอ่อน และสร้างสีที่ละลายในอาหารเป็นสีม่วง และมีเส้นใยอากาศจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบการเรียงตัวของสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว เมื่อนำไปจัดจำแนกโดย partial 16S rDNA sequence analysis และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีอไทด์โดยใช้ BLASTn program จากฐานข้อมูล NCBI พบว่าแอคติโนมัยสีท KY2-2 น่าจะเป็น *Streptomyces mediolani*

จากกราฟการเจริญของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ไม่พบการเจริญในระยะ lag phase แต่พบการเจริญในระยะ log phase ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 21 ชั่วโมง การเจริญในระยะ stationary phase เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 21 จนถึงชั่วโมงที่ 84 รวมเวลาการเจริญในระยะ stationary phase ประมาณ 53 ชั่วโมงและการเจริญในระยะ death phase ในชั่วโมงที่ 85 จนถึงชั่วโมงที่ 240 เมื่อคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.29 hr^{-1} และระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของแอคติโนมัยสีทเป็น 2 เท่ามีค่าเท่ากับ 2.38 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อชั่วโมงที่ 0 มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.50 และมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 9 มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.54 หลังจากชั่วโมงที่ 9 ค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 8.33 ในชั่วโมงที่ 18 และค่อยๆ ลดลงจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.63 ในชั่วโมงที่ 33 หลังจากนั้นค่าพีเอชค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 9.51 ในชั่วโมงที่ 66 และหลังจากนั้นค่าพีเอชค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งเท่ากับ 10.48 ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 พบว่าสร้างสารปฏิชีวนะและทำให้เห็นบริเวณใสในชั่วโมงที่ 51 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9

มิลลิเมตร และมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเพิ่มขึ้นจนมีขนาด 15 มิลลิเมตรในชั่วโมงที่ 54 ถึงชั่วโมงที่ 57 หลังจากนั้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสลดลงจนไม่เห็นบริเวณใสในชั่วโมงที่ 192 เป็นต้นไป

การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ในชั่วโมงที่ 51 ถึงชั่วโมงที่ 240 ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 9.00 เพื่อควบคุมปริมาณและความคงตัว (stability) ของสามารถของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ตลอดการทดลอง 240 ชั่วโมง พบว่าการควบคุมพีเอชไม่มีผลต่อความคงตัวของสารปฏิชีวนะในการทำให้เกิดบริเวณใสของ *M. smegmatis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ตลอดการทดลอง 240 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองจะมีความคล้ายกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีการควบคุมพีเอช

การสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ในถังหมัก โดยน้ำหมัก 5 ลิตรสามารถสกัดได้สารปฏิชีวนะ 400 มิลลิกรัม และจากการตรวจสอบฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่สกัดได้ ในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ที่ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ 12,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายใน 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส 12 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่า ethyl acetate สามารถสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีท KY2-2 ได้

การตรวจสอบความไวของ *M. smegmatis* ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ด้วยการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration หรือค่า MIC โดยวิธี broth dilution พบว่า มีค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การสกัดสารปฏิชีวนะด้วยเทคนิค TLC ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีท รหัส KY2-2 ออกจากสิ่งเจือปน โดยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือสารผสมระหว่าง ethyl acetate กับ methanol ในอัตราส่วน 25 : 1 โดยจะเห็นแถบของสารที่เรืองแสง แยกห่างออกจากกันประมาณ 4 แถบ โดยแต่ละแถบจะมีอัตราการเคลื่อนที่ของสาร (ค่า Rf) เท่ากับ 0.28, 0.31, 0.71 และ 0.86

การตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของสารปฏิชีวนะที่ถูกแยกออกจากกันบนแผ่น TLC โดยวิธี agar diffusion bioautography พบบริเวณใสเกิดขึ้นรอบๆ แผ่น TLC มีลักษณะเป็นวงกลมซ้อนเหลื่อมกัน 3 วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไปเทียบกับภาพของแผ่น TLC ภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่าจุดศูนย์กลางของบริเวณใสที่ซ้อนเหลื่อมกัน 3 วง โดยวงแรกตรงกับแถบเรืองแสงที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.28 และ 0.31 ส่วนวงที่สองตรงกับแถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.71 และวงที่สามตรงกับแถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.86

