

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 3.1 ผลการทดสอบความสามารถของ *Burkholderia pseudomallei* ในการใช้น้ำตาล

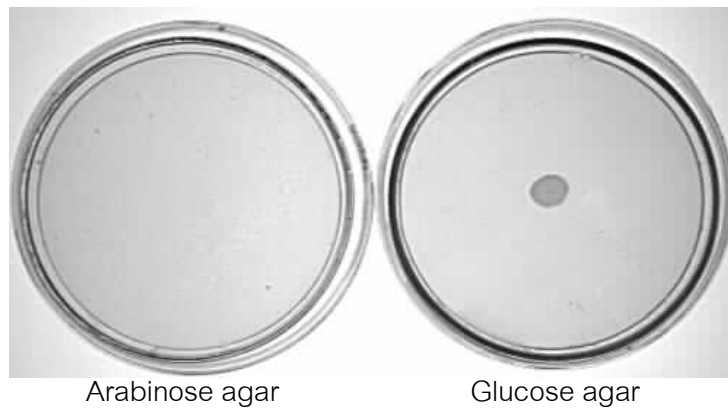
##### arabinose

เป็นที่ทราบกันดีว่า *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ไม่ใช้น้ำตาล arabinose ( $ara^-$ ) เป็นสายพันธุ์ก่อโรคและส่วนใหญ่จะแยกได้จากผู้ป่วย ในการศึกษาจึงต้องการเลือก *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ไม่ใช้น้ำตาล arabinose ( $ara^-$ ) มาทดสอบกับสารยับยั้งที่ Bacillus สร้างขึ้น

จากการทดสอบเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ PSU4, PSU6, PSU9, PSU12, PSU68, PSU69, BP1856-12, BP2182-11, BKPN100, PAT41, PATNAR31, SK31 และ SK39 ในการใช้น้ำตาล arabinose โดยมี glucose agar เป็นตัวควบคุม พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ PSU4, PSU9, PSU69, PATNAR31, SK31 และ SK39 ให้ผลบวก ( $ara^+$ ) (ตารางที่ 3.1) โดยเชื้อสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ arabinose agar และ glucose agar สำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ PSU6, PSU12, PSU68, BKPN100, PAT41, BP1856-12 และ BP2182-11 ให้ผลลบ ( $ara^-$ ) เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้เฉพาะบน glucose agar เท่านั้น (รูปที่ 3.1) จึงเลือกสายพันธุ์ PSU68 ( $ara^-$ ) มาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.1 ความสามารถของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ต่างๆในการใช้น้ำตาล arabinose

<i>B. pseudomallei</i> สายพันธุ์	Arabinose	<i>B. pseudomallei</i> สายพันธุ์	Arabinose
PSU4	+	BP2182-11	-
PSU6	-	BKPN100	-
PSU9	+	PAT41	-
PSU12	-	PATNAR31	+
PSU68	-	SK31	+
PSU69	+	SK39	+
BP1856-12	-		



รูปที่ 3.1 ผลการทดสอบ *B. pseudomallei* PSU68 ให้ผลลบในการใช้น้ำตาล arabinose

### 3.2 ผลการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ต่างๆจากดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินจากภาคใต้ ภาคเหนือ ภาคกลางในช่วง ฤดูร้อน ฤดูฝน และ ฤดูหนาวสามารถแยกเชื้อ *Bacillus* จากตัวอย่างดิน 79 ตัวอย่าง ได้ 218 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.2) โดยลักษณะโคโลนี *Bacillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA มีได้หลายแบบ ได้แก่ โคโลนีสีขาว ด้าน เยิ้ม และขอบไม่เรียบ เมื่อนำมาข้อมตีแกรม พบเชื้อรูป

แห่งตีดสีน้ำเงิน มีสปอร์ ในภาคเหนือเก็บตัวอย่างดิน 4 ตัวอย่าง พบตัวอย่างดินที่สามารถแยกเชื้อ *Bacillus* ได้ 2 ตัวอย่าง แยกเชื้อ *Bacillus* ได้ 16 ไอโซเลท ในภาคกลางเก็บตัวอย่างดิน 2 ตัวอย่าง พบตัวอย่างดินที่สามารถแยกเชื้อ *Bacillus* ได้ 2 ตัวอย่าง แยกเชื้อ *Bacillus* ได้ 11 ไอโซเลท ในภาคใต้เก็บตัวอย่างดิน 73 ตัวอย่าง พบตัวอย่างดินที่สามารถแยกเชื้อ *Bacillus* ได้ 44 ตัวอย่าง แยกเชื้อ *Bacillus* ได้ 191 ไอโซเลท

ตารางที่ 3.2 ผลการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* (ara<sup>-</sup>)

	จำนวน			
	ตัวอย่างดิน	ตัวอย่างดินที่แยก <i>Bacillus</i> ได้ (%)	<i>Bacillus</i> ที่แยกได้	<i>Bacillus</i> ที่ยับยั้ง <i>B. pseudomallei</i> (%)
ภาคเหนือ	4	2 (50.0)	16	4 (25.0)
ภาคกลาง	2	2 (100.0)	11	0
ภาคใต้	73	44 (60.3)	191	39 (20.4)
รวม	79	48	218	43

### 3.3 ผลการทดสอบ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ

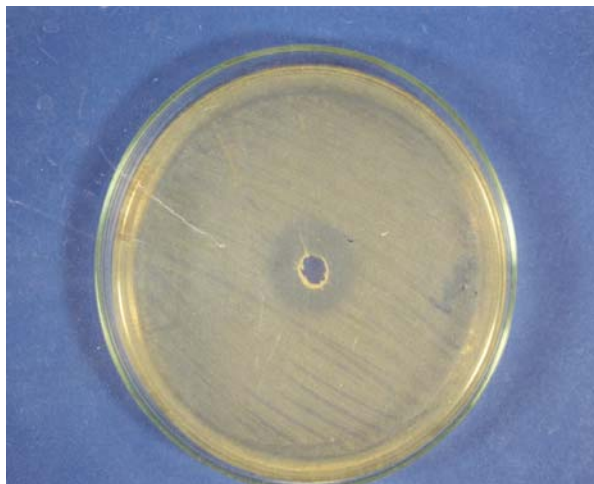
#### *B. pseudomallei*

จากการทดสอบเชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้จากดินทั้งหมด 218 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* (ara<sup>-</sup>) โดยวิธี agar well diffusion assay พบว่าเชื้อ *Bacillus* 43 ไอโซเลท สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* เป็นสายพันธุ์ที่แยกจากภาคเหนือ 4 ไอโซเลท และจากภาคใต้ 39 ไอโซเลท โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งเท่ากับ 8-12 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3.3) พบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 82 ให้ผลการยับยั้งมากที่สุด (12 มม.) (รูปที่ 3.2) จึงคัดเลือกสายพันธุ์นี้ไว้ศึกษาต่อไป และให้ชื่อว่าสายพันธุ์ PSU82Ba

ตารางที่ 3.3 ความสามารถของ Bacillus ในการยับยั้งการเจริญ *B. pseudomallei*

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)	จำนวน ไอโซเลต	หมายเลข ไอโซเลต
8	2	76, 180
9	9	60, 65, 79, 86, 89, 94, 98, 177, 179
10	22	6, 12, 28, 30, 36, 43, 50, 55, 58, 61, 63, 68, 73, 78, 80, 87, 91 109, 110, 116, 123, 176
11	9	4, 34, 46, 93, 102, 103, 105, 106, 107
12	1	82*

