บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

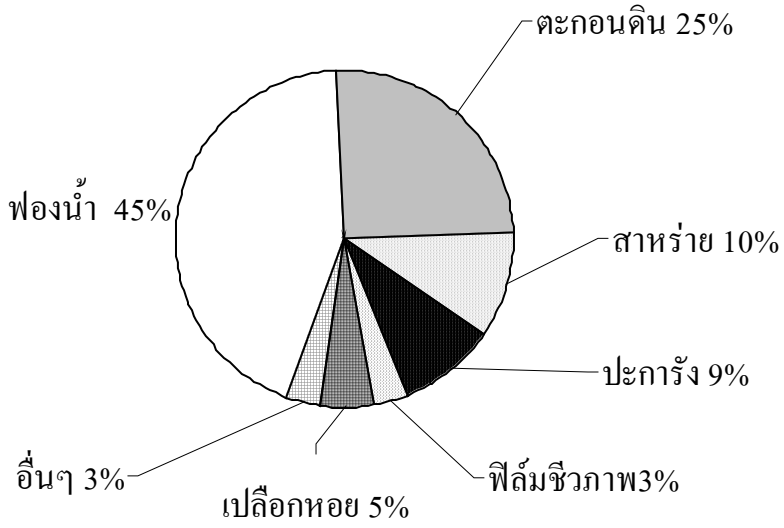
1. การเก็บตัวอย่าง

จากการเก็บตัวอย่างในทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทย ทั้งฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตกรวมทั้งหมด 4 แห่ง ได้แก่ เกาะเต่าและเกาะนางยวน จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยเก็บตัวอย่างบริเวณชายหาดและในน้ำทะเลระดับความลึก 1-50 ฟุต แหล่งที่ 2 คือ กองหินโลซินและหาดวาสุกรี จังหวัดปัตตานี โดยเก็บตัวอย่างบริเวณชายหาดวาสุกรีและในน้ำทะเลบริเวณรอบๆกองหินโลซินที่ระดับความลึก 30-70 ฟุต แหล่งที่ 3 คือ ชายหาดจังหวัดตรัง, กระบี่ และภูเก็ต และแหล่งที่เก็บตัวอย่างแหล่งสุดท้ายคือท่าเรือปากบารา จังหวัดสตูล บริเวณที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นหาดทรายและโขดหินในแนวน้ำขึ้นน้ำลง ดังนั้นสิ่งมีชีวิตบริเวณนี้ต้องปรับตัวกับสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงมากในแต่ละช่วงเวลา ได้แก่ปริมาณน้ำ, ความเค็มของน้ำ, อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงในช่วงกลางวันและกลางคืน รวมไปถึงแสงแดดในช่วงกลางวัน (Mitchell และคณะ, 2004) และบริเวณน้ำลึกประมาณ 10-30 เมตร ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ตามระบบนิเวศน์ในแต่ละแห่ง เช่น แนวปะการัง โขดหินหรือเนินทราย เป็นต้น

ตารางที่ 11 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างจาก 4 แหล่ง

Table 11 Details on specimens collecting trops

Location	Date	Collection method	Depth (ft)	Number of specimens
1	May 22, 2003	On-shore, Scuba diving	1-50	28
2	Jun 15,2003	On-shore, Scuba diving	0, 30-70	68
3	Jul 8-10, 2003	On-shore	0-5	12
4	Dec 17, 2003	On-shore	0-5	11
		Total		119



ภาพที่ 1 ร้อยละของชนิดตัวอย่างที่ใช้แยกแอคติโนมัยสีท

Figure 1 Percentage of specimens used for isolation of actinomycetes

จากตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บมาจากสถานที่ทั้ง 4 แห่ง จำนวน 119 ตัวอย่าง พบว่า ร้อยละ 45 ของตัวอย่าง คือ ฟองน้ำ รองลงมาคือ ตะกอนดิน (ร้อยละ 25), สาหร่าย (ร้อยละ 10), ปะการัง (ร้อยละ9), เปลือกหอย (ร้อยละ 5), ฟิล์มชีวภาพ (ร้อยละ 3) และอื่นๆ (ร้อยละ3) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 12 ชนิดและจำนวนตัวอย่างจำแนกตามแหล่งที่เก็บ

Table 12 Types and numbers of specimens from marine environment from each collecting site

Location	Number of specimens							
	Sponge	Sediment	Algae	Coral	Biofilm	Shell	Others	Total
1	14	6	0	2	4	2	0	28
2	38	6	9	9	0	2	4	68
3	0	12	0	0	0	0	0	12
4	0	6	3	0	0	2	0	11
Total	52	30	12	11	4	6	4	119

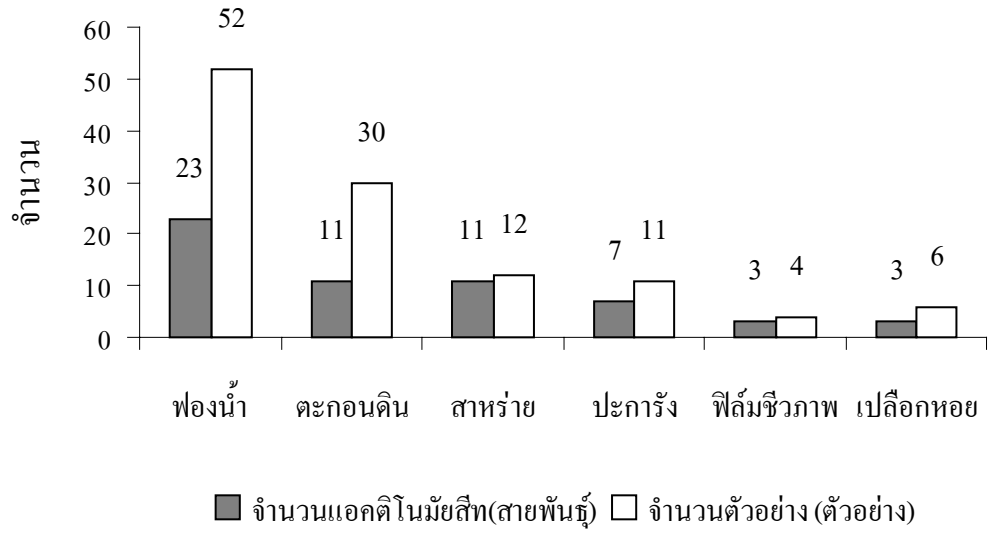
หมายเหตุ แหล่งที่ 1 เกาะเต่าและเกาะนางยวน จังหวัดสุราษฎร์ธานี
แหล่งที่ 2 กองหินโลซินและชายหาดวาสุกรี จังหวัดปัตตานี
แหล่งที่ 3 ชายหาด จังหวัดตรัง, กระบี่ และภูเก็ต
แหล่งที่ 4 ท่าเรือปากบารา จังหวัดสตูล

2. การแยกแอคติโนมัยสีทจากทะเล

2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของตัวอย่างและจำนวนแอคติโนมัยสีทที่แยกได้

จากจำนวนของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างในทะเลจำนวนทั้งหมด 58 สายพันธุ์ พบว่าแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากฟองน้ำมีจำนวนมากที่สุดคือ 23 สายพันธุ์ ในขณะที่แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตะกอนดินและสาหร่ายมีจำนวนเท่ากันคือ 11 สาย

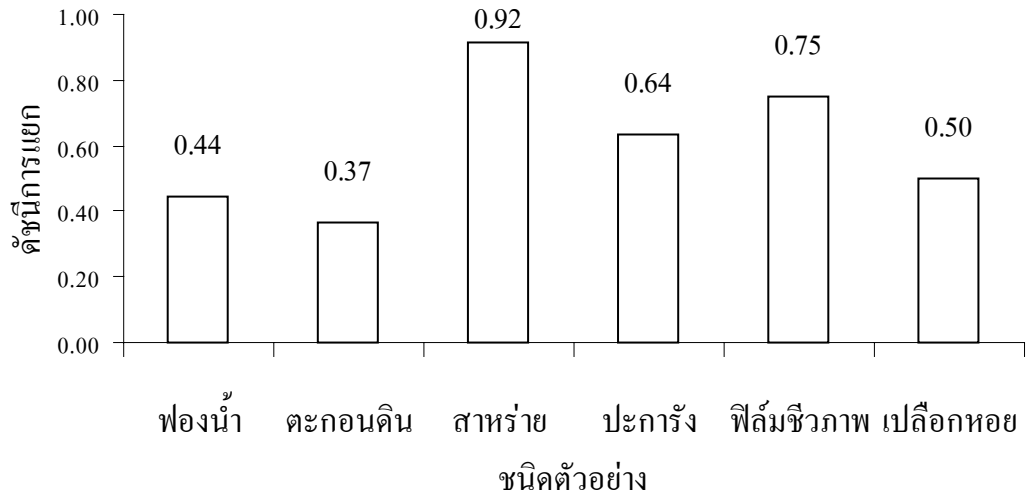
พันธุ์ และมีแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากปะการัง, ฟิล์มชีวภาพและเปลือกหอยจำนวน 7 และ 3 สายพันธุ์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 จำนวนแอคติโนมัยสีทที่แยกได้และจำนวนตัวอย่างที่เก็บจากทะเล

Figure 2 Numbers of isolated marine actinomycetes and collected specimens

เมื่อวิเคราะห์อัตราส่วนของจำนวนแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อ (ภาพที่ 2) จำแนกตามชนิดของตัวอย่าง ซึ่งอาจเรียกได้ว่าค่าดัชนีการแยก (Isolation Index) ที่แสดงถึงศักยภาพในการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างแต่ละชนิด (ภาพที่3) พบว่าค่าดัชนีการแยกของสาหร่ายมีค่าสูงสุดคือ 0.92 หมายถึงโอกาสในการแยกแอคติโนมัยสีทจากสาหร่ายมีความเป็นไปได้สูงมาก ในขณะที่ค่าดัชนีการแยกของตัวอย่างอื่นๆที่มาจากสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังเช่น ปะการัง ฟองน้ำ และฟิล์มชีวภาพนี้มีค่ารองลงมา เป็นที่น่าสังเกตว่าค่าดัชนีการแยกของตัวอย่างที่เป็นตะกอนดินมีค่าน้อยที่สุดคือ 0.37 ค่าดัชนีการแยกนี้จะมีความสำคัญในการบ่งชี้ถึงศักยภาพของตัวอย่างแต่ละประเภท ซึ่งจะเป็นแนวทางในการวางแผนการเก็บตัวอย่างในการแยกแอคติโนมัยสีทต่อไปในอนาคต