อภิปรายผลการวิจัย

1. **การแยกแอคติโนมัยสีท**

การแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดิน เพื่อมาทำการศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ จำเป็นต้องลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย และเชื้อรา ลงให้เหลือน้อยที่สุด (Porter, Wilhelm and Treaner, 1960) เนื่องจากแอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญช้ากว่าแบคทีเรีย และเชื้อรา ดังนั้นวิธีที่ลดการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อรา สามารถทำได้ 2 วิธี คือวิธีแรกเป็นการควบคุมองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติโนมัยสีท ส่วนวิธีที่สองเป็นการเติมสารปฏิชีวนะ หรือสารบางอย่างในอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งทั้ง 2 วิธีสามารถใช้ร่วมกันได้ (Hirsch and Christensen, 1983)

การควบคุมองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แอคติโนมัยสีทเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ อาจควบคุมการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติโนมัยสีทคือ glucose, maltose, dextrin, starch, glycerol, organic acid และ proteins ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ proteins, peptones และ amino acids เช่น asparagine, glycine, leucine และ tryptophan (Waksman, 1950, pp. 80-83)

Pridham และ Gottlieb (1948) ทำการศึกษาความสามารถของ *Streptomyces* ในการใช้แหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถใช้ glucose, mannose, starch, dextrin และ glycerol ได้ดี Benedict (1955) ใส่ arginine ในอาหารเพื่อแยกแอคติโนมัยสีท เช่นเดียวกับ El-Nakeeb และ Lechavalier (1963) ใช้อาหาร arginine glycerol salt medium ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในตัวอย่างดินก่อนการแยกแอคติโนมัยสีท

รายงานที่เกี่ยวกับการใช้สารปฏิชีวนะ หรือเติมสารบางอย่างเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อรา เช่น Philips และ Hanel (1950) พบว่า cycloheximide ในปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร จะไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แต่ถ้าใช้มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย Crook และ คณะ (1950) พบว่า sodium propionate มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Dulaney และ คณะ (1955) ใช้ cycloheximide, polymyxin, subtilin, และ penicillin เติมลงในอาหาร NA เพื่อใช้ในการแยกเชื้อ *Streptomyces* Corke และ Chase (1956) ใช้ sodium propionate ร่วมกับ cycloheximide เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้แยกแอคติโนมัยสีท ส่วน Butler และ Hine (1958) เติม novobiocin ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ลงในอาหาร potato dextrose agar 100 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการคัดแยกเชื้อรา Porter และคณะ (1960) ใช้

tetracyclines, polymyxin, neomycin, และ streptomycin ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ในการแยกแอคติโนมัยสีท นอกจากนี้ Ottow และ Glathe (1968) พบว่า rose bengal สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และลดขนาดไมซีเลียมของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดลองได้เลือกใช้อาหาร Actinomycete Isolation Agar (AIA) ในการแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดิน โดยอาหาร AIA ประกอบด้วย sodium caseinate เป็นแหล่งคาร์บอน และ asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยทั้ง sodium caseinate และ asparagine เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติโนมัยสีท นอกจากนี้ยังมี sodium propionate ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ผลการทดลองแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินทั้ง 21 ตัวอย่าง สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 137 ไอโซเลท โดยจำนวน ไอโซเลทที่แยกได้ในแต่ละตัวอย่างดินมีจำนวนมากน้อยแตกต่างกัน และในบางตัวอย่างดิน เช่น SS2, SS3, CM4, KY3, NN2, NN3 และ PL5 ไม่สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ ซึ่งโดยปกติปริมาณแอคติโนมัยสีทในดินอยู่ระหว่าง 10^5-10^8 เซลล์ ต่อดินแห้ง 1 กรัม ทั้งนี้ปริมาณของแอคติโนมัยสีทเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของดิน ปริมาณอินทรียวัตถุ และค่าพีเอชของดิน โดยดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีค่าพีเอชเป็นด่างเล็กน้อย และค่อนข้างแห้งจะมีปริมาณแอคติโนมัยสีทค่อนข้างสูง ส่วนในดินที่มีค่าพีเอชเป็นกรดสูง หรือมีน้ำท่วมขัง จะมีปริมาณของแอคติโนมัยสีทค่อนข้างต่ำ (สมศักดิ์ วังใน, 2528, หน้า 18; สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2549, หน้า 64)