\* คือ Bacillus ที่ได้คัดเลือก



รูปที่ 3.2 การทดสอบการยับยั้ง *B. pseudomallei* ของ PSU82Ba บนอาหาร

Muller Hinton agar โดยวิธี agar well diffusion assay

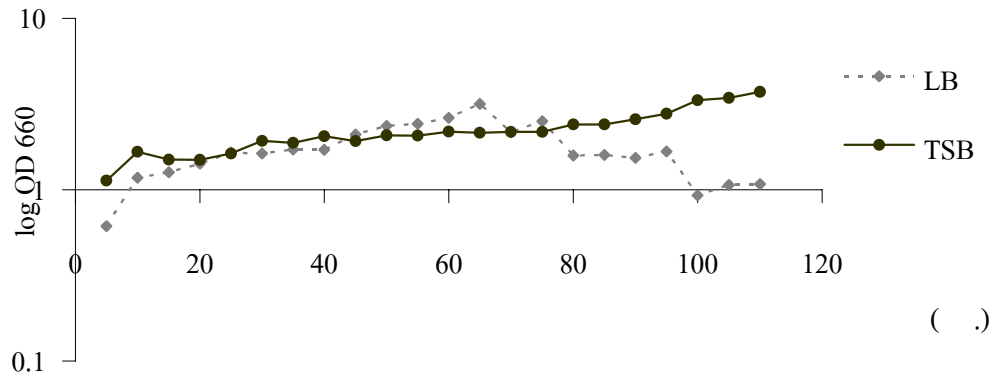
### 3.4 ผลของปัจจัยต่างๆต่อการสร้างสารยับยั้ง

#### 3.4.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง

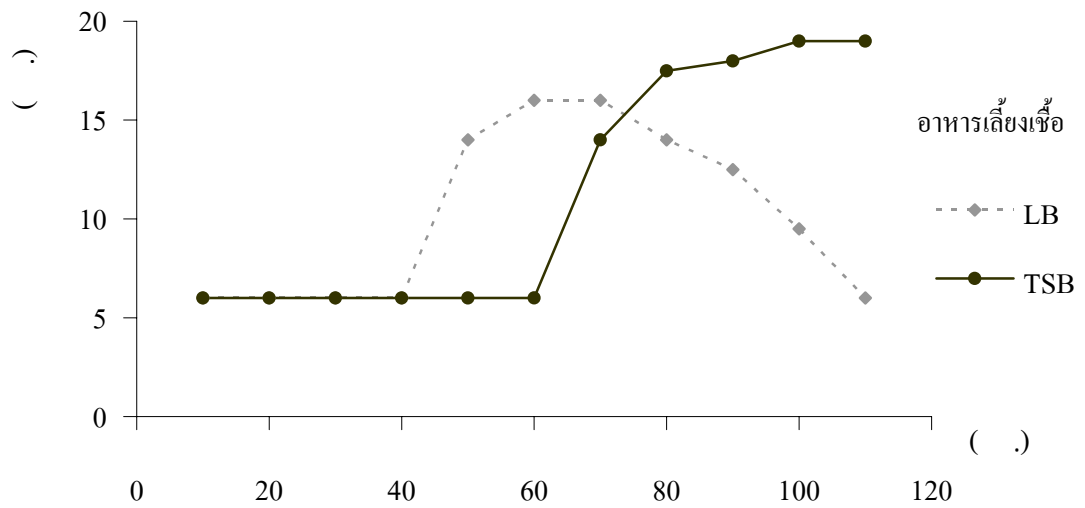
จากการเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ในอาหารเหลว LB และ TSB อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 1% พบว่าเชื้อ PSU82Ba มีการเจริญอย่างรวดเร็วตามเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยรูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อใน LB และ TSB ไม่ต่างกันในช่วง 70 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการเจริญของ PSU82Ba ใน LB เริ่มลดลง (รูปที่ 3.3) เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* โดยวิธี agar well diffusion assay พบว่าเชื้อเริ่มมีการสร้างสารยับยั้งใน LB หลังจาก 40 ชั่วโมงผ่านไป (รูปที่ 3.4) และสร้างได้สูงสุดเมื่อผ่านไป 70 ชั่วโมง หลังจากนั้นการสร้างสารยับยั้งลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่ใน TSB เชื้อเริ่มสร้างสารยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 60 และสร้างเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 110 ดังนั้นการทดสอบในขั้นต่อไป จึงใช้ TSB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* เนื่องจากเชื้อมีการสร้างสารยับยั้งในปริมาณมากกว่าและนานกว่า

#### 3.4.2 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการสร้างสารยับยั้ง

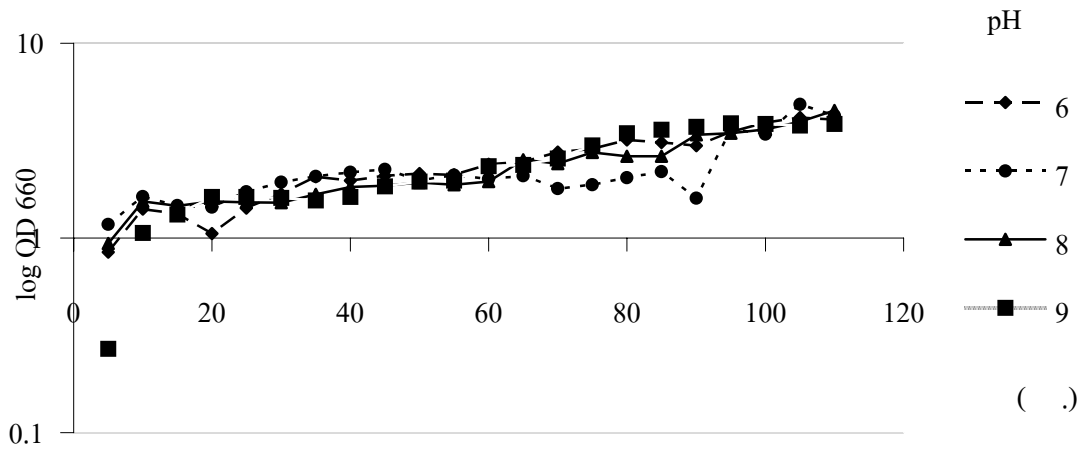
จากการเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ในอาหารเหลว TSB pH 6, 7, 8 และ 9 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 1% พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ PSU82Ba ที่ pH 6, 7, 8 และ 9 ไม่ต่างกัน (รูปที่ 3.5) เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* พบว่าเชื้อไม่มีการสร้างสารยับยั้งจนถึงชั่วโมงที่ 40 หลังจากนั้นเชื้อเริ่มสร้างสารยับยั้ง (รูปที่ 3.6) การสร้างสารยับยั้งจะสูงสุดที่ ชั่วโมงที่ 70 และพบมากที่สุดที่ pH 8 และ pH 9 ในชั่วโมงที่ 90 การสร้างสารยับยั้งใน pH 6 และ pH 7 เริ่มสูงขึ้นจนใกล้เคียงกับ pH 8 และ pH 9 และการสร้างสารยับยั้งใน pH 8 และ pH 9 เริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 100 ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือก pH 8 เป็น pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองต่อไป