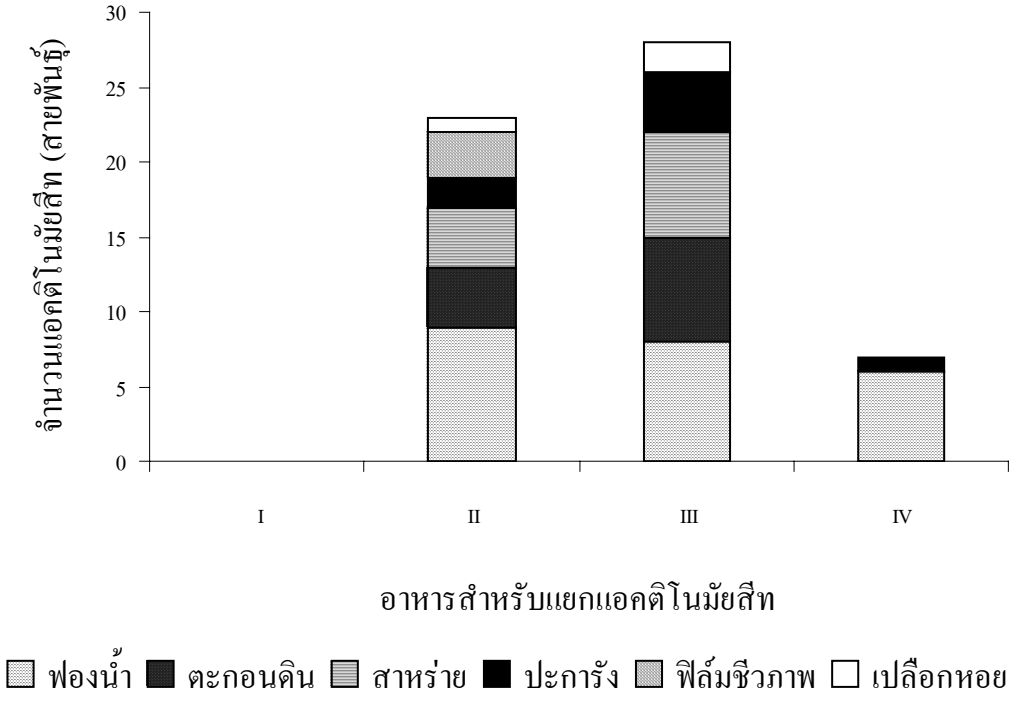
ภาพที่ 3 ค่าดัชนีการแยกแอคติโนมัยสีทจากทะเล

Figure 3 Isolation index of actinomycetes from marine specimens

2.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ในการแยกแอคติโนมัยสีทจากทะเล

ในการศึกษานี้จะแยกแอคติโนมัยสีทโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง 4 สูตรที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน ได้แก่ อาหารสูตร I, II, III และ IV จากการทดลองพบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยสีทจากทะเลได้ทั้งหมด 58 สายพันธุ์ โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ให้จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทมากที่สุดคือ อาหารสูตร III จำนวน 28 สายพันธุ์ อาหารสูตร III นี้ดัดแปลงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Imada และ Okami (1994) ซึ่งมีตะกอนดินเป็นองค์ประกอบหลัก เนื่องจากสารอินทรียวัตถุในดินอาจมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของแอคติโนมัยสีท ตามที่มีรายงานของ Imada และ Okami (1994) ที่แยก *Streptomyces galbus* สายพันธุ์ ISP-5089 จากตะกอนดินในน้ำทะเลลึก 3,400 เมตร บริเวณอ่าวโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น และอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกได้มากเป็นลำดับที่สองคือ อาหารสูตร II ที่แยกแอคติโนมัยสีทได้จำนวนทั้งหมด 23 สายพันธุ์ อาหารสูตร II นี้ ดัดแปลงมาจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่รายงานโดย Mukku และคณะ (2000) โดยมี peptone เป็นองค์ประกอบหลัก ร่วมกับ ferric phosphate เนื่องจากเหตุผลที่เป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำทะเลมีปริมาณ ferric และ ferrous ต่ำหรือแทบไม่มีเลย ดัง

นั้นจึงทำให้ ferric และ ferrous เป็นปัจจัยจำกัดต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในทะเลรวมถึงแอคติโนมัยสีทด้วย ดังนั้นอาหารสูตร II จึงเป็นอาหารที่เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด ดังนั้นต้องมีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยการเติม polymyxin 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและเติม cyclohexamide 20 ไมโครกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งเชื้อรา (Capon *et al.,*2000) ผลการแยก แอคติโนมัยสีทจากทะเลที่ได้ในการศึกษานี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Mukku และคณะ(2000) ในการแยกแอคติโนมัยสีท สายพันธุ์ B3497 จากตะกอนดินทางตอนเหนือของมหาสมุทรแอตแลนติก ที่ระดับความลึก 680 เมตร นอกจากนี้อาหารสูตร IV ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกแอคติโนมัยสีทและให้จำนวนของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้มากเป็นลำดับที่สาม จำนวนทั้งหมด 7 สายพันธุ์ อาหารสูตร IV ดัดแปลงมาจาก อาหารเลี้ยงเชื้อของ Schumacher และคณะ (1995) ซึ่งมี เปลือกหอยบดและ L-asparagines องค์ประกอบที่สำคัญ แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากอาหารสูตรนี้มีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า และไม่สามารถสร้างเส้นใยที่ชูในอากาศ (aerial mycelium) แต่สามารถสร้างเส้นใยที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (substrate mycelium) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Schumacher และคณะ(1995) ที่แยก *Streptomyces* sp. จากตะกอนดินในน้ำทะเลลึก 4,680 เมตร จากทะเลในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งน่าจะเป็นบริเวณที่ออกซิเจนมีอยู่น้อย และอาหารชนิดสุดท้ายคืออาหารสูตร I ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้เลยในการทดลองนี้ โดยมีองค์ประกอบหลักคือ soluble starch อาหารสูตร I เป็นอาหารที่จำเพาะเจาะจงกับแอคติโนมัยสีทมาก เพราะไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้ จะสังเกตแอคติโนมัยสีทจากโคโลนีเล็กๆที่เจริญอยู่ใต้ผิวอาหาร ซึ่งมีอัตราการเจริญช้ามาก ผู้วิจัยจึงไม่สามารถแยกแอคติโนมัยสีทจากอาหารสูตรนี้ได้ แนวทางที่เหมาะสมในการแยกแอคติโนมัยสีทต่อไปในอนาคตโดยใช้อาหารสูตรนี้ควรแยกโคโลนีที่เจริญไปเลี้ยงในอาหารที่มีสารอาหารเหมาะสมต่อการเจริญ เพื่อให้แอคติโนมัยสีทสามารถเจริญได้ดีมากขึ้น



ภาพที่ 4 จำนวนแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างชนิดต่างๆจำแนกตามอาหารสำหรับแยกแอคติโนมัยสีท

Figure 4 Number of marine actinomycete isolates from specimens classified by different isolating media

ข้อมูลที่ปรากฏในภาพที่ 4 บ่งชี้ว่าอาหารสูตร I ไม่สามารถแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างใดๆได้เลย ในขณะที่อาหารสูตร II สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้จากตัวอย่างทุกชนิด โดย เฉพาะฟิล์มชีวภาพสามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้จากการใช้อาหารสูตร II เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่อาหารสูตร II มี ferric และ ferrous เป็นองค์ประกอบ อาหารสูตร III สามารถใช้แยกแอคติโนมัยสีทได้จากตัวอย่างหลายชนิดเช่นกัน ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวส่วนใหญ่จะสัมผัสกับตะกอนดินในทะเล ยกเว้นตัวอย่างที่เป็นฟิล์มชีวภาพเท่านั้นที่ไม่สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้ด้วยอาหารสูตรนี้ ในขณะที่อาหารสูตร IV สามารถแยกแอคติโนมัยสีทได้จากตัวอย่างฟองน้ำและปะการังเท่านั้นเป็นที่น่าสังเกตว่าอาหารสูตร IV มีเปลือกหอยบดและปะการังซึ่งมีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์

ประกอบเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ดังนั้นแคลเซียมคาร์บอเนตอาจส่งเสริมการเจริญและการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทั้งสองชนิด

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ในการศึกษาวิจัยนี้จะทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่เลือกมาโดยวิธี colourimetric microdilution broth ซึ่งใช้ Alamar Blue เป็นอินดิเคเตอร์ เนื่องจากมีรายงานว่าเป็นวิธีทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีข้อได้เปรียบกว่าวิธีอื่นๆ อาทิเช่น วิธี disc diffusion หรือวิธี agar diffusion กล่าวคือเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาอันสั้นในการทดสอบและสามารถทดสอบได้ครั้งละหลายตัวอย่างพร้อมกัน อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ประหยัดเพราะใช้สารทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ จึงเหมาะกับการทดสอบสารที่ได้จากแหล่งธรรมชาติที่โดยทั่วไปสามารผลิตได้ปริมาณน้อยในระยะเวลาของการศึกษาวิจัย นอกจากนี้วิธี colourimetric microdilution broth ยังเป็นวิธีที่ไวต่อการทดสอบโดยสามารถทดสอบสารที่ระดับความเข้มข้น 0.02- 3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ และมีความแปรผันอยู่ในช่วง 5-12 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ดังนั้นจึงมีความถูกต้องและความแม่นยำสูง (Gazzano *et al.,*1997) และยังสามารถเตรียมสารที่ต้องการทดสอบในรูปของสารละลายใน DMSO และสามารถสัมผัสกับเซลล์ที่แขวนลอยลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RPMI 1640 โดยตรง จึงไม่มีข้อจำกัดในคุณสมบัติของสารที่จะนำมาทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทดสอบอื่นๆ เช่น คุณสมบัติในการละลายของสาร (Solubility) ทั้งในตัวทำละลายและในอาหารทดสอบ, คุณสมบัติในการแพร่ (Diffusibility) ของสารในอาหารวุ้นที่ใช้ทดสอบ อันจะมีผลต่อปัจจัยที่ยากต่อการควบคุมและปฏิบัติ