การเลือกเก็บไอโซเลทของแอคติโนมัยสีท จะเก็บไว้เฉพาะไอโซเลทที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเช่น ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีท, การสร้างสีที่สามารถละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ, สีของสปอร์ที่อยู่บนผิวหน้าโคโลนี, สีของเส้นใยที่เจริญในอาหาร และ การสร้างเส้นใยอากาศ (Keast *et al.*, 1984) ซึ่งในการเก็บไอโซเลทของแอคติโนมัยสีทอาจมีการเก็บซ้ำกันได้ ซึ่งในการทดลองไม่ได้ทำการพิสูจน์ความแตกต่างของเชื้อแต่อย่างใด

2. การทดสอบการเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารสำหรับใช้เลี้ยงแอคติโนมัยสีท

มัยโคแบคทีเรีย อยู่ในจีนัส *Mycobacterium* ซึ่งเป็นจีนัสเดียวของแฟมิลี่ *Mycobacteriaceae* และจัดอยู่ในกลุ่มของ aerobic actinomycetes โดยมัยโคแบคทีเรียสามารถแบ่งตามการก่อโรคในคนออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มของ *Mycobacterium tuberculosis* complex กลุ่มนี้พบเฉพาะในคน และจัดเป็นเชื้อก่อโรคที่มีอัตราการเจริญช้า ใช้เวลาในการเพาะเชื้อนาน 4-8 สัปดาห์จึงสามารถเห็นโคโลนีบนอาหารวุ้น กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มของ Non-

tuberculous mycobacteria (NTM) ส่วนใหญ่พบในสิ่งแวดล้อม แต่หลายชนิดสามารถก่อโรคในคนได้ ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้อีกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีอัตราการเจริญช้า ใช้เวลาในการเพาะเชื้อนานกว่า 7 วัน จึงสามารถเห็นโคโลนีบนอาหารวุ้นได้ กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเร็ว สามารถเห็นโคโลนีบนอาหารวุ้นได้ภายใน 7 วัน (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549, หน้า 327-329)

M. smegmatis เป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียในกลุ่มของ NTM มีอัตราการเจริญเร็ว ซึ่งในการศึกษาหาสารปฏิชีวนะต้านมัยโคแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้จากการทดสอบกับมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญเร็ว และไม่ก่อให้เกิดโรค (Maeda, 1965, pp. 1-6) นอกจากนี้มีการใช้ *M. smegmatis* ในการศึกษากระบวนการพื้นฐานต่างๆ ของเซลล์ ซึ่งมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรค เช่นกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (Pavelka and Jacobs, 1996; Caceres, et al., 1997; Pavelka and Jacods, 1999; Peteroy, et al., 2000; Chacon,et al., 2002; Converse and Cox; 2005)

มัยโคแบคทีเรียหลายชนิดสามารถปรับตัวให้เจริญได้อย่างรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย โดยใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ amino acids เป็นแหล่งไนโตรเจน การแทนที่ glycerol ด้วยแหล่งคาร์บอนอื่น เช่น glucose และ fructose จะมีผลต่อการเจริญของมัยโคแบคทีเรีย ความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อกิจกรรมต่างๆ เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของ carbohydrate จากรายงานพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ glycerokinase ลดต่ำลงเมื่อเซลล์เจริญในอาหารที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน แต่กิจกรรมของเอนไซม์ในวิถี glycolysis เพิ่มสูงขึ้น glucose ประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ถูก *M. smegmatis* ใช้ได้ดีกว่า *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ ในส่วนของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญของมัยโคแบคทีเรีย ถ้าขาดแหล่งไนโตรเจนจะทำให้มัยโคแบคทีเรียเจริญได้น้อยลง ส่วนใหญ่ใช้ asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่สามารถใช้ alanine, glutamine หรือ glutamic acid แทนได้โดยพบว่า glutamate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีกว่า asparagine และพบว่าในอาหารที่มี glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน เอนไซม์ asparaginase จะถูกยับยั้งการทำงาน (Masood et al., 1985)

การเลี้ยง *M. smegmatis* บนอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีททั้ง 8 ชนิด ได้แก่ NA, AIA, Bennett's medium, Emerson Agar, Glucose Asparagine Agar, Yeast-Extract Glucose Medium, ISP2 และ Mueller-Hinton Agar พบว่าเชื้อ *M. smegmatis* สามารถเจริญได้บนอาหารทั้ง 8 ชนิด แต่ขนาดโคโลนีของ *M. smegmatis* มีขนาดแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร โดยอาหาร NA และ AIA มีขนาดโคโลนีของ *M. smegmatis* เล็กที่สุด ถัดมาในอาหาร