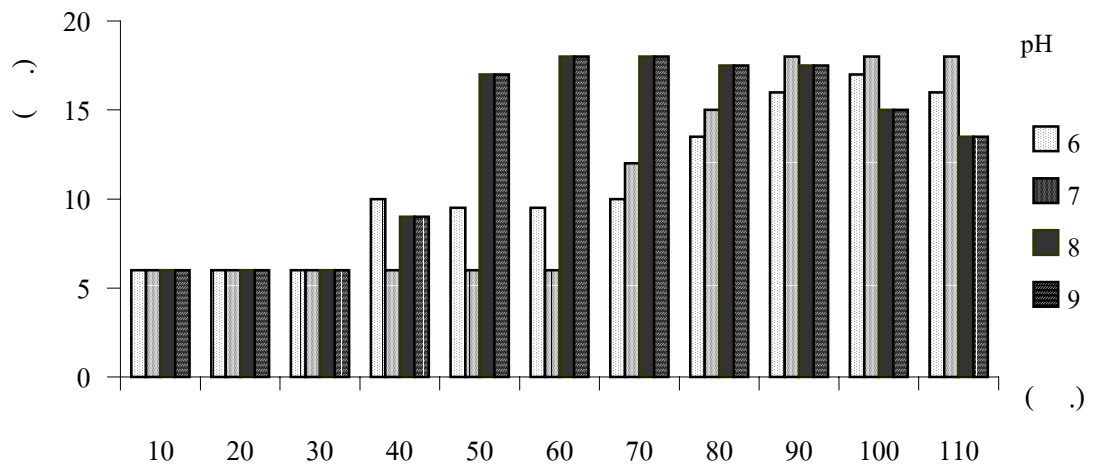
รูปที่ 3.3 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง LB และ TSB ต่อการเจริญของ PSU82Ba (ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ครั้ง)



รูปที่ 3.4 การสร้างสารยับยั้งของ PSU82Ba ต่อ *B. pseudomallei* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ TSB (ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ครั้ง)



รูปที่ 3.5 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการเจริญของ PSU82Ba (ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)



รูปที่ 3.6 การสร้างสารยับยั้งของ PSU82Ba ต่อ *B. pseudomallei* ที่ pH เริ่มต้นต่างๆ (ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)

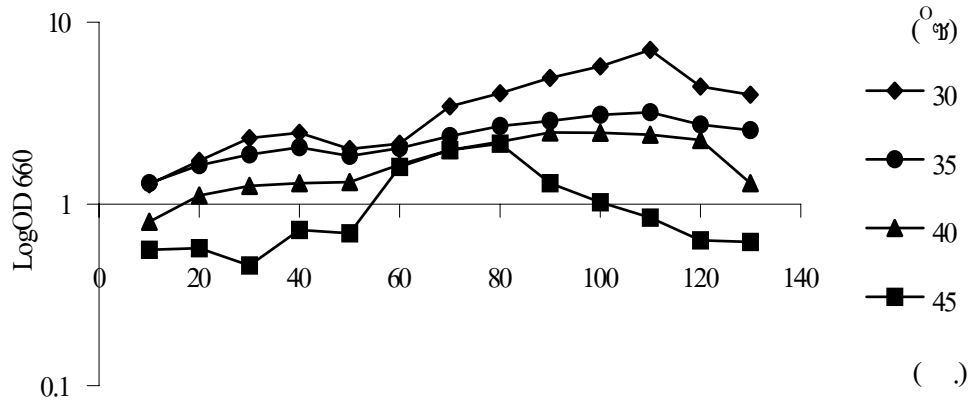
### 3.4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารยับยั้ง

จากการเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ในอาหารเหลว TSB, pH 8 อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 1% พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 70 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญมากกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ (รูปที่ 3.7) และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญที่น้อยกว่าอุณหภูมิอื่น เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* พบว่า ชั่วโมงที่ 30 เชื้อเริ่มมีการสร้างสารยับยั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.8) จนถึงชั่วโมงที่ 90 การสร้างเริ่มลดลง การสร้างสารยับยั้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณมากกว่าการสร้างที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อเริ่มมีการสร้างสารยับยั้งในชั่วโมงที่ 70 และสร้างสูงสุด ชั่วโมงที่ 80 จากนั้นการสร้างค่อยๆลดลง อย่างไรก็ตามตรวจไม่พบการสร้างสารยับยั้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิเหมาะสมที่สุดในการสร้างสารยับยั้งและได้ใช้เป็นอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ในขั้นตอนต่อไป

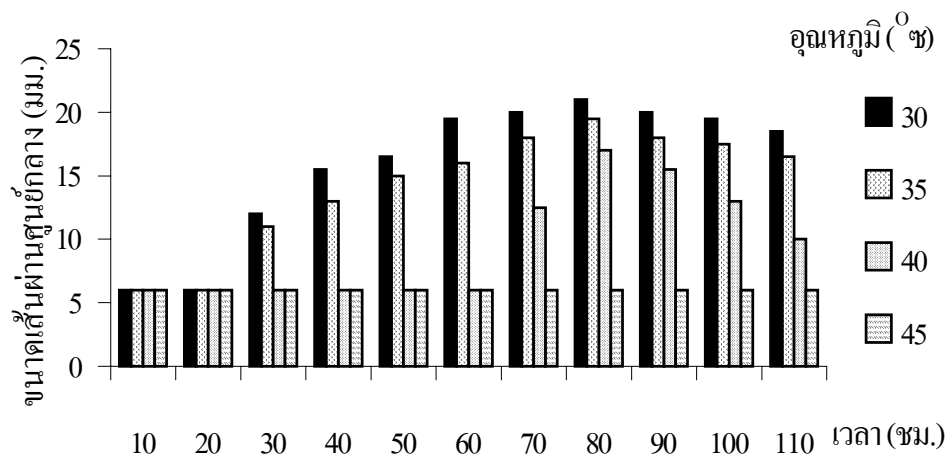
### 3.4.4 การศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้ง

จากการเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ในอาหารเหลว TSB, pH 8 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 1%, 2% และ 4% พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1%, 2% และ 4% การเจริญของเชื้อไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 3.9) เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 1%, 2% และ 4% เริ่มมีการสร้างสารยับยั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 40 (รูปที่ 3.10) และเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 80 จากนั้นเริ่มลดลง พบว่าชั่วโมงที่ 60 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4% เชื้อมีการสร้างสารยับยั้งมากกว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นอื่นๆ จึงเลือกปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4% เป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