นอกจากนี้ข้อดีประการหนึ่งของการเลือกใช้วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้ Alamar Blue เป็นอินดิเคเตอร์ คือ ความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของ Alamar Blue โดยปกติ Alamar Blue จะมีสีครามซึ่งอยู่ในรูป resazurin แต่เมื่อถูกรีดิวซ์จะเปลี่ยนเป็นสีแดง ซึ่งอยู่ในรูป resorufin การเปลี่ยนแปลงของสีจากปฏิกิริยารีดักชันจะมีความจำเพาะกับ NADPH / NADP, FADH / FAD, FMNH / FMN และ NADH / NAD ที่

เพิ่มขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (O´Brien *et al.,*2000) จึงทำให้วิธีทดสอบดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบอย่างแท้จริง Alamar Blue นอกจากไม่เป็นพิษต่อเซลล์แล้วยังไม่ไวต่อการสลายตัวด้วยแสง และปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีดังกล่าว ยังสามารถสังเกตได้ง่ายด้วยตาเปล่า ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย Alamar Blue ได้แก่ จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ, ระยะเวลาในการบ่มเชื้อระหว่างการทดสอบ, องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและความเข้มข้นของสารสกัดหยาบหรือสารบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบ โดยมีรายละเอียดของแต่ละปัจจัยดังนี้

จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบใน 1 หลุมของจานเลี้ยงเชื้อแบบ 96 หลุม จะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบเป็นสำคัญ จากการทดลองหาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบในการศึกษานี้ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13 โดยจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบจะพิจารณาจากปัจจัยต่างๆดังนี้คือ ระยะเวลาในการบ่มเชื้อในระหว่างการทดสอบ ซึ่งควรอยู่ในช่วง 8-18 ชั่วโมง ความไวต่อสารสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มากเกินไปจะทำให้ความไวต่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบลดลง ซึ่งจะส่งผลต่อการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue จากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถจะสังเกตผลการยับยั้งการเจริญของสารที่ทดสอบได้อย่างแท้จริง ในขณะที่จำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดสอบน้อยเกินไปจะเกิดผลในทางตรงกันข้าม กล่าวคือสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบรวมทั้งตัวทำละลายที่ใช้คือ DMSO จะมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทำให้ไม่สามารถทราบผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นจากสารสกัดหยาบอย่างแท้จริง อีกทั้งระยะเวลาในการบ่มเชื้อก็มากขึ้นกว่าระยะเวลาที่เหมาะสม (12-24 ชั่วโมง) จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ DMSO ที่ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ จะต้องไม่มากกว่า 2.5 ไมโครลิตร/100 ไมโครลิตรของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ ทั้งนี้ ในการทดสอบคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีข้างต้น จะใช้สารปฏิชีวนะมาตรฐานคือ vancomycin สำหรับชุดควบคุม

ตารางที่ 13 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี colourimtric microdilution broth

Table 13 Initial condition of bacterial used for colourimetric microdilution broth antibacterial assay

Tested bacteria	Amount of cell (CFU/ml)	Incubation time (h)
Staphylococcus aureus	4.5×10^5	10
Bacillus subtilis	1.0×10^4	8
Enterococcus faecalis	1.0×10^8	12-15
Pseudomonas aeruginosa	1.0×10^6	15-18
Salmonella typhi	1.0×10^6	12
Shigella sonnei	6.0×10^5	12

ตารางที่ 14 ความไวของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียเมื่อทดสอบโดยวิธี colourimtric microdilution broth

Table 14 Antibacterial susceptibility of antibiotics by colourimetric microdilution broth antibacterial assay

Antibiotics	Antibacterial activities MIC (μg/ml)					
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*	*P. aeruginosa*	*S. typhi*	*S. sonnei*
Vancomycin	2.5	2.5	5	5	2.5	5
Tetracycline	2.5	5	5	1.25	1.25	10
Amphicillin	1.25	1.25	1.25	2.5	10	2.5
Kanamycin	5	5	1.25	1.25	1.25	5
Chloramphenicol	5	5	2.5	2.5	10	10

จากการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยวิธี colourimetric microdilution broth antibacterial assay (ตารางที่ 14) พบว่ายาปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญจะมีค่า MIC อยู่ในช่วง 1.25-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยขึ้นอยู่กับชนิดของยาปฏิชีวนะและเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

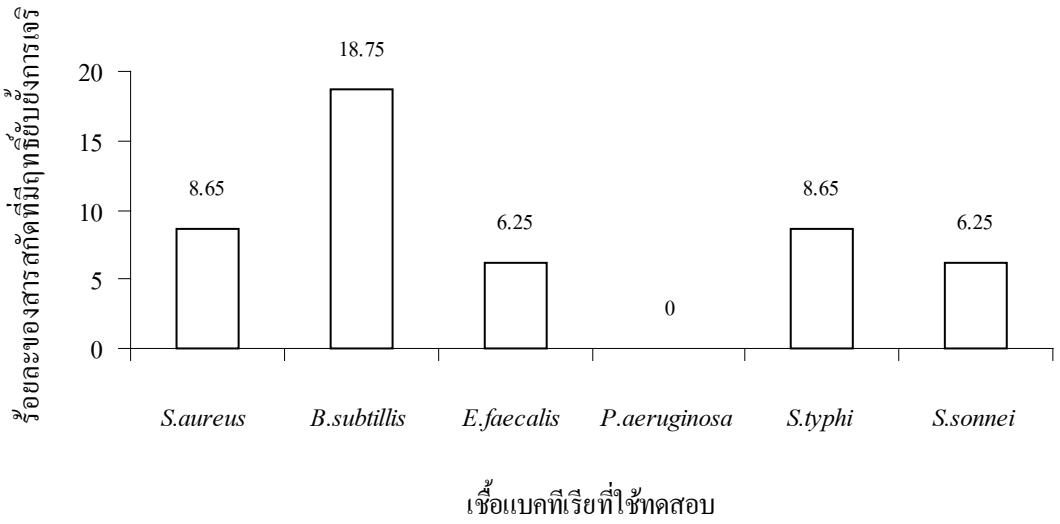
ทั้งนี้วิธีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี colourimetric microdilution broth ได้พัฒนาให้เหมาะสำหรับการคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้สารเพียงปริมาณน้อยเนื่องจากสารสกัดหยาบที่แอคติโนมัยสีทผลิตได้ปริมาณน้อยซึ่งไม่เกิน 90 มิลลิกรัม และยังประหยัดสารเพื่อการทดลองในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้การคัดเลือกโดยวิธีดังกล่าวยังสามารถทดสอบได้ครั้งละหลายๆตัวอย่างเพราะในการทำวิทยานิพนธ์มีตัวอย่างทั้งหมดกว่า 200 ตัวอย่าง อีกทั้งยังเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว และมีความไวต่อสารทดสอบสูง ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมในการคัดเลือกสารสกัดหยาบปริมาณน้อยที่ได้จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบไม่สามารถนำไปเปรียบเทียบกับการทดสอบโดยวิธีอื่น เนื่องจากสภาวะในการทดสอบแตกต่างกัน

4. การคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย

4.1 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบที่ผลิตโดยแอคติโนมัยสีทในทะเลทั้ง 208 ตัวอย่าง ในการศึกษานี้พบว่ามีสารสกัดหยาบถึง 18 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 8.65 ของสารสกัดหยาบทั้งหมด 208 ตัวอย่าง) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และสำหรับ *B. subtilis* ถึงแม้ว่าจะไม่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อ แต่เป็นเชื้อที่ค่อนข้างไวต่อยาและสารเคมีต่างๆจึงนำมาทดสอบเพื่อใช้ในการเปรียบ

เทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบ โดยพบว่ามีสารสกัดหยาบถึง 39 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ 18.75) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* สำหรับ *E. faecalis* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบในลำไส้ใหญ่ของคน โดยเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในท่อปัสสาวะและเยื่อบุหัวใจอักเสบ (endocarditic) โดยจากการทดสอบพบว่ามีสารสกัดเพียง 13 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ 6.25) เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ได้



ภาพที่ 5 ร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Figure 5 Percentage of active extract with antibacterial activities

สำหรับแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ทดสอบในการศึกษานี้ ได้แก่ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในท่อปัสสาวะ จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยสีททั้ง 208 ชนิด ไม่มีชนิดใดเลยที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* และสำหรับเชื้อ *S. typhi* ซึ่งมักพบว่ามีการปนเปื้อนในอาหารประเภท เนื้อสัตว์และอาหารทะเล และทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์นั้น มีสารสกัดหยาบ 18 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ8.65) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ ในขณะที่การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. sonnei* ซึ่งก่อให้เกิดโรคบิดบริเวณลำ

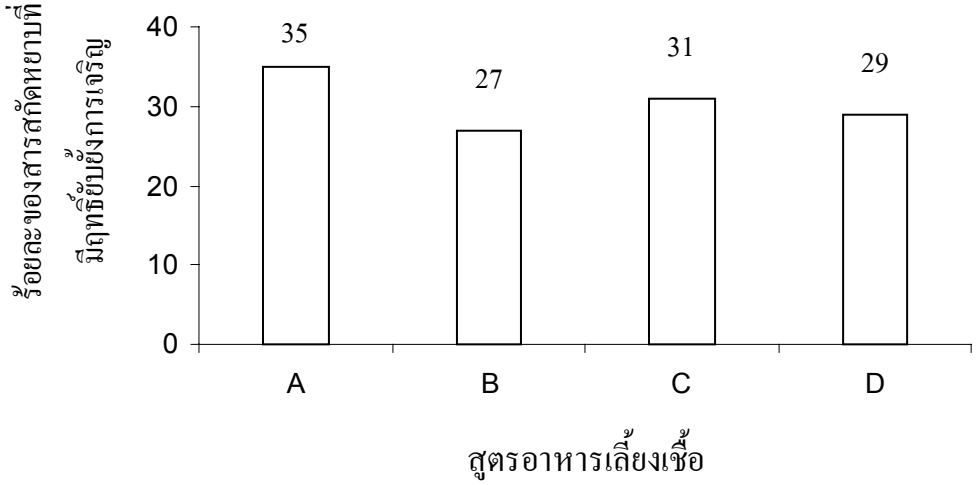
ไส้ใหญ่หรือบริเวณส่วนปลายของลำไส้เล็กนั้น มีสารสกัดหยาบเพียง 13 ชนิด (คิดเป็นร้อยละ6.25) เท่านั้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว (ภาพที่ 5)