Bennett's medium, Emerson Agar, Glucose Asparagine Agar, ISP2 และ Mueller-Hinton Agar ส่วนในอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium โคโลนีของ *M. smegmatis* มีขนาดใหญ่ที่สุด เมื่อสังเกตองค์ประกอบของอาหารในแต่ละชนิดจะประกอบด้วย glucose เป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณเท่ากัน ยกเว้น NA และ AIA ไม่มี glucose เป็นองค์ประกอบจึงทำให้เชื้อเจริญช้า โคโลนีมีขนาดเล็ก ส่วนอาหารอีก 6 ชนิดที่เหลือมี glucose ในปริมาณที่เท่ากัน เมื่อสังเกตสารที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ แต่สิ่งที่เหมือนกันคือมี yeast extract เป็นส่วนประกอบ ยกเว้น อาหาร Glucose Asparagine Agar ที่มี asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เมื่อเทียบปริมาณแล้วค่อนข้างน้อย โดยในอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium มีปริมาณ yeast extract ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนมากกว่าอาหารอีก 5 ชนิด นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของวิตามินซึ่งอาจส่งเสริมการเจริญของ *M. smegmatis* ทำให้เชื้อ *M. smegmatis* เจริญดี ทำให้โคโลนีมีขนาดใหญ่กว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารอื่นๆ ดังนั้นจึงได้เลือกใช้อาหาร Yeast-Extract Glucose Medium ในการทดลองต่อไป

3. **การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ**

การผลิตสาร secondary metabolites เช่น สารปฏิชีวนะ โดยทั่วไปจะผลิตระหว่างระยะ idiophase ซึ่งสาร secondary metabolites บางชนิดจะมีหน้าที่พิเศษในบางช่วงชีวิตของจุลินทรีย์ โดยสาร secondary metabolites บางชนิดผลิตขึ้นเมื่อมีการสร้างโครงสร้างพิเศษ และสาร secondary metabolites ที่ผลิตขึ้นมาเป็นสารผสมของสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือใกล้เคียงกัน การผลิตสาร secondary metabolites จะเกี่ยวข้องกับ secondary structures และกระบวนการ differentiation ในแอคติโนมัยสีท เช่น การสร้าง aerial mycelium และ การสร้างสปอร์ ซึ่งสัมพันธ์กับสภาวะที่จำกัดการเจริญในช่วง vegetative growth เช่น aeration, ค่าพีเอช, ionic environment เป็นต้น (Kalakoutskii and Agre, 1976)

การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ จะผ่านการทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ 2 ขั้นตอนคือ ขั้นปฐมภูมิ และขั้นทุติยภูมิ การทดสอบขั้นปฐมภูมิเป็นการทดสอบเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลทบนอาหารแข็ง ระดับความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ และแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ตามความสามารถที่แอคติโนมัยสีทสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญได้ ส่วนการทดสอบขั้นทุติยภูมิมีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษา ศึกษาความแปรผันขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นข้อมูลในการผลิตสารปฏิชีวนะ (Emerson, et al., 1946) ซึ่งบางครั้งแอคติโนมัยสีทบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบในขั้นปฐมภูมิ แต่ในการ

ทดสอบขั้นทุติยภูมิอาจไม่พบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบเนื่องจากแอคติโนมัยสีทไม่สร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว (Waksman, 1950, p. 107)

การทดสอบในขั้นปฐมภูมิโดยวิธี streak plate จะทำการ streak แอคติโนมัยสีทเป็นเส้นตรงตามแนวกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันเพื่อให้แอคติโนมัยสีทมีการสร้างสารปฏิชีวนะออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อครบกำหนดเวลาในการบ่มเชื้อ นำจุลินทรีย์ทดสอบซึ่งได้แก่ *M. smegmatis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *C. albicans* มา streak ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ตั้งฉากกับแนวการเจริญของแอคติโนมัยสีทโดย streak ให้ชิดกับแนวของแอคติโนมัยสีทมากที่สุด หลังจากบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีแอคติโนมัยสีทบางไอโซเลทสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยจะสังเกตได้จากรอยการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งไม่พบรอยการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบเข้าใกล้แนวของแอคติโนมัยสีท จากผลการทดลองพบว่าแอคติโนมัยสีทบางไอโซเลทมีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ตั้งแต่ 1 ชนิดจนถึง 6 ชนิด อาจเนื่องมาจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลทนั้นสามารถสร้างสารหลายชนิดในเวลาเดียวกัน หรืออาจสร้างสารชนิดเดียวแต่มีผลต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด (Brock, 1966) ดังนั้นการทดสอบขั้นปฐมภูมินี้จึงมีแอคติโนมัยสีทจำนวน 46 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติโนมัยสีทยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบชนิดอื่นๆ ได้อีกซึ่งมีรูปแบบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่แตกต่างกัน