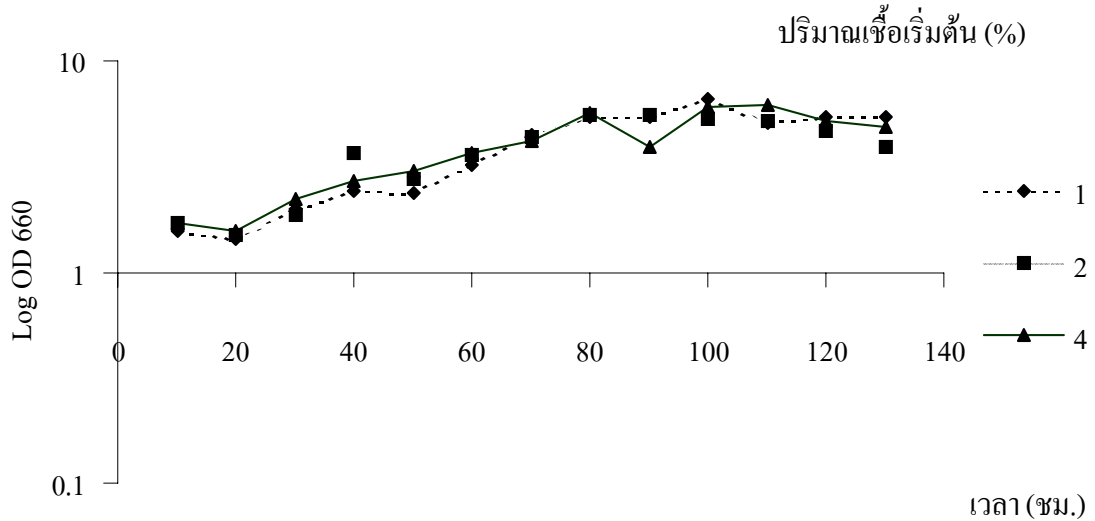




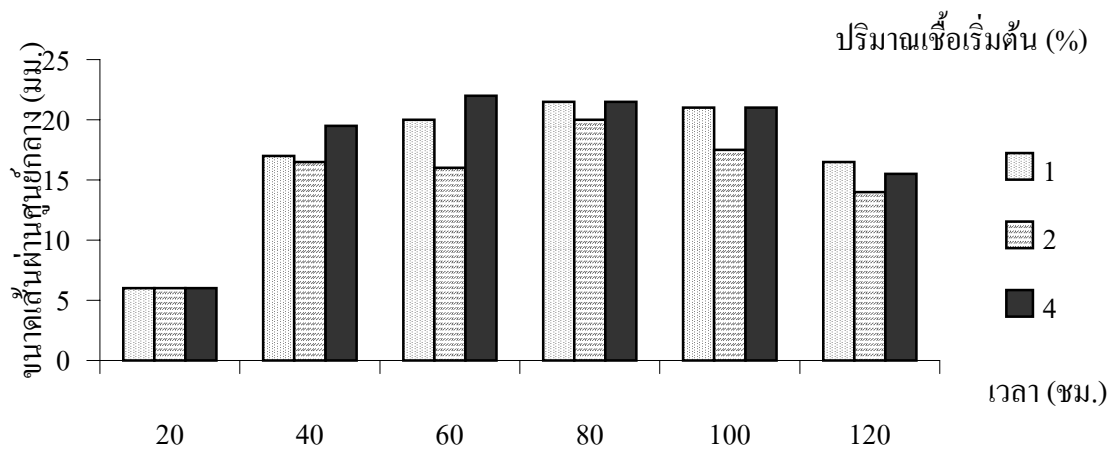
รูปที่ 3.7 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ PSU82Ba  
(ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)



รูปที่ 3.8 การสร้างสารยับยั้งของ PSU82Ba ต่อ *B. pseudomallei* ที่อุณหภูมิต่างๆ  
(ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)



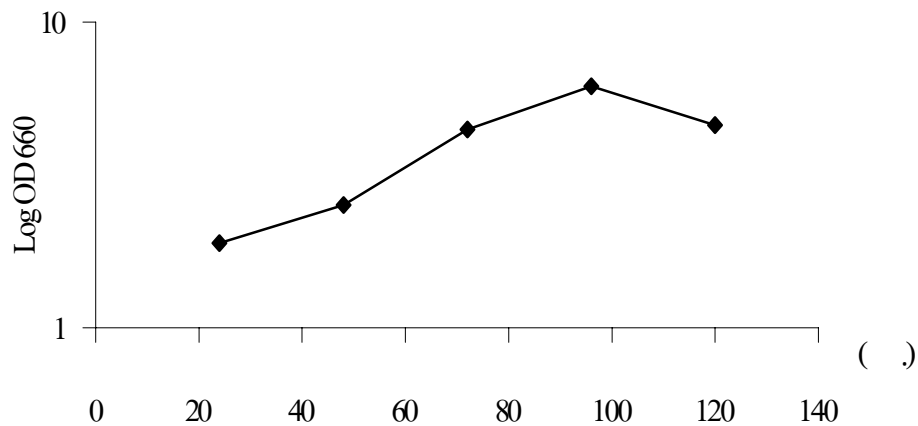
รูปที่ 3.9 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญของ PSU82Ba  
(ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)



รูปที่ 3.10 การสร้างสารยับยั้งของ PSU82Ba ต่อ *B. pseudomallei* ที่  
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1%, 2% และ 4%  
(ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)

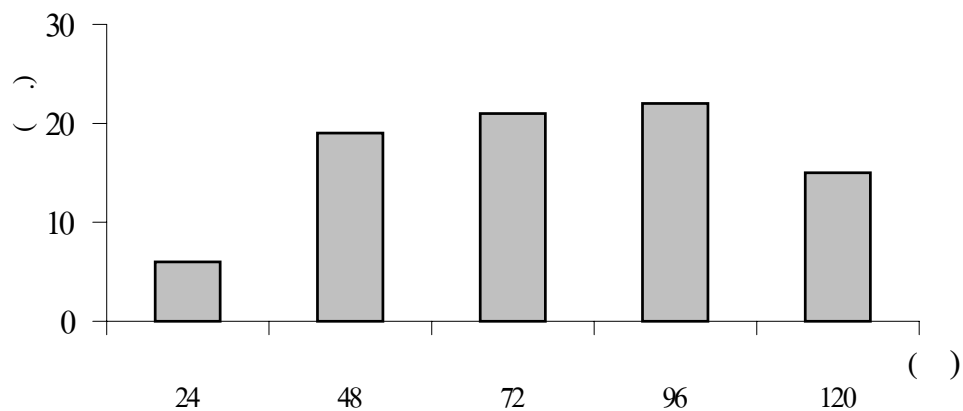
### 3.2.5 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้ง

จากการเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ในอาหารเหลว TSB pH 8 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 4% เก็บตัวอย่างที่เวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงพบว่าเชื้อ PSU82Ba มีการเจริญอย่างรวดเร็วตามเวลาที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.11) เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* พบว่าเชื้อเริ่มมีการสร้างสารยับยั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 และเพิ่มขึ้นจนสูงสุดชั่วโมงที่ 96 จากนั้นการสร้างสารยับยั้งค่อยๆลดลง (รูปที่ 3.12) ดังนั้นในการเตรียมสารยับยั้งเพื่อศึกษาในขั้นต่อไปจึงเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง



รูปที่ 3.11 ผลของเวลาต่อการเจริญของ PSU82Ba

(ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)



รูปที่ 3.12 การสร้างสารปฏิชีวนะของ PSU82Ba ต่อ *B. pseudomallei* ที่เวลาต่างๆ

(ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)

### 3.5 ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้ง

#### 3.5.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Centriprep

จากการเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้หลอด Centriprep YM-10 (บริษัท milipore) พบสารละลายแยกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน และส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตัน พบการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* ทั้ง 2 ส่วน แต่ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน ให้ผลการยับยั้งสูงกว่าส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตัน (ตารางที่ 3.4) แสดงว่า สารยับยั้งเป็นสารที่มีขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตันและอาจประกอบด้วยสารมากกว่า 1 ชนิด บางชนิดมีขนาดเล็กและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ดาลตัน

ตารางที่ 3.4 การทดสอบสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ต่อ *B. pseudomallei* ที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ

น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)
น้ำเลี้ยงเชื้อ	22
มากกว่า 10,000	22
น้อยกว่า 10,000	10.5

#### 3.5.2 ผลความไวของสารยับยั้งต่อความร้อน

จากการเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบกับความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (ตารางที่ 3.5) พบว่าสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นสารที่ทนความร้อนได้ (heat stable) อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที การยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* ลดลงเล็กน้อย แสดงว่าสารยับยั้งที่สร้างจาก PSU82Ba มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนสูงถึงอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที

ตารางที่ 3.5 ผลของความร้อนที่มีต่อสารยับยั้งในการขัดขวางการเจริญของ

*B. pseudomallei*

สารยับยั้ง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)
น้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ให้ความร้อน	22
100°C 10 นาที	21
100°C 20 นาที	20
100°C 30 นาที	19
121°C 15 นาที	15

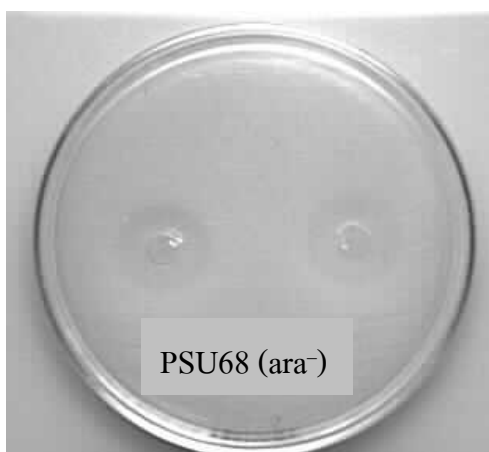
(ผลที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองทั้งหมด 2 ชั่วโมง)

3.2.3 ความสามารถของสารยับยั้งต่อแบคทีเรียชนิดอื่น

จากการเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อต่างๆ (ตารางที่ 3.6) พบว่าสารยับยั้งที่สร้างจาก PSU82Ba สามารถยับยั้งเชื้อแกรมบวก *S. pneumoniae* และแกรมลบ *Acinetobacter* spp. และ *Shigella* spp. โดยพบความสามารถในการยับยั้งสูงสุดในเชื้อ *Acinetobacter* spp. (21 มม.) และที่น่าสนใจคือไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. pseudomallei* PSU69 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *ara*<sup>+</sup> อย่างไรก็ตามสารนี้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแกรมบวก *B. subtilis*, *E. faecalis* และ *S. aureus* และเชื้อแกรมลบ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* และ *Salmonella* spp. แสดงว่าสารยับยั้งนี้สามารถยับยั้งเชื้อได้บางสายพันธุ์เท่านั้น

ตารางที่ 3.6 ความสามารถของสารยับยั้งในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น

เชื้อทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)
<i>B. pseudomallei</i> PSU68 (ara <sup>-</sup> )	20
<i>Acinetobacter</i> spp.	21
<i>B. subtilis</i>	6
<i>E. faecalis</i>	6
<i>E. coli</i>	6
<i>K. pneumoniae</i>	6
<i>P. mirabilis</i>	6
<i>P. aeruginosa</i>	6
<i>Salmonella</i> spp.	6
<i>Shigella</i> spp.	11
<i>S. aureus</i>	6
<i>S. pneumoniae</i>	11
<i>B. pseudomallei</i> PSU69 (ara <sup>+</sup> )	6



รูปที่ 3.13 ความสามารถของสารยับยั้งในการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* PSU68 (ara<sup>-</sup>) และ PSU69 (ara<sup>+</sup>)

### 3.2.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารยับยั้งต่อโครงสร้างของ *B. pseudomallei* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการบ่มน้ำเลี้ยงเชื้อกับ *B. pseudomallei* PSU68 (ara<sup>-</sup>) และ PSU69 (ara<sup>+</sup>) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าสารยับยั้งมีฤทธิ์ต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิด แต่ความรุนแรงของสารยับยั้งที่มีต่อ *B. pseudomallei* ara<sup>-</sup> มีมากกว่า (รูปที่ 3.14 B และ C) โดยพบความเสียหายของผนังเซลล์ลึกกว่าที่พบใน *B. pseudomallei* ara<sup>+</sup> (รูปที่ 3.14 E และ F) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

### 3.2.5 ผลการหาค่า MIC และ MBC ของสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba

จากการศึกษาเพื่อยืนยันว่าสารยับยั้งจาก PSU82Ba ออกฤทธิ์จำเพาะต่อ *B. pseudomallei* ara<sup>-</sup> มากกว่า *B. pseudomallei* ara<sup>+</sup> จึงได้ทำการตรวจสอบค่า MIC และ MBC พบว่าสารยับยั้งมีค่า MIC ต่อ *B. pseudomallei* ara<sup>-</sup> และ *B. pseudomallei* ara<sup>+</sup> เท่ากับ 1:16 และ 1:4 ตามลำดับ ส่วนค่า MBC ต่อ *B. pseudomallei* ara<sup>-</sup> และ *B. pseudomallei* ara<sup>+</sup> เท่ากับ 1:8 และ 1:2 ตามลำดับ เมื่อทดสอบ *B. pseudomallei* ทั้งสองสายพันธุ์กับยา ceftazidime (ชุดควบคุม) มีค่า MIC เท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน

## 3.3 การแยกสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ที่เตรียมจากข้อ 2.3.4.2) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* ตามวิธีการในข้อ 2.3.3 พบว่าให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ความเจือจาง 1:2 เท่ากับ 14 มิลลิเมตร มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 50 มิลลิกรัม หลังจากตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40% พบว่าให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส เท่ากับ 14 มิลลิเมตร เมื่อเจือจางสารยับยั้งลง 50 เท่า มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1.94 มิลลิกรัม (ตารางที่ 3.7) เมื่อนำสารปฏิชีวนะที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านการไดอะไลซ์แล้วไปทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบแถบโปรตีน 1 แถบขนาด 650 กิโลดาลตัน (ตรงลูกศรรูปที่ 3.15) เมื่อตัดวุ้นและให้นำสารในเนื้อวุ้นไปทดสอบการ

ยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ตามวิธีในข้อ 2.3.3 โดยการนำวุ้นวางบนอาหารแล้วชะสารยับยั้งออกจากวุ้นโดย TB พบความสามารถในการยับยั้ง *B. pseudomallei* ในวุ้นชั้นที่ 18 และ 19 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 17 และ 21 มิลลิเมตรตามลำดับ และเมื่อสกัดสารจากวุ้นโดยวิธีการบดวุ้นพบว่าให้ผลยับยั้งในวุ้นชั้นที่ 18 และ 19 เช่นกัน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 16 และ 26 มิลลิเมตรตามลำดับ ขณะที่แถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 650 กิโลดาลตัน ซึ่งอยู่ในชั้นวุ้นที่ 4 ไม่พบการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* (รูปที่ 3.15 และรูปที่ 3.16)