4.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

ผลจากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลเพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตร พบว่าอาหารสูตร A (มีสาหร่าย ตะกอนดินและเปลือกกุ้งบดเป็นองค์ประกอบ) ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุดคือ 18 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 35 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร A ทั้งหมด) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร B (มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ) เป็นอาหารที่ผลิตสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยที่สุด โดยมีเพียง 14 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 27 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร B ทั้งหมด) เท่านั้น ส่วนอาหารสูตร C (มี polypeptone, soluble starch เป็นองค์ประกอบ) และ D (มี peptone yeast และ extract เป็นองค์ประกอบ) สามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้มากเป็นอันดับสองและสามตามลำดับคือ อาหารสูตร C มีจำนวน 16 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 31 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร C ทั้งหมด) และอาหารสูตร D 15 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 29 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร D ทั้งหมด) ดังแสดงในภาพที่ 6

และเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดของสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรต่างๆ จากตารางที่ 15 พบสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ส่วนใหญ่มาจากอาหารสูตร A และ C (อาหารสูตรละ 7 ตัวอย่าง) และจากอาหารสูตร D (3 ตัวอย่าง) ในขณะที่สารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร B มีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ สำหรับการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารเคมีและยาปฏิชีวนะ ดังนั้น

จึงพบสารสกัดหยาบจำนวนมากถึง 39 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้ โดยสารสกัดส่วนใหญ่ได้มาจากการเลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหารสูตร A ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 17 ชนิด อันดับรองลงมาคือ อาหารสูตร C มีจำนวน 9 ชนิด จากอาหารสูตร D มีจำนวน 8 ชนิด และอาหารสูตร B น้อยที่สุดคือเท่ากับ 5 ชนิด และในการทดสอบ



ภาพที่ 6 ร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 4 ชนิด

Figure 6 The percentage of active crude extracts against bacterial cultures, classified by cultivating media

ตารางที่ 15 จำนวนสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารชนิดต่างๆที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย

Table 15 Number of antibacterial crude extracts from 4 cultivating media

cultivating media	Number of antibacterial crude extracts					
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*	*P.aeruginosa*	*S. typhi*	*S. sonnei*
A	7	17	3	0	3	4

B	1	5	3	0	7	4
C	7	9	4	0	4	4
D	3	8	3	0	4	1

คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของ *E. faecalis* ผลการทดสอบพบว่ามีสารสกัดจำนวน 13 ชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. faecalis* ได้ โดยสารสกัดหยาบส่วนใหญ่มาจากอาหารสูตรต่างๆในจำนวนที่ใกล้เคียงกันเป็นที่น่าสังเกตว่าในการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าไม่มีสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสีทจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้ ในขณะที่การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของ *S. typhi* มีสารสกัดหยาบทั้งหมดถึง 18 ตัวอย่างที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ โดยสารสกัดหยาบดังกล่าวได้มาจากการเลี้ยงในอาหารสูตร B มีจำนวนมากที่สุด คือเท่ากับ 7 ตัวอย่าง รองลงมาคือสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร C และ D สูตรละ 4 ตัวอย่างเท่ากัน โดยที่สารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร A มีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. typhi* ได้ ส่วนการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของพบว่า *S. sonnei* พบว่ามีสารสกัดหยาบถึง 13 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ โดยแยกเป็นสารสกัดหยาบที่ได้มาจากการเลี้ยงในอาหารสูตร A, B และ C สูตรละ 4 ตัวอย่าง และอาหารสูตร D เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น

โดยรวมแล้วอาหารสูตร A สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้มากที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่อาหารสูตร B สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยที่สุดแต่เป็นอาหารสูตรที่สามารถผลิตสารสกัดหยาบซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหารสูตร A (สาหร่าย ตะกอนดินและเปลือกกุ้งบด)พบว่าเป็นอาหารที่มาจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งแอคติโนมัยสีทดูดซึมสารอาหารจากแหล่งดังกล่าวได้ยาก

โดยอาจต้องสร้างเอนไซม์ในการย่อยองค์ประกอบดังกล่าว และในการปรับตัวของแอคติโนมัยสีทนี้อาจส่งเสริมให้ผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ส่วนอาหารสูตร B (กลีเซอรอลและ soytone) พบว่าองค์ประกอบดังกล่าวเป็นอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์ดังนั้นจึงมีการนำมาใช้ได้ง่าย โดยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและ soytone เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจึงเหมาะแก่การเจริญของแอคติโนมัยสีทมากกว่าการผลิตสารทุติยภูมิ จึงทำให้อาหารสูตร B ผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้น้อย อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตรนี้มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดี ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบอาจผลิตในช่วงการเจริญ

ตารางที่16 แอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียว

Table 16 Actinomycetes that produced active crude extract by only a cultivation medium

	Cultivation media			
	A	B	C	D
Actinomycetes stains	CNA006	CNA008	CNA013	CNA011
	CNA009	CNA014	CNA052	
	CNA017	CNA026		
	CNA023	CNA037		
	CNA047			

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เมื่อพิจารณาสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ พบว่ามีแอคติโนมัยสีทจำนวน 12 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์เมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ดังตารางที่16 อาทิเช่น แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA006 จะผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก็ต่อเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A ชนิดเดียวเท่านั้น และยังพบว่าอาหารสูตร A เป็นอาหารที่แอคติโนมัยสีท

สามารถสร้างสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ได้มากที่สุด ทั้งนี้เพราะอาหารสูตร A เป็นอาหารที่เลียนแบบสภาพธรรมชาติในทะเล โดยการนำสาหร่ายทะเล ตะกอนดินและเปลือกกุ้งบดเป็นองค์ประกอบ อีกทั้งยังเป็นอาหารที่มาจากธรรมชาติ ดังนั้นแอคติโนมัยสีทจึงต้องอาศัยขั้นตอนที่ซับซ้อนในการนำสารอาหารไปใช้

ตารางที่ 17 แอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด

Table 17 Actinomycetes that produced active crude extract by all 4 cultivation media

Crude extracts	Antibacterial activities at 300 µg/ml					
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*	*P.aeruginosa*	*S. typhi*	*S. sonnei*
CNA001A		+				
CNA001B		+				
CNA001C		+				
CNA001D		+				
CNA003A	+	+			+	+
CNA003B		+			+	+
CNA003C						+
CNA003D		+				
CNA004A	+	+				
CNA004B		+				
CNA004C	+	+				
CNA004D	+	+				
CNA007A					+	+
CNA007B					+	
CNA007C					+	

CNA007D					+
CNA053A	+	+	+		
CNA053B	+	+	+		
CNA053C	+	+	+		
CNA053D	+	+	+		

และพบว่ามีแอคติโนมัยสีทเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถสร้างสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียไม่ว่าจะเลี้ยงในอาหารชนิดใดก็ตาม โดยฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบที่มาจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์เดียวกันจะยับยั้งแบคทีเรียคล้ายกัน แต่จะมีสารสกัดหยาบบางชนิดที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้มากกว่าโดยขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ อาทิเช่น แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA001 ผลิตสารสกัดหยาบ 4 ชนิด โดยทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* แต่มีเพียงสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร A (CNA001A) เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. sonnei* ด้วย อีกทั้งยังพบว่าแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053 เป็นแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยไม่มีปัจจัยของอาหารเลี้ยงเชื้อเลย เนื่องจากสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ในการทดสอบขั้นต้นเหมือนกัน และเป็นที่น่าสังเกตว่าแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA001, 003, 007 และ 053 แยกได้จากฟองน้ำ และ CNA004 แยกได้จากสาหร่าย ดังนั้นฟองน้ำจึงเป็นแหล่งของแอคติโนมัยสีทที่มีแนวโน้มที่ผลิตสารที่ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด (ดังตารางที่17)

4.3 ความสัมพันธ์ของแหล่งที่มาของแอคติโนมัยสีทกับฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

เมื่อนำแอคติโนมัยสีทจำนวน 58 สายพันธุ์ที่แยกมาจากทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทยทั้ง 4 แหล่ง มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ 4 สูตร คือ อาหารสูตร A, B, C และ D เพื่อผลิตสารสกัดหยาบและนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพบว่าแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากฟองน้ำจำนวน 23 สาย

พันธุ์ให้สารสกัดหยาบ 33 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือคิดเป็นร้อยละ 35.87 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากฟองน้ำทั้งหมด 92 สายพันธุ์ (ดังภาพที่ 7) โดยที่สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยสีทซึ่งแยกจากฟองน้ำมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในช่วงกว้าง ดังแสดงในตารางที่ 18 โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้มากที่สุด (22 ตัวอย่าง) และมีสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. typhi* และ *S. sonnei* ได้ใกล้เคียงกันคือ 10, 7, 11 และ 8 ชนิด ตามลำดับ ทั้งนี้แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากฟองน้ำมีความสามารถในการสร้างสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์จำนวนมากเนื่องจากสภาพแวดล้อมในทะเล ฟองน้ำซึ่งเป็นสัตว์ที่ไม่มีอวัยวะในการป้องกันตัวและไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับตัวให้อยู่รอดจากการรุกราน โดยการสร้างสารพิษซึ่งอาจสร้างจากฟองน้ำโดยตรงหรือสร้างจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกันกับฟองน้ำ และจากการทดลองนี้ก็สามารถทราบได้ว่าแอคติโนมัยสีทก็เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำในทะเล

จากการทดลองเลี้ยงแอคติโนมัยสีทจำนวน 7 สายพันธุ์จากตะกอนดินในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สูตร ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 28 ตัวอย่าง จากการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่ามีเพียง 3 ตัวอย่างหรือคิดเป็นร้อยละ 10.71 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตะกอนดินทั้งหมด 3 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่เป็นที่น่าสนใจว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตะกอนดิน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *S. typhi* และ *S. sonnei* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