การทดสอบขั้นทุติยภูมิ เป็นการนำแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* จากการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิมาเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast-Extract Glucose Medium เพื่อดูความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว โดยนำน้ำหมักส่วนใสที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วแยกเซลล์ของแอคติโนมัยสีทออก มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยใช้วิธี agar well diffusion จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกจากการทดสอบขั้นปฐมภูมิจำนวน 46 ไอโซเลท หลังจากการทดสอบขั้นทุติยภูมิพบว่ามี แอคติโนมัยสีทจำนวน 8 ไอโซเลทคือ SS1-14, SS1-16, SS1-17, KY2-2, PL3-36, PL3-37, PL3-39 และ PL4-1 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ได้ โดยสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุมที่หยดน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทหยดลงไป โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสของทั้ง 8 ไอโซเลทเรียงตามลำดับดังนี้ 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 และมีอยู่ 3 ไอโซเลทคือ SS1-14, KY2-2 และ PL4-1 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส 17±0.0 มิลลิเมตร ซึ่งมี

ขนาดกว้างมากที่สุดในแอคติโนมัยสีททั้ง 8 ไอโซเลท ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ถูกยับยั้งไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ปฏิกิริยาว่าอ่อน (weak) หรือ ไว (active) ของสารปฏิชีวนะ บริเวณที่ถูกยับยั้งกว้าง อาจเกิดจากการปล่อยสารปฏิชีวนะที่อ่อนในปริมาณมาก และถ้าบริเวณที่ถูกยับยั้งแคบอาจเกิดจากการปล่อยสารปฏิชีวนะ ที่มีความแรงในปริมาณน้อย (Brock, 1966)

การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทเพื่อทำการผลิตสารปฏิชีวนะในถังหมัก จากการทดสอบขั้นทุติยภูมิมีแอคติโนมัยสีทจำนวน 3 ไอโซเลทคือ SS1-14, KY2-2 และ PL4-1 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส 17±0.0 มิลลิเมตร โดยแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลทมีรูปแบบในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบแตกต่างกัน โดยไอโซเลท SS1-14 และ PL4-1 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้ง 6 ชนิด ส่วนไอโซเลท KY2-2 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบเพียง 4 ชนิด คือ *M. smegmatis*, *E. coli*, *B.subtilis* และ *S. aureus*

การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทเพื่อทำการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยปกติจะคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ในช่วงกว้าง จากการสังเกต *M. tuberculosis* ดื้อต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้กันโดยทั่วไปซึ่งมีการออกฤทธิ์ในช่วงกว้าง จึงเป็นข้อจำกัดต่อการรักษาโดยเคมีบำบัด และเป็นสาเหตุของการรักษาที่ล้มเหลว (McKinney, 2000) ดังนั้นจึงได้เลือกแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ซึ่งมีรูปแบบในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบน้อยชนิดกว่าไอโซเลท SS1-14 และ PL4-1 ซึ่งคาดว่ามีความสามารถยับยั้งจำเพาะกับ *M. smegmatis* จึงได้เลือกไอโซเลท KY2-2 มาทำการผลิตสารปฏิชีวนะในถังหมักในการทดลองต่อไป

4. **การผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ในถังหมัก**

การเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ในถังเพื่อศึกษาอัตราการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ เทียบกับระยะเวลาการสร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งทดสอบโดยวิธี agar well diffusion เมื่อดูจากเส้นกราฟการเจริญของเชื้อ KY2-2 ในภาพ 12 ไม่พบการเจริญในระยะ lag phase แต่พบการเจริญในระยะ log phase โดยไม่ผ่านการเจริญในระยะ lag phase ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์ต้องการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ และเมื่อปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ได้แล้ว จึงเริ่มมีการแบ่งเซลล์ และเพิ่มจำนวนเซลล์จึงสิ้นสุดการเจริญระยะ lag phase ช่วงเวลาของระยะ lag phase อาจสั้นยาวแตกต่างกันไป ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และชนิดของจุลินทรีย์ เช่นการนำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดหนึ่งไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเดิมระยะ lag phase จะสั้น หรือถ้าลงเชื้อที่พร้อมจะแบ่งตัว (ในปลายระยะ lag phase หรือในระยะ log phase) ลงในอาหารใหม่ ระยะ lag phase จะสั้นเช่นกัน (เสาวนีย์ ธรรมสถิติ, 2547, หน้า 26)

