สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	สมมติฐานของการวิจัย	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท	4
	การแยกแอคติโนมัยสีทเพื่อการคัดเลือก	6
	สารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีท	8
	การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ	9
	ลักษะทั่วไปของมัยโคแบคทีเรีย	10
	สารต้านแบคทีเรีย	12
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	15
	อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	15
	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	15
	การเก็บตัวอย่างดิน	16
	การแยกแอคติโนมัยสีท	16
	การทดสอบการเจริญของ *M.smegmatis* บนอาหารที่ใช้เลี้ยงแอคติโนมัยสีท	17
	การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือกในถังหมัก	20
	การสกัดสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือก	20
	การหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) ของสารสกัดจากแอคติโนมัยสีท สายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยวิธี Broth dilution	21
	การสกัดแยกสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (Thin-layer chromatography)	21
	การทำไบโอออโทกราฟี (Bioautography) เพื่อตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M.smegmatis* โดยวิธี agar diffusion bioautography	22
4	**ผลการทดลอง**	23
	การแยกแอคติโนมัยสีท	23
	การทดสอบการเจริญของ *M.smegmatis* บนอาหารสำหรับใช้เลี้ยงแอคติโนมัยสีท	24
	การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ	27
	การผลิตสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือกในถังหมัก	49
	การสกัดสารปฏิชีวนะจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่คัดเลือก	60
	การตรวจสอบความไวของ M.smegmatis ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดได้ด้วยการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี broth dilution	62
	การสกัดสารปฏิชีวนะด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (Thin-layer chromatography)	63
	การทำไบโอออโทกราฟี (Bioautography) เพื่อตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M.smegmatis* โดยวิธี agar diffusion bioautography	65

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
5	อภิปรายผล และสรุปผลการทดลอง	66
	สรุปผลการวิจัย	66
	อภิปรายผลการวิจัย	69
บรรณานุกรม		80
ภาคผนวก		90
ประวัติผู้วิจัย		95

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

1 การเตรียมตัวอย่างดินก่อนนำไปแยกแอคติโนมัยสีท..... 7

2 สารปฏิชีวนะที่ได้จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการรักษาวัณโรค..... 13

3 สารปฏิชีวนะต้านมัยโคแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ 14

4 จำนวนแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างดิน..... 23

5 การเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเวลา 3 วัน..... 25

6 การทดสอบขั้นปฐมภูมิของแอคติโนมัยสีทจำนวน 137 ไอโซเลทใน
การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบบนอาหาร Yeast-Extarct
Glucose Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส..... 27

7 จำนวนการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยการทดสอบขั้นปฐมภูมิ
ของแอคติโนมัยสีทจำนวน 137 ไอโซเลท บนอาหาร Yeast-Extract
Glucose Medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส..... 33

8 จำนวนแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ
จุลินทรีย์ทดสอบในขั้นปฐมภูมิ..... 33

9 ลักษณะของแอคติโนมัยสีทที่ยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis*
จากการทดสอบขั้นปฐมภูมิ 34

10 รูปแบบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยแอคติโนมัยสีท
จำนวน 8 ไอโซเลทที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis*
ในการทดสอบขั้นทุติยภูมิ 42

11 การเจริญของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ในรูปค่าความขุ่นที่
ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ
และการผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยวัดขนาดเส้น
ผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส..... 49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

12 ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง
ของบริเวณใส จากการควบคุมพีเอชของอาหาร..... 59
13 การยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* โดยสารสกัดปฏิชีวนะ
เทียบกับตัวควบคุม..... 61

สารบัญภาพ

ภาพ **หน้า**

1 การเจริญของ *M. smegmatis* บนอาหารชนิดต่างๆ..... 26

2 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท SS1-1, SS1-3, SS1-4, SS1-6, SS1-9, และ SS1-12 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis* 43

3 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท SS1-14, SS1-15, SS1-16, SS1-17, SS1-19, และ SS1-20 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis* 43

4 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CM1-1, CM1-3, CM2-4, CM2-6, CM3-2, และ CM5-3 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis* 44

5 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CM5-4, CM7-1, CM7-2, KY1-1, KY1-2, และ KY2-2 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis* 44

6 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท NN1-1, PL1-2, PL1-5, PL1-6, PL1-10, และ Control ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis* 45

7 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PL3-1, PL3-2, PL3-13, PL3-17, PL3-23, และ PL3-24 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis* 45

8 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PL3-25, PL3-29, PL3-32, PL3-36, PL3-37, และ PL3-38 ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis* 46

9 ผลการทดสอบขั้นทุติยภูมิของสารที่ผลิตจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท PL3-39, PL4-1, PL4-4, PL4-17, PL4-19, และ Control ที่มีต่อการเจริญของ *M. smegmatis* 46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

10 ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท SS1-14, KY2-2 และ PL1-4 บนอาหาร Yeast-Extract Glucose Medium 47

11 ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์ของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด..... 48

12 กราฟการเจริญของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 และค่าพีเอช (pH) กับเวลา (ชั่วโมง) 53

13 กราฟการเจริญของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 และฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่แอคติโนมัยสีทผลิตขึ้นในการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis*..... 54

14 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15..... 55

15 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 18, 21, 24, 27, 30 และ 33..... 55

16 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 36, 39, 42, 45, 48 และ 51..... 56

17 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 54, 57, 60, 63, 66 และ 69..... 56

18 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 72, 78, 84, 90, 96 และ 102 57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

19 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 108, 114, 120, 132, 144 และ 156 57

20 ผลการยับยั้งการเจริญของ *M. smegmatis* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ชั่วโมงที่ 168, 180, 192, 204, 216, 228 และ 240 58

21 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสของสารทดสอบ น้ำหมัก (ส่วนใส) ก่อนการสกัดด้วย ethyl acetate (1), สารสสกัดปฏิชีวนะละลายใน 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO (2), ส่วนน้ำใสหลังการสกัดด้วย ethyl acetate (3), สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ DMSO (4) และอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Extract Glucose Medium (5)..... 61

22 อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ผสมสารสกัดจากแอคติโนมัยสีทไอโซเลท KY2-2 ก่อนใส่กล้าเชื้อ *M.smegmatis*..... 62

23 การตรวจสอบความไวของ *M. smegmatis* ต่อสารปฏิชีวนะที่สกัดได้ด้วยการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี broth dilution..... 63

24 แถบของสารปฏิชีวนะที่ถูกสกัดแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร..... 64

25 ผลการทำไบโอออโทรกราฟี เปรียบเทียบกับแผ่น TLC ภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร..... 65