และเมื่อนำแอคติโนมัยสีททั้ง 12 สายพันธุ์ที่แยกจากสาหร่าย มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สูตรจนได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 48 ตัวอย่าง และทำการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดดังกล่าว พบว่ามีสารสกัดหยาบ 21 ตัวอย่างที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือคิดเป็นร้อยละ 43.75 สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากสาหร่ายมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในช่วงกว้างเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยสีทซึ่งแยกจาก

ฟองน้ำ เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้มากที่สุด (11 ตัวอย่าง) นอกจากนี้ยังมีสารสกัดหยาบที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. typhi* และ *S. sonnei* มีจำนวนใกล้เคียงกันคือ 6, 5, 5 และ4 ตัวอย่าง ตามลำดับ

เป็นที่น่าสนใจว่าแอคติโนมัยสีท 1 สายพันธุ์ที่แยกได้จากฟิล์มชีวภาพ (ตารางที่ 18) ผลิตสารสกัดหยาบเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* เช่นเดียวกับแอคติโนมัยสีทจำนวน 2 สายพันธุ์ที่ได้จากเปลือกหอย ผลิตสารสกัดหยาบเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างฟิล์มชีวภาพและเปลือกหอยที่เก็บทะเลมีจำนวนน้อย ดังนั้นจึงแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดังกล่าวได้น้อยด้วยและส่งผลให้จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียน้อยไปด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต่อสารสกัดหยาบทั้งหมดพบว่ามีร้อยละ 25 (ภาพที่ 7) ดังนั้นฟิล์มชีวภาพและเปลือกหอยจึงมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

ตารางที่ 18 จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียจำแนกตาม

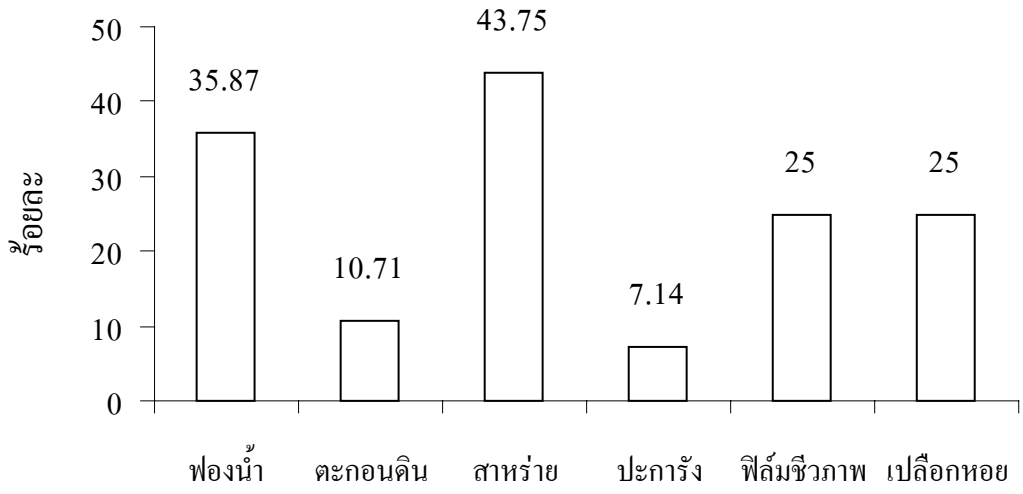
แหล่งที่มาของแอคติโนมัยสีท

Table 18 Number of antibacterial crude extracts classified by sources of actinomycetes

Source	Total number of antibacterial crude extracts	Number of antibacterial crude extracts					
		S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*	*P.aeruginosa*	*S. typhi*	*S. sonnei*
Sponge	33	10	22	7	0	11	8
Sediment	3	0	1	1	0	2	1
Algae	21	6	11	5	0	5	4

Coral	2	0	2	0	0	0	0
Biofilm	1	0	1	0	0	0	0
Shell	2	2	1	0	0	0	0

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียต่อสารสกัดหยาบทั้งหมดจากแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตัวอย่างประเภทเดียวกันดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่าแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากสาหร่ายและฟองน้ำผลิตสารสกัดหยาบในอาหารทั้ง 4 สูตรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสูงสุด คือร้อยละ 43.75และ 35.87 ในขณะที่แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากฟิล์มชีวภาพและเปลือกหอยให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในลำดับที่รองลงมาคิดเป็นร้อยละ 25 ส่วนแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากตะกอนดินและปะการังผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 10.71 และ 7.14 ตามลำดับ



ภาพที่ 7 ร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียต่อสารสกัดหยาบจากตัวอย่างชนิดนั้นๆทั้งหมด

Figure 7 Percentage of antibacterial crude extracts per total crude extracts from each

specimens

5. การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบ

5.1 การคัดเลือกสารสกัดหยาบและการแยกส่วนสารสกัดหยาบขั้นต้น

จากการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียของสารทั้ง 208 ตัวอย่างในข้อ 4 พบว่ามีสารสกัดหยาบหลายตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แก่ CNA003A, CNA003B, CNA005A, CNA007A, CNA031C, CNA039C, CNA048C, CNA053A, CNA053B, CNA053C และ CNA053D โดยที่สารสกัดหยาบเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ในช่วงกว้าง กล่าวคือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้อย่างน้อย 3 ชนิด ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 สารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป

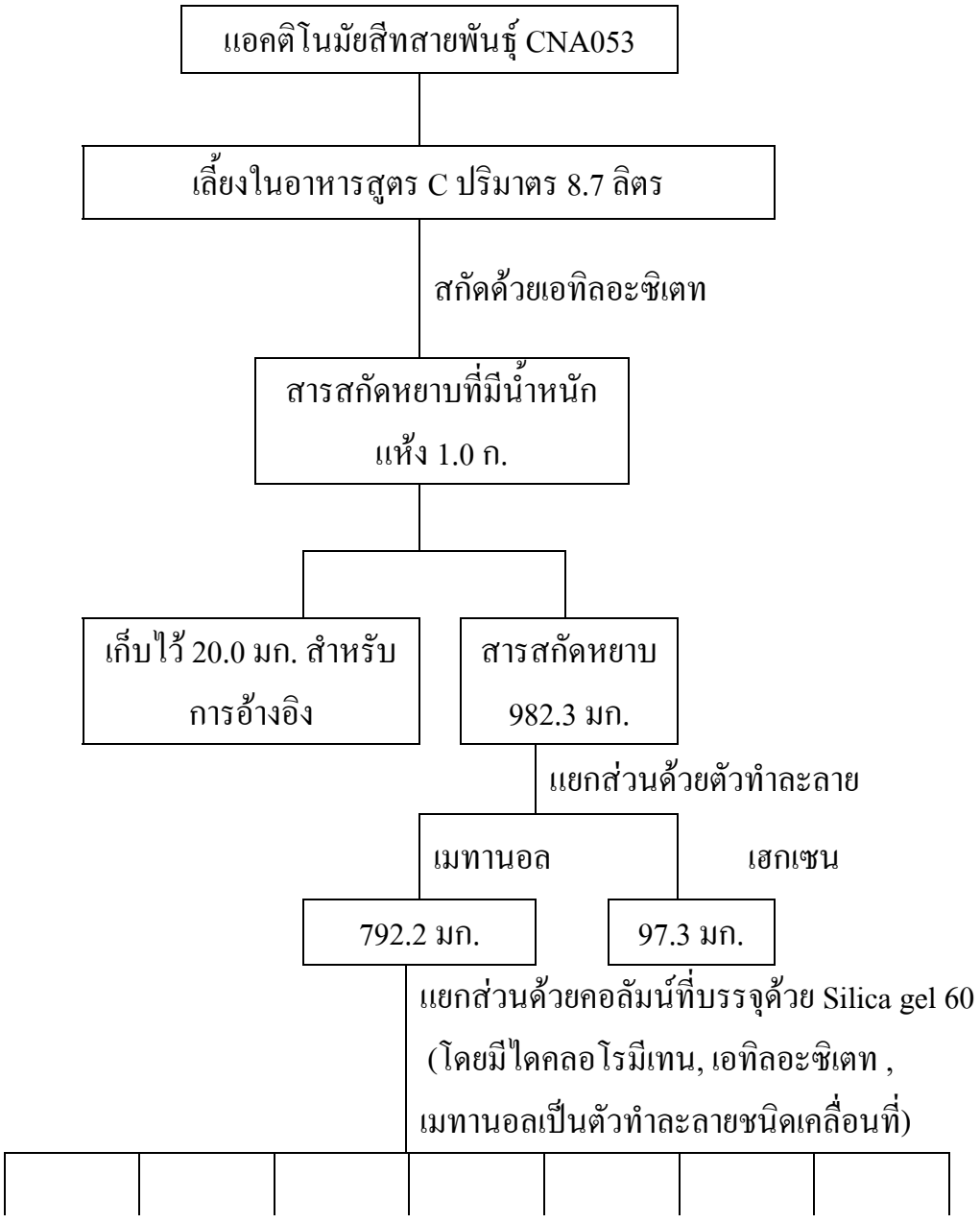
Table 19 Antibacterial activities of crude extract against at least 3 tested bacterial

Crude extracts code	Antibacterial activities at 300 μg/ml					
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*	*P.aeruginosa*	*S. typhi*	*S. sonnei*
CNA003A	+	+			+	+
CNA003B		+			+	+
CNA005A	+	+			+	+
CNA007A		+			+	+
CNA031C	+	+	+			
CNA039C	+	+	+			
CNA048C	+	+	+			
CNA053A	+	+	+			
CNA053B	+	+	+			

CNA053C	+	+	+
CNA053D	+	+	+

เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดหยาบส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็นผลจากองค์ประกอบที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053 ที่ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารทั้ง 4 สูตรคือ CNA053A, CNA053B, CNA053C และ CNA053D ในการศึกษาขั้นต่อไปสำหรับการแยกและทำบริสุทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจึงเลือกที่จะศึกษาสารสกัดหยาบที่มาจากแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053