การเจริญในระยะ log phase เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 21 ซึ่งหาได้จากการลากเส้นตรงในช่วงที่กราฟเป็น exponential ตัดกับเส้นตรงที่ลากจากกราฟในช่วง stationary ที่

จุดตัดของเส้นตรง 2 เส้นลากเส้นตรงอีกเส้นตั้งฉากกับแกน y ซึ่งเป็นแกนที่บอกจำนวนชั่วโมง ซึ่งจะได้ช่วงของ log phase เข้าสู่การเจริญในระยะ stationary phase จนถึงชั่วโมงที่ 84 ก่อนเข้าสู่ระยะการเจริญในระยะ death phase เมื่อเทียบการเจริญกับค่าพีเอช พบว่าการเจริญในระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 9 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชมีเพียงเล็กน้อยจาก 7.50 ไปเป็น 7.54 แต่หลังจากชั่วโมงที่ 9 ค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 8.33 ในชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ และค่อยๆ ลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 33 จนมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.63 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อเริ่มเข้าสู่การเจริญในระยะ stationary phase หลังจากนั้นค่าพีเอชค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่าพีเอชเท่ากับ 9.51 ในชั่วโมงที่ 66 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อเริ่มเข้าสู่การเจริญระยะ death phase และหลังจากนั้นค่าพีเอชค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งเท่ากับ 10.48 ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ

แอคติโนมัยสีทสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างอย่างง่าย และโครงสร้างซับซ้อนหลายชนิด เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน โดยมี glucose, maltose, dextrin, starch, glycerol, organic acids และ โปรตีน เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose และ โปรตีน หรืออนุพันธ์ของโปรตีนเช่น peptone พบว่าแอคติโนมัยสีทจะใช้ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนในอันดับแรก ไม่ใช่แหล่งไนโตรเจน ส่วนไนโตรเจนที่เป็นของเสียจะอยู่ในรูปของ ammonia (Waksman, 1950, pp 80-81)

จากกราฟแสดงค่าพีเอชในภาพ 11 ช่วงชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 9 ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย คาดว่าเป็นช่วงที่ลงกล้าเชื้อในถังหมัก หลังจากชั่วโมงที่ 9 ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนถึง 8.33 ในชั่วโมงที่ 18 ช่วงระยะเวลาที่ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นนี้คาดว่าเกิดจากการสะสมแอมโมเนีย ที่เกิดขึ้นจากการที่แอคติโนมัยสีทใช้ yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนแทน glucose หลังจากชั่วโมงที่ 18 ค่าพีเอชลดลงจนถึง 7.63 ในชั่วโมงที่ 33 คาดว่าแอคติโนมัยสีทเปลี่ยนกลับมาใช้ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการผลิตกรดเกิดขึ้น จึงทำให้ค่าพีเอชลดลง เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่อาหารสำหรับการเจริญเริ่มหมด หลังจากชั่วโมงที่ 33 ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนถึง 9.51 ในชั่วโมงที่ 66 ค่าพีเอชที่เพิ่มสูงขึ้นอาจเนื่องจากมีการสะสมของ ammonia หรือของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม จึงทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจนถึง 10.48 ในวันที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนระยะเวลาการสร้างสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีท KY2-2 ซึ่งทดสอบโดยวิธี agar well diffusion จะเริ่มเห็นบริเวณใสของ *M. smegmatis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชัดเจนในชั่วโมงที่ 51 ซึ่งเป็นช่วงการเจริญในระยะ stationary phase และเห็นบริเวณใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ที่สุดในชั่วโมงที่ 54 ถึงชั่วโมที่ 57 มีขนาด 15 มิลลิเมตร หลังจากนั้นบริเวณใสมีขนาดค่อยๆ