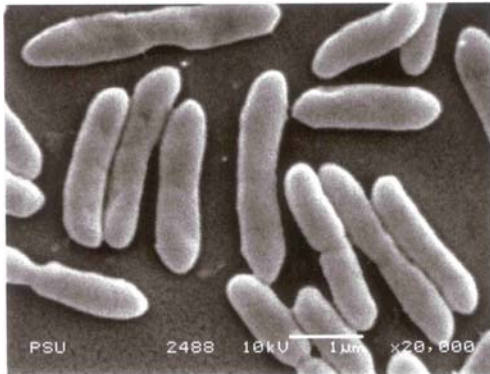
เมื่อนำสารที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 หลังชะคอลัมน์ด้วย 25 mM Tris-HCl, pH 8.8-10% glycerol พบว่าสามารถแยกสารยับยั้งออกเป็น 2 peak คือ peak S<sub>1</sub> (รูปที่ 3.17) พบการยับยั้ง *B. pseudomallei* โดยให้เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 15 มิลลิเมตร ในหลอดที่ 19 ซึ่งถูกชะออกมาจากคอลัมน์ Sephadex G-50 ตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน BSA (ปริมาตรภายนอกของคอลัมน์, V<sub>o</sub>) และ peak S<sub>2</sub> (หลอดที่ 39) พบการยับยั้ง *B. pseudomallei* โดยให้เส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งสูงที่สุด 20 มิลลิเมตร โดยถูกชะออกมาจากคอลัมน์ตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐาน K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์, V<sub>t</sub>) เมื่อนำสารยับยั้งในหลอดที่ 19-25 (pool peak S<sub>1</sub>) ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. pseudomallei* มารวมกันแล้วทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose จากการทดลอง พบว่าสารยับยั้งจาก pool peak S<sub>1</sub> ให้เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งที่ความเจือจาง 1:4 เท่ากับ 11 มิลลิเมตร ขณะที่ peak S<sub>2</sub> (หลอดที่ 39) ให้เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 10 มิลลิเมตร เมื่อเจือจางสารยับยั้งลง 2 เท่า แต่ไม่สามารถตรวจพบโปรตีนโดยการหาโปรตีนด้วยวิธีเบรคฟอร์ดได้

เมื่อนำสารยับยั้ง pool peak S<sub>1</sub> และ peak S<sub>2</sub> ไปทำ ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพแล้วตัดวุ้นเป็นชิ้นขนาดเล็ก แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* พบสารยับยั้งจากทั้ง 2 peak โดยพบในชั้นเจลลำดับที่ 17-20 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ เมื่อตรวจสอบโปรตีนในวุ้นด้วยการย้อมสีคูมาซีบลู พบโปรตีนเฉพาะใน pool peak S<sub>1</sub> แต่ไม่พบใน peak S<sub>2</sub> (รูปที่ 3.18 และรูปที่ 3.19)

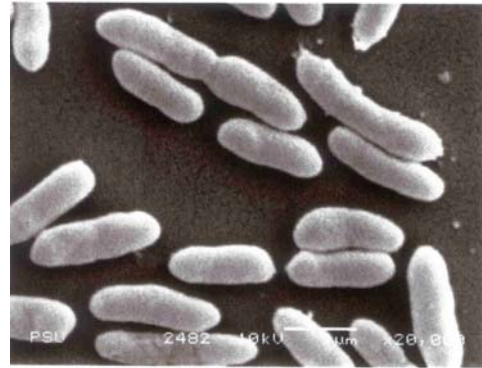


### 3.4 ผลการบ่งชี้ PSU82Ba ทางชีวเคมี

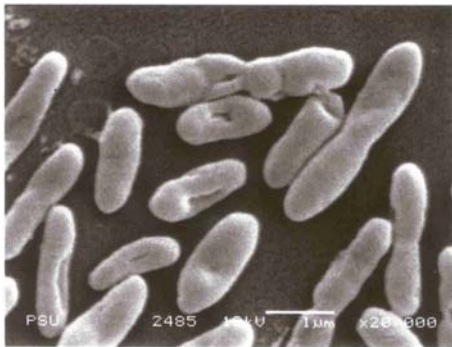
จากการทดสอบ พบว่าลักษณะโคโลนี PSU82BA บน BA มีสีขาว ขอบไม่เรียบ ให้  $\beta$ -hemolysis ให้ผลบวกใน PR-glucose, OF-xylose, starch agar, skim milk agar, nitrate broth, casine agar, tributyrin agar, gelatin และ motile และให้ผลลบใน citrate, PR-arabinose, PR-mannitol, Gas of glucose, indole, Tyrosine agar, VP และ growth in 50, 60 องศาเซลเซียส และ growth in 7%NaCl แสดงว่า PSU82Ba ไม่ใช่ *B. anthracis* และ *B. cereus* ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์

*B. pseudomallei* ara<sup>-</sup>

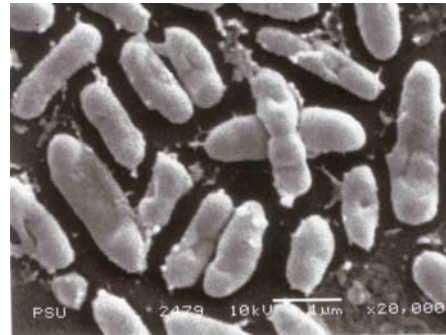
A กำลังขยาย x 20,000

*B. pseudomallei* ara<sup>+</sup>

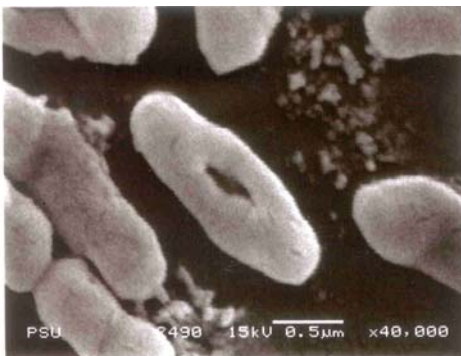
D กำลังขยาย x 20,000



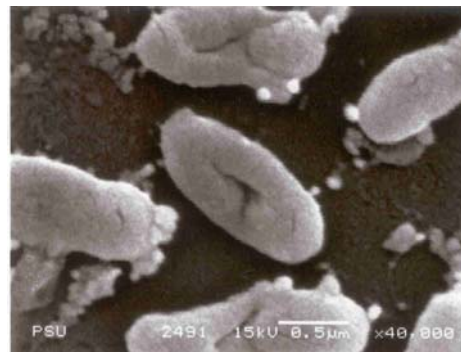
B กำลังขยาย x 20,000



E กำลังขยาย x 20,000



C กำลังขยาย x 40,000



F กำลังขยาย x 40,000

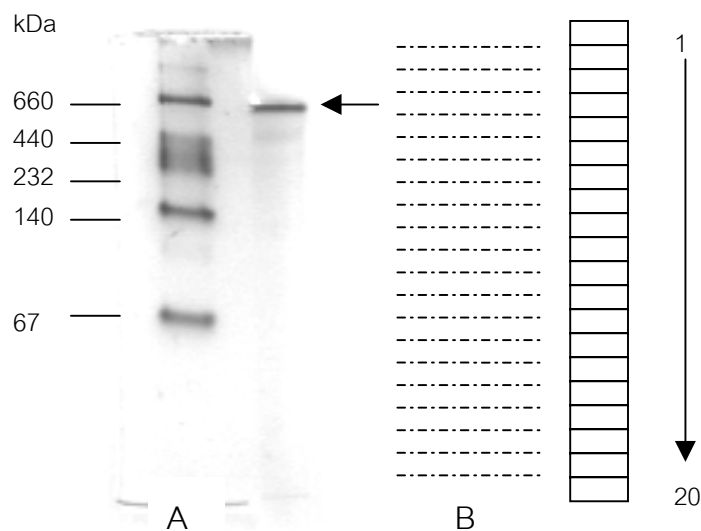
รูปที่ 3.14 ความสามารถของสารยับยั้งต่อโครงสร้างของ *B. pseudomallei* ด้วยกล้อง SEM