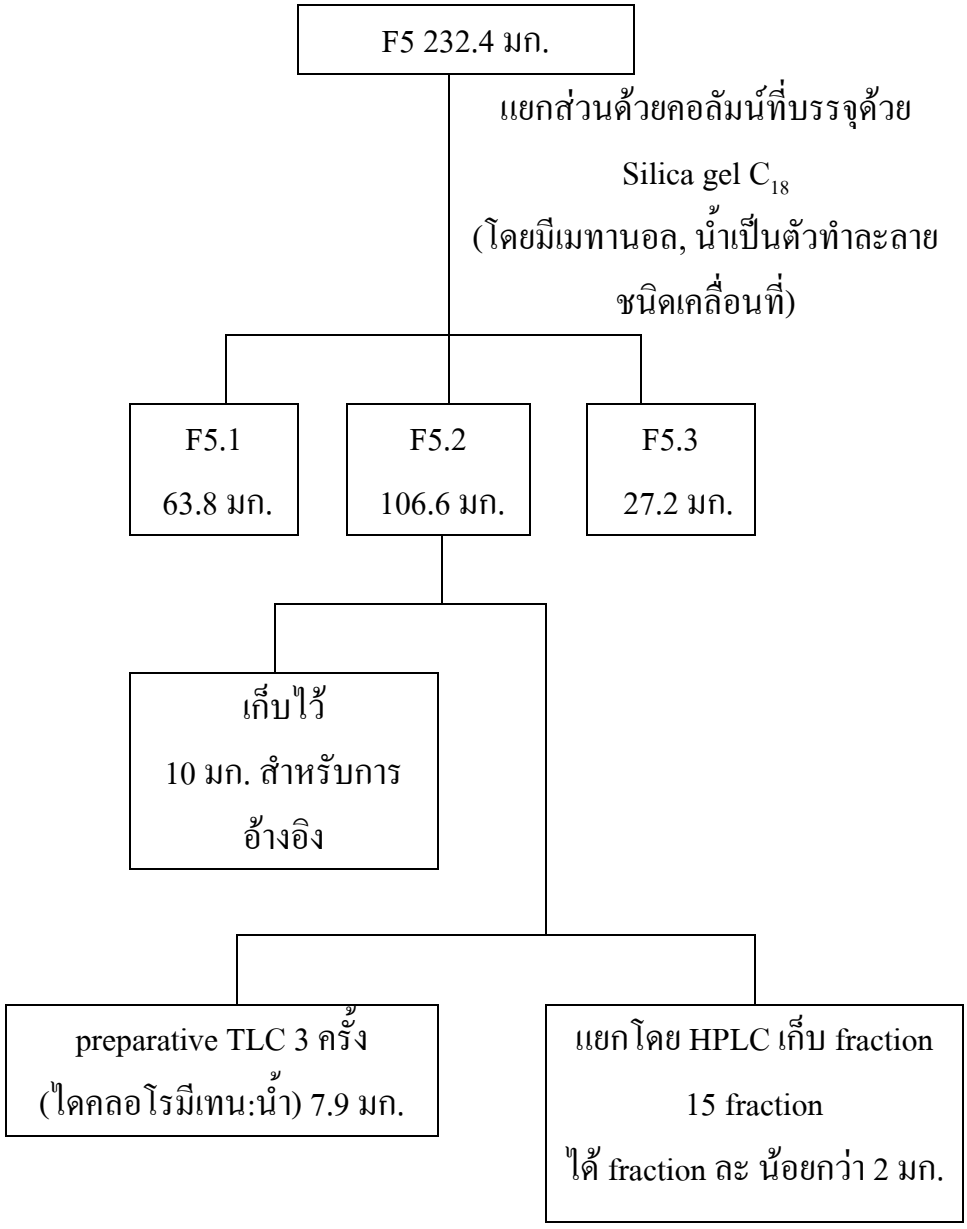
จากการพิจารณาอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สูตร พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A และสูตร C แต่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบจากแหล่งธรรมชาติ คือสาหร่าย ตะกอนดินและเปลือกกุ้งบดที่ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการสกัดด้วย separatory funnel จึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C ซึ่งนอกจากจะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดได้ในปริมาณสูงแล้วยังสะดวกและง่ายต่อกระบวนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบอีกด้วย แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C ปริมาตร 8.7 ลิตร หลังจากสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทแล้ว ได้สารสกัดหยาบ 1.0 กรัม แยกส่วนที่ไม่มีขั้วออกด้วยเฮกเซนและส่วนมีขั้วออกด้วยเมทานอล จากการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพบว่าส่วนของสารสกัดที่ละลายในเมทานอลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่ส่วนของสารสกัดที่ละลายในเฮกเซนไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงเลือกสารที่ได้จากการแยกส่วนด้วยเมทานอลมาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่8)


แอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053
เลี้ยงในอาหารสูตร C ปริมาตร 8.7 ลิตร
สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท
สารสกัดหยาบที่มีน้ำหนัก
แห้ง 1.0 ก.
เก็บไว้ 20.0 มก. สำหรับ
การอ้างอิง
สารสกัดหยาบ
982.3 มก.
แยกส่วนด้วยตัวทำละลาย
เมทานอล
เฮกเซน
792.2 มก.
97.3 มก.
แยกส่วนด้วยคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Silica gel 60
(โดยมีไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตท ,
เมทานอลเป็นตัวทำละลายชนิดเคลื่อนที่)

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
44.5 มก.	23.9 มก.	31.0 มก.	53.0 มก.	232.4 มก.	121.3 มก.	187.1 มก.	72.9 มก.

ภาพที่ 8 ไดอะแกรมแสดงการแยกสารสกัดหยาบ CNA053C

Figure 8 Isolating diagram of CNA053C crude extract



ภาพที่ 9 ไดอะแกรมแสดงการแยกสารของ F5

Figure 9 Isolating diagram of F5

5.2 การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Flash column chromatography แบบ normal phase

จากภาพที่ 7 นำส่วนของสารสกัดที่ละลายในเมทานอล 770.2 มิลลิกรัม มาแยกโดยอาศัยหลักการของโครมาโตกราฟี บนคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Silica gel 60 (Fluca) เป็น stationary phase ชะสารโดยเรียงลำดับความมีขั้วจากน้อยไปหามาก ด้วยไดคลอโรมีเทน เอทิอะซิเตทและเมทานอล แบ่งเก็บสารละลายที่ชะออกมาเป็น 8 fraction ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 8 fraction ที่ระดับความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 20) พบว่าทุก fraction สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *B. subtilis* แต่เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. faecalis* ผลปรากฏว่ามีเฉพาะ fraction ที่ 4 ถึง 7 (F4 ไดคลอโรมีเทน:เอทิอะซิเตท (40:60), F5 ไดคลอโรมีเทน:เอทิอะซิเตท (20:80), F6 เอทิอะซิเตท (100), F7 เอทิอะซิเตท:เมทานอล (80:20)) เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ และไม่มี fraction ใดเลยที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa, S. typhi, S. sonnei* ได้ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสารที่แอคติโนมัยสีทสร้างมีความจำเพาะกับแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ CNA053C ที่สามารถยับยั้งการเจริญเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น

จากตารางที่ 20 สรุปได้ว่า F5 เป็นส่วนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสามชนิดดีที่สุด โดยมีค่า MIC ต่อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. faecalis* เท่ากับ 0.53, 0.29 และ 0.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และยังเป็นส่วนที่

แยกสารได้ปริมาณมากที่สุด (232.4 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ 29.8 ของน้ำหนักสารสกัดหยาบก่อนทำให้บริสุทธิ์บางส่วน) ดังนั้น F5 จึงเป็น fraction ที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 20 น้ำหนักแห้งและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของแต่ละ fraction ที่ได้จากการแยกโดย normal phase flash chromatography

Table 20 Dried weight and antibacterial activities of fractions obtained from a normal phase flash chromatography

Fraction	Mobile phase	Weight (mg.)	MIC (µg/ml)					
			S. aureus	*B. Subtilis*	*E. faecalis*	*P.aeruginosa*	*S. typhi*	*S. sonnei*
1	DCM(100)	44.5	37.5	37.5	>300	>300	>300	>300
2	DCM:EtOAc (80:20)	23.9	9.38	18.75	>300	>300	>300	>300
3	DCM:EtOAc (60:40)	31	37.5	75	>300	>300	>300	>300
4	DCM:EtOAc (40:60)	53	2.34	0.58	1.17	>300	>300	>300
5	DCM:EtOAc (20:80)	232.4	0.58	0.29	0.29	>300	>300	>300
6	EtOAc (100)	121.3	1.17	1.17	0.58	>300	>300	>300
7	EtOAc:MeOH (80:20)	187.1	2.34	2.34	18.75	>300	>300	>300
8	MeOH (100)	72.9	18.75	9.38	>300	>300	>300	>300
Total		744.1						
	Vancomycin		2.5	2.5	5	5	2.5	5

หมายเหตุ DCM (Dichloromethane)

EtOAc (Ethyl acetate)

MeOH (Methanol)

5.3 การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Flash column chromatography แบบ reversed phase

เนื่องจาก F5 ในขั้นตอนที่ 5.2 ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน:เอทิอะซิเตท ในสัดส่วน 20:80 (ดังภาพที่ 8) ดังนั้นจึงเป็นสารผสมที่มีสภาพขั้วปานกลาง นำ F5 ปริมาณ 217.4 มิลลิกรัม มาแยกต่อโดยวิธี reversed phase flash column chromatography ที่ใช้ Silica gel C_{18} (Fluca) เป็น stationary phase ผ่านคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ เมทานอลและน้ำในอัตราส่วนต่างๆกัน เก็บรวบรวม fractionได้ 3 fraction

ตารางที่ 21 น้ำหนักแห้งและฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของแต่ละ fraction ที่ได้จากการแยกโดย reversed phase flash chromatography

Table 21 Dried weight and antibacterial activities of fractions obtained from a reversed phase flash chromatography

Fraction	Mobile phase	Weight (mg)	MIC (μg/ml)					
			S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*	*P.aeruginosa*	*S. typhi*	*S. sonnei*
5.1	MeOH:water (50:50)	63.8	37.5	18.75	18.75	>300	>300	>300
5.2	MeOH:water (80:20)	106.6	0.585	0.146	0.29	9.375	150	300
5.3	MeOH (100)	27.2	4.687	2.34	18.75	>300	>300	>300
Total		187.6						
	Vancomycin		2.5	2.5	5	5	2.5	5