ลดลงจนเหลือ 9 มิลลิเมตรในชั่วโมงที่ 96 และคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 192 หลังจากนั้นไม่เห็นบริเวณใสของเชื้อ *M. smegmatis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองระยะเวลาที่คาดว่าเหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทเพื่อผลิตสร้างปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ควรเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาประมาณ 3-5 วัน เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่สารปฏิชีวนะที่เชื้อผลิตขึ้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* มากที่สุด

จากผลการทดลองในตาราง 11 จะเห็นว่า ช่วงเวลาที่แอคติโนมัยสีทสร้างสารปฏิชีวนะและทำให้เห็นบริเวณใสในชั่วโมงที่ 51 จนถึงชั่วโมงที่ 192 มีค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 8.23 ถึง10.42 และในช่วงเวลาที่มีปริมาณสารปฏิชีวนะที่ทำให้เห็นบริเวณใสกว้างที่สุดมีค่าพีเอช อยู่ระหว่าง 8.45 ถึง 9.01 จากการควบคุมอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักในช่วงชั่วโมงที่ 51 ถึงชั่วโมงที่ 240 ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 9.00 ซึ่งคาดหวังว่าจะสามารถคงปริมาณและความสามารถในการทำให้เห็นบริเวณใสของ *M. smegmatis* ให้มีค่าใกล้เคียงกับชั่วโมงที่ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด พบว่าผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าชั่วโมงที่ 60 มีขนาดบริเวณใส 12 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดกว้างที่สุด และจะมีขนาดลดลงจนมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตรในชั่วโมงที่ 108 และเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 192 หลังจากนั้นไม่พบบริเวณใสของ *M. smegmatis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคล้ายกับผลของการเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการควบคุมพีเอช ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงว่าค่า พีเอชไม่มีผลต่อปริมาณและความสามารถในการทำให้เห็นบริเวณใสของ *M. smegmatis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพีเอชและความคงตัวของสารปฏิชีวนะ Narayana และ Vijayalakshmi (2008) โดยสารปฏิชีวนะจะมีความคงตัวและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในช่วงของค่าพีเอชที่มีความเป็นกลาง แต่เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นหรือลดลง จะทำให้ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลง โดยดูจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส จากการศึกษากับ *B. subtilis* ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7 มีขนาดของบริเวณใสเท่ากับ 20 มิลลิเมตร แต่เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 9 จะไม่พบขนาดของบริเวณใส

Al-Zahrani (2007) ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการสร้างสารปฏิชีวนะใน *Streptomyces* J12 เพิ่มว่าค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.2 จะให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสของจุลินทรีย์ทดสอบกว้างที่สุดประมาณ 25 มิลลิเมตร แต่ถ้าค่าพีเอชเริ่มต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นเป็น 8 จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสประมาณ 20 มิลลิเมตร แต่

ถ้าค่าพีเอชเริ่มต้นลดลงเท่ากับ 5.5 จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสประมาณ 10 มิลลิเมตร

5. การสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากแอคติโนมัยไอโซเลท KY2-2

การสกัดสารปฏิชีวนะจากน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ในถังหมักเป็นเวลา 5 วัน ส่วนน้ำใสจะถูกสกัดด้วย ethyl acetate ซึ่งเป็นการสกัดแบบ liquid-liquid extraction โดยอาศัยความสามารถในการละลายของสาร ในการสกัดสารจะเป็นการดูดซับสารจากสารละลายหนึ่ง และส่งต่อไปยังตัวทำละลาย ในการเลือกตัวทำละลายจะอาศัยคุณสมบัติทาง thermodynamic ซึ่งสัมพันธ์กับความสามารถในการละลายเช่น polarity, dipole-dipole interaction, proton-donor และ proton-acceptor (Fedeniuk and Shand, 1998)

จากการทดลองสกัดสารปฏิชีวนะจากน้ำหมักส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีท ไอโซเลท KY2-2 ในถังหมักด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 ประมาณ 1 ชั่วโมง นั้นสามารถสกัดสารปฏิชีวนะจากส่วนน้ำใส ซึ่งการตรวจสอบฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่สกัดด้วย ethyl acetate ในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยชั่งสารปฏิชีวนะที่สกัดได้มา 60 มิลลิกรัม ละลายใน 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ 12,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดปฏิชีวนะที่ละลายใน 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส 12 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับน้ำหมักส่วนใสก่อนการสกัดด้วย ethyl acetate ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส 8 มิลลิเมตร และส่วนน้ำใสหลังการสกัดด้วย ethyl acetate ซึ่งไม่พบบริเวณใสแต่อย่างใด