A-C = *B. pseudomallei* ara<sup>-</sup> โดย A เป็นชุดควบคุม, B+C เติมสารยับยั้ง

D-F = *B. pseudomallei* ara<sup>+</sup> โดย D เป็นชุดควบคุม, E+F เติมสารยับยั้ง

ตารางที่ 3.7 สมบัติของสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อจากการแยกในขั้นตอนต่างๆ

น้ำเลี้ยงเชื้อ	ปริมาตร (ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	เส้นผ่านศูนย์กลาง วงใส มม. (dilution)
Crude	500	0.10	14(1:2)
หลังตกตะกอนด้วย 40%(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7	0.277	14(1:50)
หลังผ่าน Sephadex G-50			
-peak S <sub>1</sub> , pool tube 19-25	0.7	0.37	11 (1:4)
-peak S <sub>1</sub> , tube 19	0.5	0.10	15
-peak S <sub>2</sub> , tube 39	0.5	-	10 (1:2)



รูปที่ 3.15 ชุด A แบบแผนของโปรตีนเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพบน

4-10% วัุ้นโพลีอะคริลาไมด์ แล้วย้อมด้วยสี กูมาซีบลู

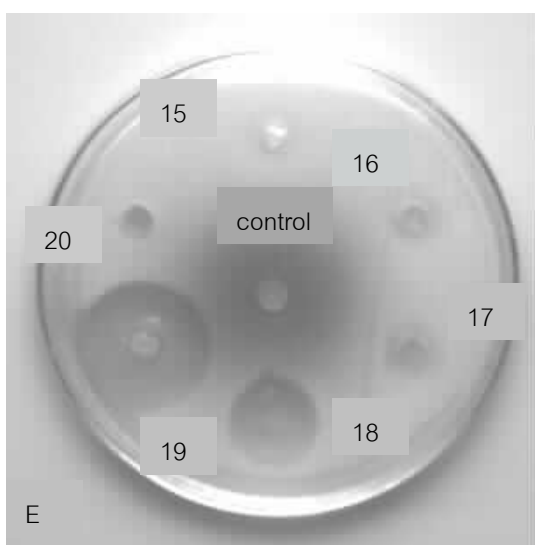
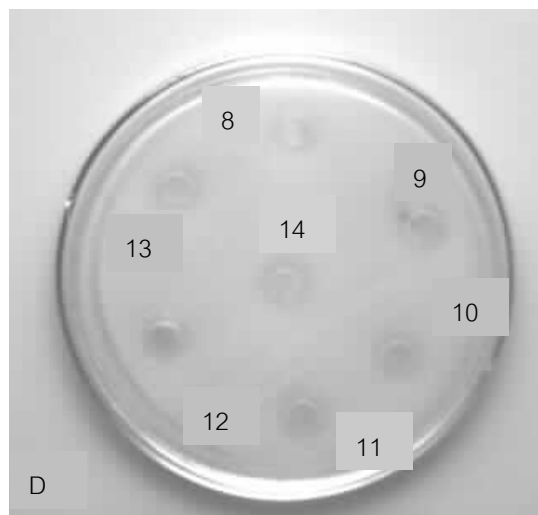
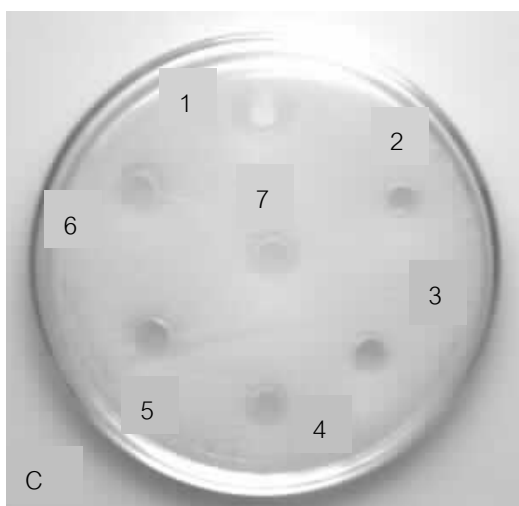
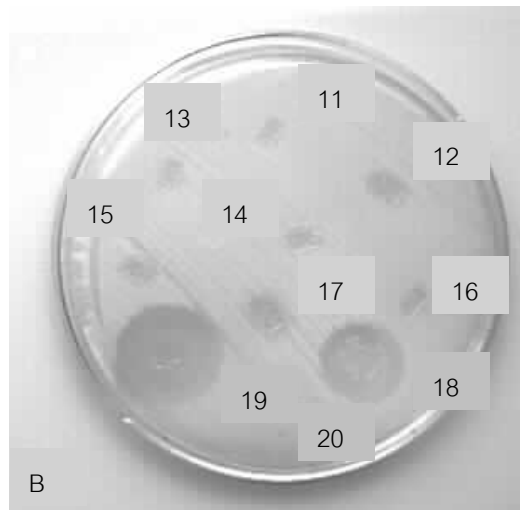
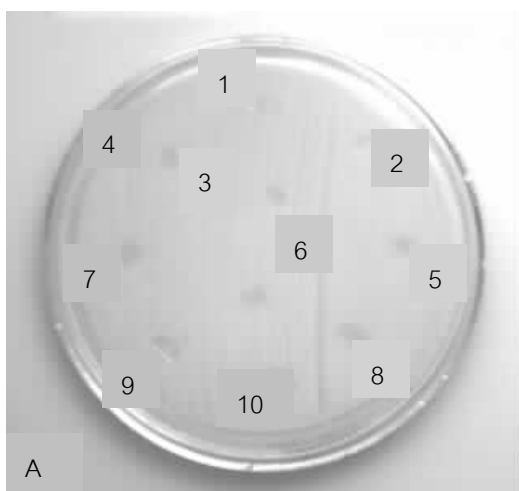
ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 น้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba

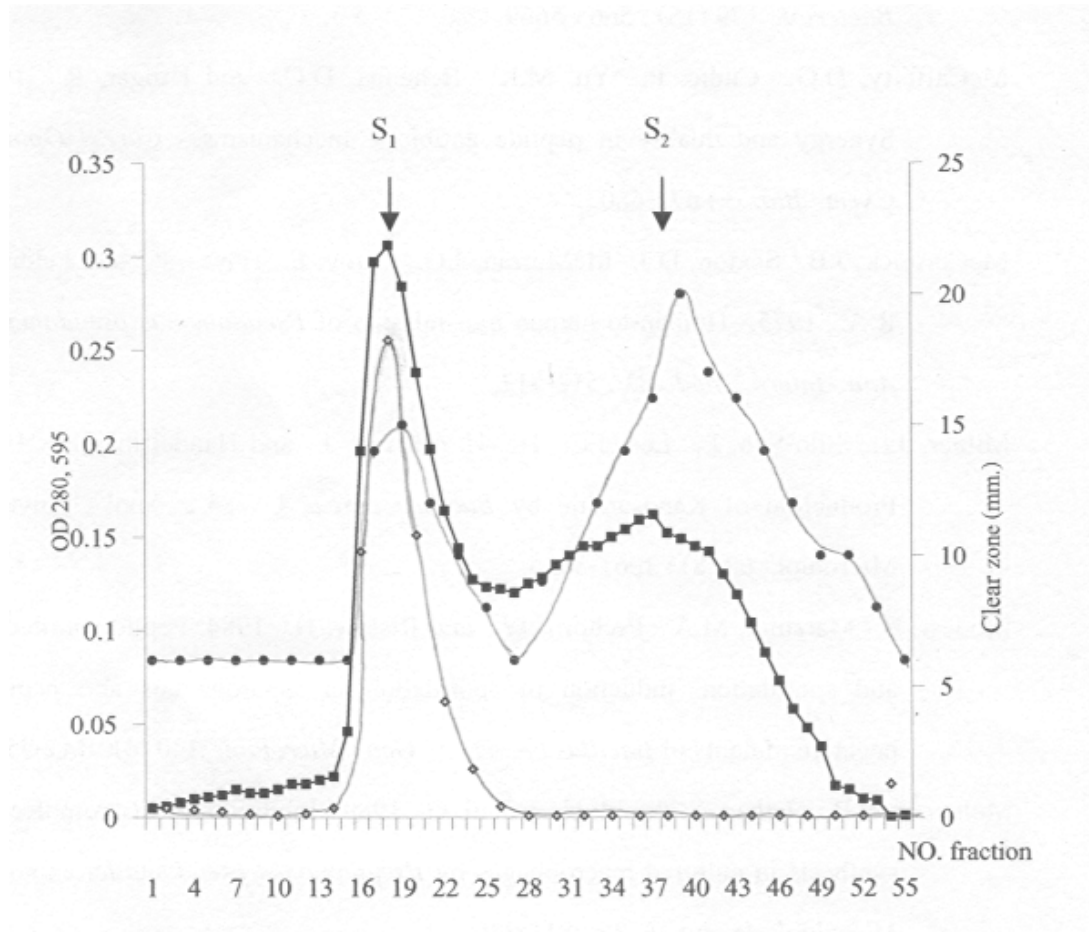
ช่องที่ 3 น้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba หลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ชุด B การตัดแถบโปรตีนจากแผ่นวัุ้น (ช่องที่ 3) เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ

*B. pseudomallei*

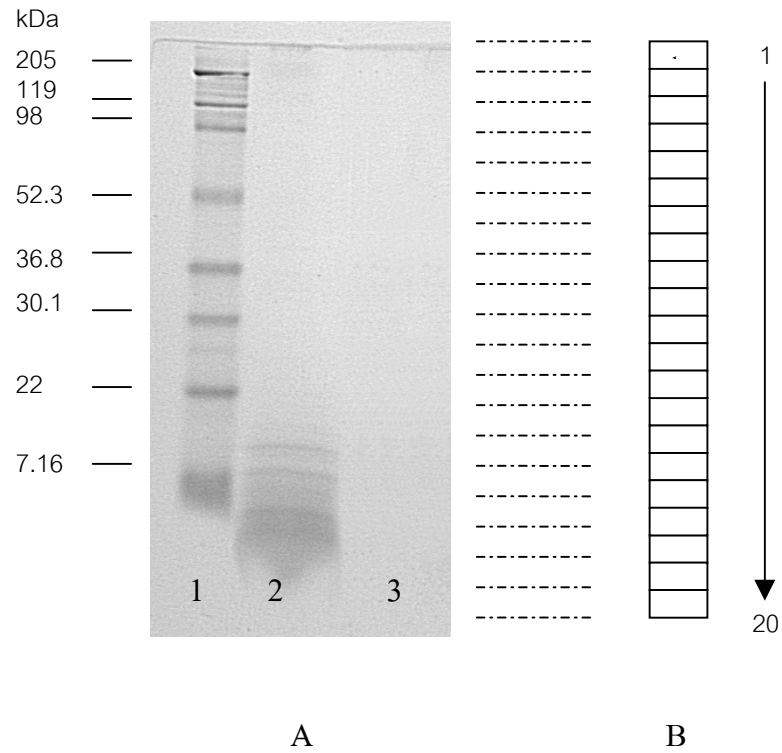


รูปที่ 3.16 การยับยั้ง *B. pseudomallei* ของสารยับยั้งที่ผ่านการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วทำอิเลกโทรพอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ  
 A-B: สารยับยั้งที่ชะด้วยบัฟเฟอร์ TB จากจีน วัน 1-20  
 C-E: สารยับยั้ง ที่สกัดจากจีนวัน 1-20

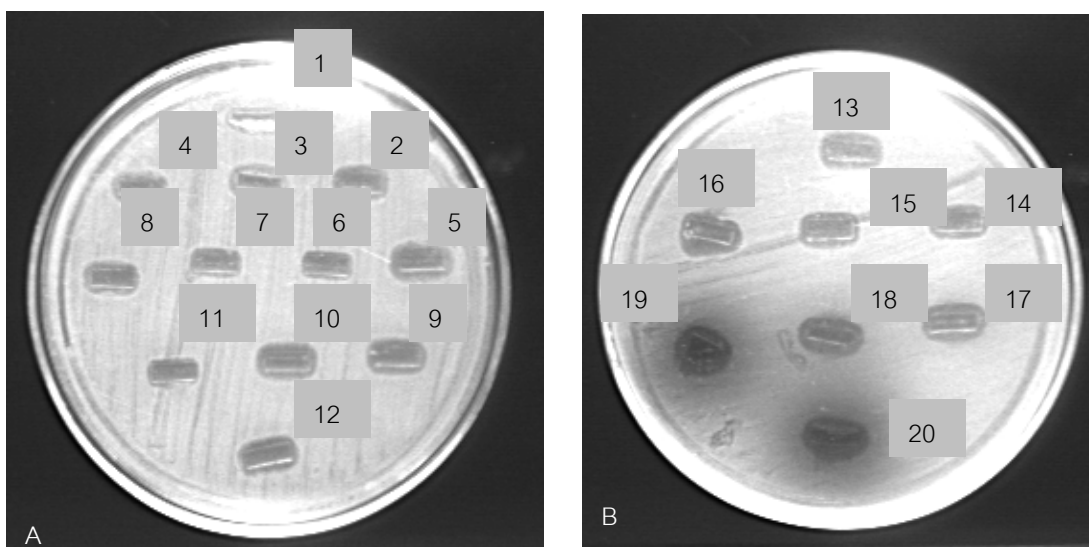


- OD 280
- OD 595
- clear zone (mm.)

รูปที่ 3.17 การแยกสารยับยั้งที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตด้วย  
คอลัมน์ Sephadex G-50



รูปที่ 3.18 ชุด A แบบแผนของโปรตีนจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ 10-20% เจล ย้อมด้วยสีคูมาซีบลู  
 ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน  
 ช่องที่ 2 pool peak  $S_1$  ผ่าน Sephadex G-50  
 ช่องที่ 3 peak  $S_2$  ผ่าน Sephadex G-50  
 ชุด B การตัดแถบโปรตีนจากแผ่นวุ้น ช่องที่ 2 (pool peak  $S_1$ ) และช่องที่ 3 ( $S_2$ ) เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei*



รูปที่ 3.19 การยับยั้ง *B. pseudomallei* ของสารยับยั้งหลังผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 และทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ แล้วตัดวุ้นเป็นชิ้นขนาดเท่ากัน 1-20 ชิ้น  
A-B ชิ้นวุ้นจาก pool peak S<sub>1</sub>