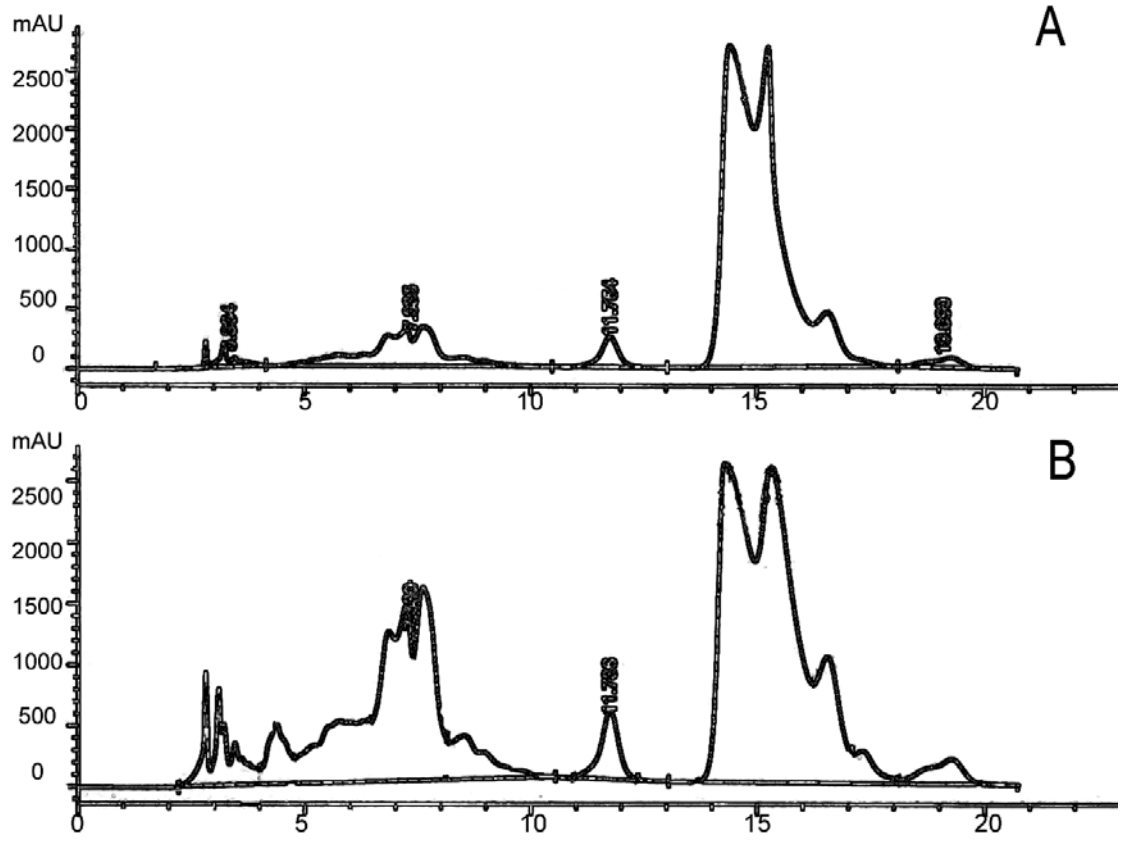
หมายเหตุ MeOH (Methanol)

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดังแสดงในตารางที่ 21 พบว่า F5.2 ซึ่งถูกชะด้วย เมทานอล:น้ำ (80:20) มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด และแยกได้สารเป็นปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 106.6 มิลลิกรัม เป็นที่สังเกตว่า F5.2 เท่านั้นที่มีสารสกัดสีส้ม ดังนั้นจึงคาดว่าสารสีส้มมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และพบว่า F5.2 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีโดยมีค่า

MIC ต่อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. faecalis* เท่ากับ 0.53, 0.146 และ 0.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้ง *B. subtilis* เพิ่มขึ้นสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ F5 และนอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa, S. typhi, S. sonnei* ซึ่งแต่เดิมนั้น F5ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้เลย ทั้งนี้เนื่องจากในการทำ flash column chromatography ในขั้นตอนนี้ทำให้มีความบริสุทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนี้ได้ด้วยวิธีทดสอบที่ใช้ในการศึกษานี้

5.4 การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี HPLC

เตรียมสารสกัด F5.2 ที่ผ่านการแยกด้วยวิธี flash column chromatography แบบ reverse phase ซึ่งถูกชะด้วยเมทานอล:น้ำ ในสัดส่วน 80:20 จากข้อ 5.3 ที่ความเข้มข้น 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด reverse phase (Thermo Hypersil BDS C18 5µm, 4.5 x250 mm) ตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยตัวตรวจวัดอัลตร้าไวโอเลตชนิด diode array ที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 นาโนเมตร โดยวิเคราะห์สารครั้งละ 2 มิลลิกรัม ใช้เมทานอล:น้ำ (75:25) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ด้วยอัตราเร็ว 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที ผลการวิเคราะห์ดังภาพที่ 10 สามารถวิเคราะห์สารแล้วแบ่งเป็นส่วนๆได้ทั้งหมด 15 ส่วน โดยเฉพาะสารที่พีก ณ เวลา 14.5 ถึง 15.5 นาที เป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดส่วนนี้ แต่พบว่ายังไม่สามารถแยกสารกลุ่มนี้ออกจากกันได้โดยสมบูรณ์ ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวนี้สามารถเก็บสารได้ 5 ส่วน คือส่วนที่ 8 -12 ลักษณะสารที่ได้มีสีเหลืองจนไปถึงสีส้มเข้ม และสารส่วนที่ 10 ซึ่งมีลักษณะสีส้มเข้มเป็นส่วนที่มีปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 36 มิลลิกรัม



ภาพที่ 10 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ HPLC ของ F5.2 ใช้เมทานอล: น้ำ (75:25) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ B: ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร)

Figure 10 Chromatogram of HPLC analysis of F5.2 in isocratic methanol: water(75:25) system (A: at wavelength 254 nanometer and B: at wavelength 210 nanometer)

ดังนั้นจึงนำสารส่วนที่ 10 ซึ่งตรวจวัดที่เวลา 15 นาที มาแยกต่อตามวิธีและสภาวะเดิมคือใช้เมทานอล: น้ำ(75:25) เป็นเฟสเคลื่อนที่ เก็บส่วนดังกล่าวได้ 3 ส่วนได้แก่ 10.1, 10.2 และ 10.3 โดยพิจารณาจากลักษณะสเปกตรัมจากการตรวจวัดด้วยเครื่องไดโอดอาเรย์ (diode array detector) (ดังภาพที่ 11) จากนั้นจึงนำทั้ง 3 ส่วน มาวิเคราะห์โดยเปลี่ยนสภาวะของเฟสเคลื่อนที่เป็นแบบเกรเดียน ดังตารางที่ 22 แต่ผลการวิเคราะห์ก็ไม่สามารถ

แยกสารดังกล่าวให้บริสุทธิ์ได้โดยลักษณะโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 12, 13 และ14

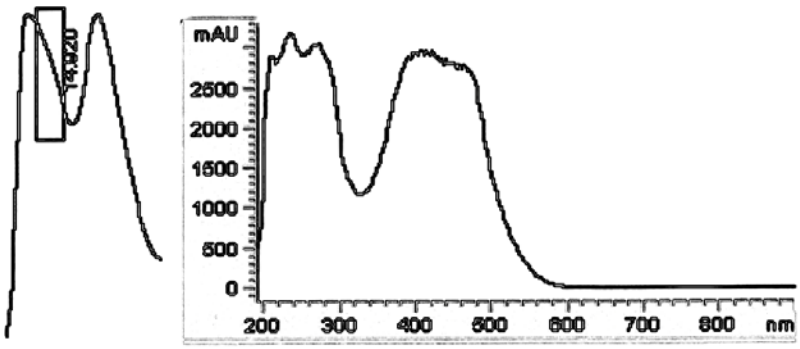
นอกจากนี้ลักษณะสเปกตรัมของสารที่เวลา 45 ถึง 47 นาทีของการวิเคราะห์ส่วนที่ 10.1 ,10.2 และ 10.3 ยังมีลักษณะเหมือนกันโดยมีลักษณะดังภาพที่ 11

ตารางที่ 22 สภาวะในการวิเคราะห์ HPLC โดยชะแบบเกรเดียน

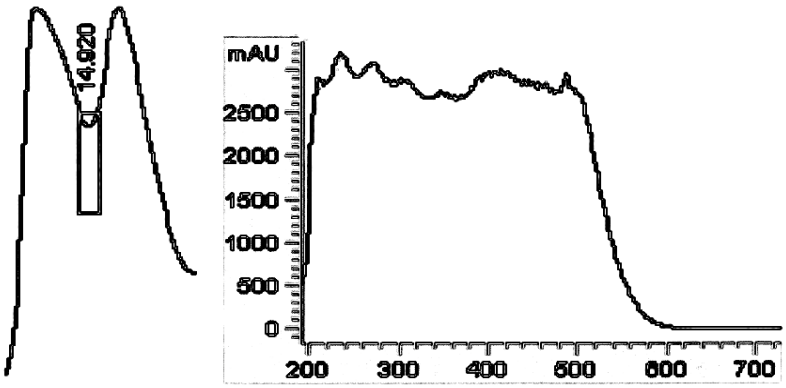
Table 22 Condition of HPLC gradient system

เวลา (นาที)	เมทานอล (%)	น้ำ (%)	อัตราเร็ว (มิลลิลิตรต่อนาที)
0	45	55	0.5
5	60	40	0.5
6	60	40	0.5
11	75	25	0.5
12	75	25	0.5
17	90	10	0.5
18	90	10	0.5
23	100	0	0.5
60	100	0	0.5