6. การตรวจสอบความไวของ *M. smegmatis* ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดด้วยการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี broth dilution

ผลการตรวจสอบความไวของ *M. smegmatis* ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ด้วยการหาค่า MIC โดยวิธี broth dilution พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากการหาค่า MIC โดยวิธี broth dilution เป็นการสังเกตการเจริญของ *M. smegmatis* ในอาหาร Mueller-Hinton broth ที่มีสารปฏิชีวนะที่สกัดได้ผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* คือ ค่า MIC ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลองคือ 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, 512, 256, 128, 64 และ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบการเจริญของ *M. smegmatis* ที่ผิวหน้าของอาหาร แต่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงมาจะพบการเจริญของเชื้อที่บริเวณผิวหน้าอาหาร และพันกันเป็นสายจากผิวหน้าอาหารลงสู่ก้น

หลอด ดังนั้นในการสังเกตผลการทดลองต้องเขย่าเชื้อทุกหลอดให้ผสมกัน ความไวของ *M. smegmatis* ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 มีค่า MIC เท่ากับ 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากรายงานของ Omura และคณะ (1976) ได้ค้นพบสารปฏิชีวนะ Asukamycin จาก *Streptomyces* จากการทดสอบหาค่า MIC กับ *M. smegmatis* ATCC 607 มีค่า MIC มากกว่า 100 มิลลิกรัม/มิลลิตร และ Omura และคณะ (1977) พบสารอัลคาลอยด์ AM-2282 จาก *Streptomyces* จากการทดสอบหาค่า MIC กับ *M. smegmatis* ATCC 607 มีค่า MIC เท่ากับ 50 มิลลิกรัม/มิลลิตร

7. **การสกัดสารปฏิชีวนะด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ** (Thin-layer chromatography)

การสกัดสารปฏิชีวนะด้วยเทคนิค TLC เป็นวิธีการแยกองค์ประกอบของสารแต่ละชนิดในสารตัวอย่างออกจากกันบนแผ่น TLC ซึ่งเป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ที่เคลือบอยู่บนวัสดุรองรับที่เป็นแผ่นระนาบ โดยการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมในการนำพาสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC และทำให้เกิดการแยกสารออกจากกัน จากการทดลองระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 พบว่าสารละลายผสมระหว่าง ethyl acetate : methanol ในอัตราส่วน 25 : 1 เป็นระบบที่เหมาะสมต่อการแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอคติโนมัยสีทรหัส KY2-2 เมื่อนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร จะเห็นแถบของสารที่เรืองแสง แยกห่างออกจากกันประมาณ 4 แถบ นับจากด้านล่างขึ้นข้างบนโดยแต่ละแถบจะมีอัตราการเคลื่อนที่ของสาร (Rf) เท่ากับ 0.28, 0.31, 0.71 และ 0.86

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

การทำไบโอออโทกราฟีเป็นการตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกออกจากกันบนแผ่น TLC ซึ่งสารที่อยู่บนแผ่น TLC มีปริมาณน้อยและยังถูกดูดซับบนแผ่น TLC ไม่ใช่เป็นสารละลาย นอกจากนี้ความสามารถในการแพร่ของสารแต่ละชนิดที่ถูกดูดซับบนแผ่น TLC ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อย่อมมีผลต่อการแสดงฤทธิ์ของสาร และสารแต่ละจุดที่แยกออกจากกันบนแผ่น TLC มีปริมาณน้อย ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อความไวในการตรวจสอบฤทธิ์ (ปนัดดา พัฒนาวศิน, 2550, หน้า 118-119)

จากผลการทดลองตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของสารปฏิชีวนะที่ถูกแยกออกจากกันบนแผ่น TLC โดยวิธี agar diffusion bioautography จะเห็นบริเวณ

ใสเกิดขึ้นรอบๆ แผ่น TLC ในลักษณะซ้อนเหลื่อมกัน 2 วง แสดงว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 สร้างสารปฏิชีวนะที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่น TLC และเมื่อนำไปเทียบกับผลของแผ่น TLC ภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่าจุดศูนย์กลางของบริเวณใสที่ซ้อนเหลื่อมกัน 3 วง โดยวงแรกตรงกับแถบเรืองแสงที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.28 และ 0.31 ส่วนวงที่สองตรงกับแถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.71 และวงที่สามที่มีขนาดเล็กที่สุดอยู่ตรงกับแถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.86