บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างในทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทย 119 ตัวอย่าง พบว่าส่วนใหญ่เป็นฟองน้ำซึ่งมีมากถึงร้อยละ 45 ของตัวอย่างทั้งหมด และจากการทดลองแยก แอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดังกล่าว พบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 58 สายพันธุ์ โดยมาจากตัวอย่างประเภทฟองน้ำมากที่สุดคือ 23 สายพันธุ์ แต่เมื่อพิจารณาค่าดัชนีการแยกพบว่าสาหร่ายเป็นตัวอย่างที่ให้ค่าดัชนีการแยกสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.92 ดังนั้นสาหร่ายจึงเป็นตัวอย่างที่มีศักยภาพในการเป็นแหล่งของแอคติโนมัยสีทในทะเลได้ดีที่สุดด้วยเช่นกัน

จากการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 4 สูตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งสูตรที่มีตะกอนดินและเฟอริกฟอสเฟตเป็นองค์ ประกอบสามารถใช้แยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากทะเลได้มากที่สุด โดยสามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ 28 และ 23 สายพันธุ์ตามลำดับ และยังพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งทั้งสองชนิดดังกล่าวสามารถใช้แยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างที่เก็บจากทะเลเกือบทุกชนิด

ในการศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบทั้ง 208 ชนิดต่อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 6 ชนิด พบว่าร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 5-10 ยกเว้น *B. subtilis* ที่มีร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุดคือ 18 และพบว่าไม่มีสารสกัดหยาบชนิดใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้เลย

จากผลการคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทสำหรับผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวทั้ง 4 ชนิดสามารถใช้ผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ใกล้เคียง โดยอาหารสูตรที่เลียนแบบธรรมชาติ (สูตร A) สามารถใช้ผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุด โดยคิดเป็นร้อยละ 35 ของสารสกัดหยาบที่ผลิตจากอาหารสูตร A อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดหยาบที่ผลิตจากอาหารสูตรนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ในขณะที่อาหารสูตร B ซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ เป็นอาหารที่ใช้ผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยที่สุด โดยคิดเป็นร้อยละ 27 ของสารสกัดหยาบที่ผลิตจากอาหารสูตร B และยังพบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตรดังกล่าวมีคุณสมบัติยับยั้งการ

เจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของแหล่งแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่สร้างโดยแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากฟองน้ำ โดยมีจำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเท่ากับ 33 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่อสารสกัดหยาบทั้งหมดที่มาจากตัวอย่างแต่ละชนิด พบว่าสาหร่ายมีร้อยละดังกล่าวมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 43.75 ดังนั้นสาหร่ายจึงเป็นแหล่งของแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ดีที่สุด

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบทั้ง 208 ชนิด เมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ในช่วงกว้าง พบว่ามีสารสกัดหยาบเพียง 11 ตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป และในจำนวนสารสกัดหยาบทั้ง 11 ตัวอย่าง พบว่ามีถึง 4 ตัวอย่างที่มาจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053 เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่ว่าจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรใด ก็ยังให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหมือนกัน กล่าวคือสารสกัดหยาบ CNA053A, CNA053B, CNA053C และ CNA053D มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหมือนกัน ดังนั้นจึงเลือก CNA053C เป็นสารสกัดหยาบเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เมื่อทดลองเลี้ยงแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053 ในอาหารสูตร C ปริมาตร 8.7 ลิตร แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท จะผลิตสารสกัดหยาบ CNA053C ได้ 1.0 กรัม จากนั้นจึงแยกส่วนเมทานอลและเฮกเซน ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าส่วนที่ละลายในเมทานอลซึ่งมีปริมาณ 792.2 มิลลิกรัม มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำไปแยกสารที่มียับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี flash column chromatography แบบ normal phase จากการทดลองสามารถแยกสารได้ทั้งหมด 8 fraction เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า fraction ที่ 5 (F5) ที่ถูกชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เอทิลอะซิเตท (20:80) มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. faecalis* (MIC เท่ากับ 0.58, 0.29 และ 0.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

จากการแยกสาร Fraction ที่ 5 (F5) ซึ่งถูกชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เอทิลอะซิเตท (20:80) มาทดลองแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี flash column chromatography แบบ reversed phase แยกสารได้ทั้งหมด 3 ส่วน และจากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า fraction ที่ 5.2 (F5.2) ซึ่งถูกชะด้วยเมทานอล:น้ำ (80:20) มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด

โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* และ *S. sonnei* (MIC เท่ากับ 0.53, 0.146, 0.29, 9.375, 150 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

และเมื่อนำสารสกัด fraction ที่ 5.2 (F5.2) ซึ่งถูกชะด้วยเมทานอล:น้ำ (80:20) มาทดลองแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อ โดยวิธี preparative TLC แบบแผ่น จากการทดลองพบว่าแยกสารได้ 4 ส่วน แต่สารที่ได้ยังไม่มีความบริสุทธิ์ อีกทั้งการทดลองแยกสารโดยวิธีนี้ยังทำให้สูญเสียสารปริมาณมาก ดังนั้นจึงทดลองแยกสารโดยวิธี HPLC จากการทดลองในการใช้เฟสเคลื่อนที่ระบบไอโซเครติก สามารถแยกสารได้ 15 ส่วน เก็บสารแต่ละส่วน พบว่าส่วนที่ 8 – 12 มีพีกที่แยกออกจากกันไม่ชัดเจนและมีลักษณะสีเหลืองจนถึงส้มเข้ม นำส่วนที่ 10 ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดมาทดลองแยกต่อด้วย HPLC สภาวะเหมือนเดิม สามารถแยกสารได้ 3 ส่วนคือ 10.1, 10.2 และ 10.3 พบว่าทั้ง 3 ส่วนนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียใกล้เคียงกัน แยกทั้ง 3 ส่วนโดยวิธี HPLC แต่เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นแบบระบบเกรเดียน เมทานอล:น้ำ (45:55) จนถึง เมทานอล:น้ำ (100:0) ผลปรากฏว่าพบพีก 2 พีกที่อยู่ติดกัน ทำให้ยังไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้ได้