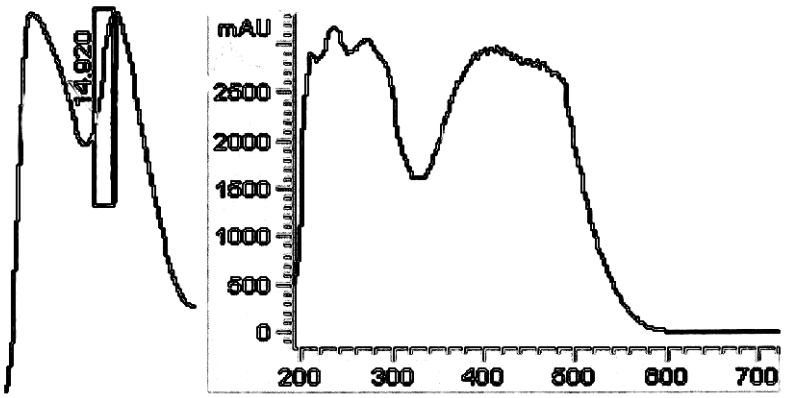
10.1


14.920
mAU
2500
2000
1500
1000
500
0
200
300
400
500
600
700
800
nm

10.2

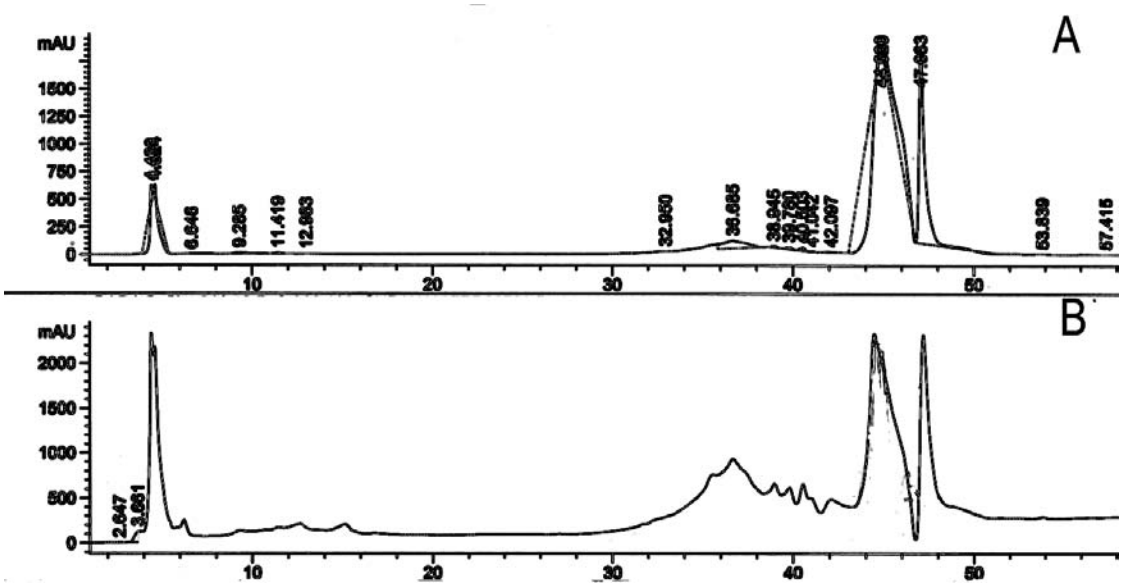

14.920
mAU
2500
2000
1500
1000
500
0
200
300
400
500
600
700

10.3


14.920
mAU
2500
2000
1500
1000
500
0
200
300
400
500
600
700

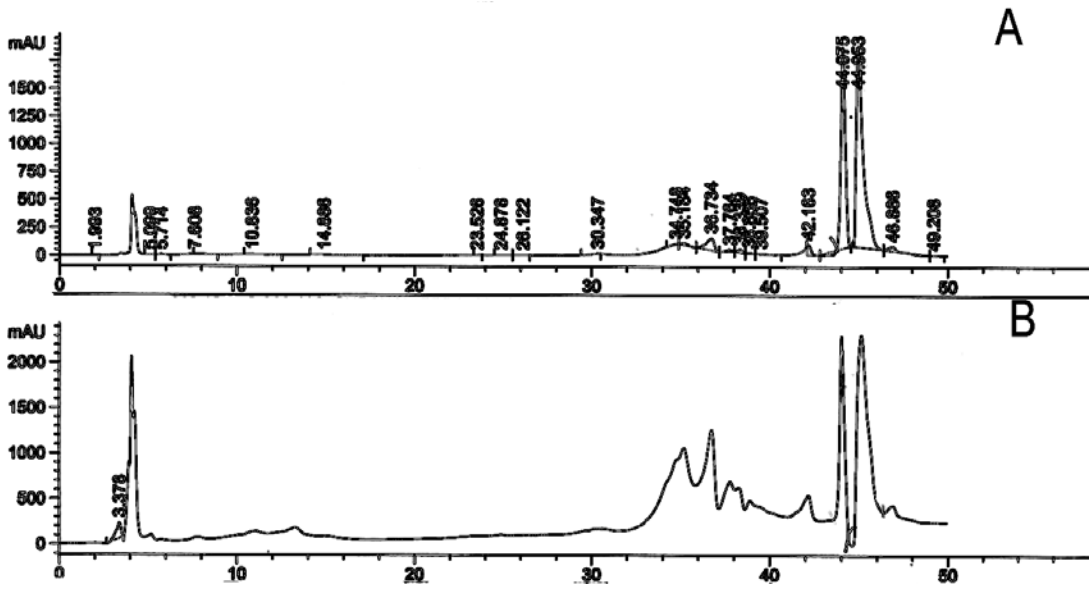
ภาพที่ 11 ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมของส่วนที่10.1, 10.2 และ10.3

Figure 11 Diode array spectrum of fraction 10.1,10.2 and 10.3



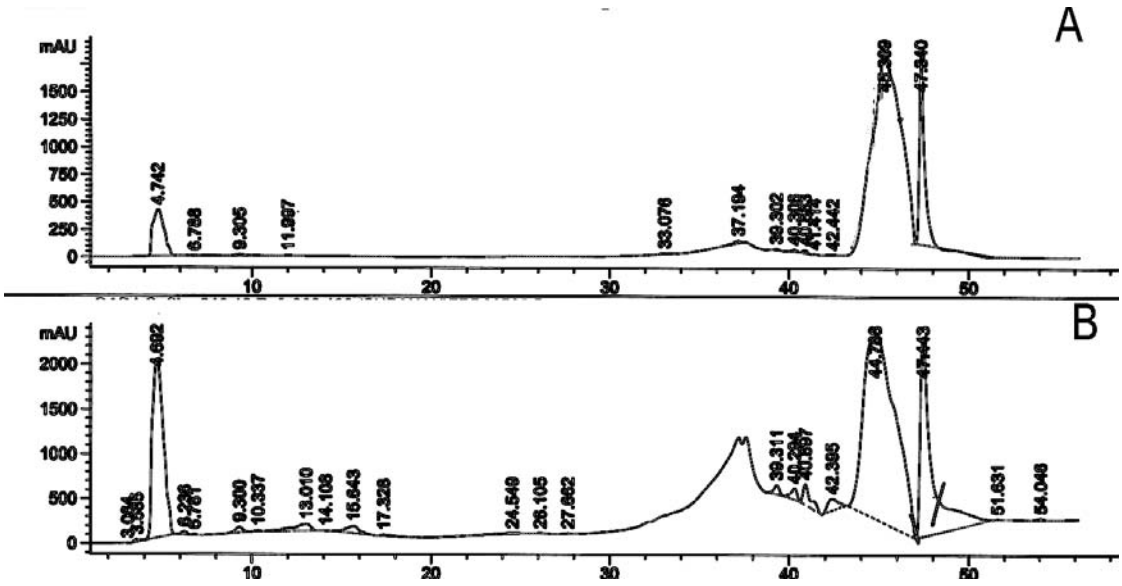
ภาพที่ 12 โครมาโตแกรมของการแยกสารส่วนที่ 10.1 ตามสภาวะการชะแบบเกรเดียนตามตารางที่ 22 (A: ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ B: ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร)

Figure 12 Chromatogram of fraction 10.1 by gradient system (Table 20) (A : at wavelength 254 nanometer and B: at wavelength 210 nanometer)



ภาพที่ 13 โครมาโตแกรมของการแยกสารส่วนที่ 10.2 ตามสภาวะการชะแบบเกรเดียนตามตารางที่ 22 (A: ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ B: ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร)

Figure 13 Chromatogram of fraction 10.2 by gradient system (Table 20) (A : at wavelength 254 nanometer and B: at wavelength 210 nanometer)



ภาพที่ 14 โครมาโตแกรมของการแยกสารส่วนที่ 10.3 ตามสภาวะการชะแบบเกรเดียนตามตารางที่ 22 (A: ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ B: ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร)

Figure 14 Chromatogram of fraction 10.3 by gradient system (Table 20) (A : at wavelength 254 nanometer and B: at wavelength 210 nanometer)

ตารางที่ 23 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของแต่ละ fraction ที่ได้จากการแยกโดย reversed phase HPLC

Table 23 Antibacterial activities of fractions obtained from a reversed phase HPLC

Extracts	MIC (µg/ml)					
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*	*P.aeruginosa*	*S. typhi*	*S. sonnei*
10.1	0.585	0.146	0.292	75	300	300
10.2	0.585	0.073	0.146	9.375	37.5	75
10.3	0.585	0.292	0.585	37.5	300	300

F5.2	0.585	0.146	0.29	9.375	150	300

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของส่วนที่ 10.1, 10.2 และ 10.3 ดังแสดงในตารางที่ 23 พบว่าทั้ง 3 ส่วนมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ ไดโอดอาเรย์สเปกตรัมที่มีลักษณะสเปกตรัมคล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะส่วนที่ 10.1 และ10.3 (ภาพที่11) และยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ HPLC ที่มีลักษณะของโครมาโตแกรมในรูปแบบเดียวกัน (ภาพที่ 12, 13 และ 14) ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในทั้ง 3 ส่วนน่าจะเป็นสารกลุ่มเดียวกัน แต่สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในส่วนที่ 10.2 อาจมีชนิดและ/หรือปริมาณที่มากกว่าส่วนที่ 10.1 และ 10.3 เนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าทั้ง 2 ส่วนดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะไดโอดอาเรย์สเปกตรัมที่แตกต่างจากทั้ง 2 ส่วน อีกทั้งในการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยการวิเคราะห์ HPLC พบว่าสามารถแยกส่วนที่ 10.2 ได้มากที่สุด ประมาณ 2 มิลลิกรัม ดังนั้นในการแยกสารให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปควรเลือกสารส่วนที่ 10.2