4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัยของราเอ็นโดไฟท์

4.1. ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมสำหรับทดสอบราและเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์จากราเอ็นโดไฟท์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

การศึกษา antibiosis ของราเอ็นโดไฟท์ Th21 และ Th121 จากใบโพธิ์ทะเลในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *Alternalia brassicicola* และ *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร 0.5xPDA, SDA และ LNA พบว่า เอ็นโดไฟท์ Th21 สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดีบนอาหารทั้ง 3 ชนิด แต่ไม่ยับยั้ง *A. brassicicola* ในขณะที่ Th121 ยับยั้ง *A. brassicicola* ได้บนอาหารทั้ง 3 ชนิด แต่ไม่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* พบว่าระดับ antibiosis ของ Th121 บนอาหาร 0.5x PDA และ SDA เท่ากันและดีกว่า บนอาหาร LNA (ภาพที่ 1-3 และตารางที่ 6)

การศึกษา antibiosis ของราเอ็นโดไฟท์ Sc10A3 และ Sc15A3 จากใบลำพูในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* และ *Fusarium oxysporum* บนอาหาร 0.5xPDA, SDA และ LNA พบว่าทั้ง Sc10A3 และ Sc15A3 สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* และ *F. oxysporum* บนอาหาร 0.5x PDA และ SDA ได้ดีใกล้เคียงกัน แต่ไม่ยับยั้งบนอาหาร LNA

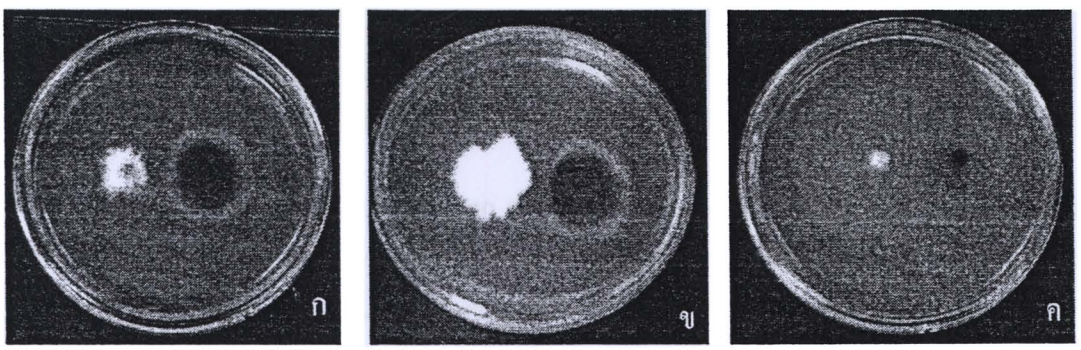
การศึกษา antibiosis ของราเอ็นโดไฟท์ Br830 และ Br834 จากใบโปรงแดง ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* บนอาหาร 0.5xPDA, SDA และ LNA พบว่า Br830 สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *C .gloeosporioides* และ *F. oxysporum* บนอาหาร 0.5xPDA และ SDA ได้ใกล้เคียงกัน และดีกว่า บนอาหาร LNA ส่วน Br834 ยับยั้งราทั้งสองชนิดได้ดีบนอาหาร SDA

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ราเอ็นโดไฟท์แสดงการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีบนอาหารแข็งที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (SDA) ถึงค่อนข้างสมบูรณ์ (0.5xPDA) ขณะที่บน LNA ซึ่งมีสารอาหารต่ำเอ็นโดไฟท์ส่วนใหญ่ที่ศึกษาไม่ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของราเอ็นโดไฟท์และราสาเหตุโรคพืชด้วย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้คัดเลือกเฉพาะอาหารแข็งที่มีสารอาหารสมบูรณ์พอควร (SDA และ 0.5x PDA) ไปทำการศึกษาในขั้นต่อไป

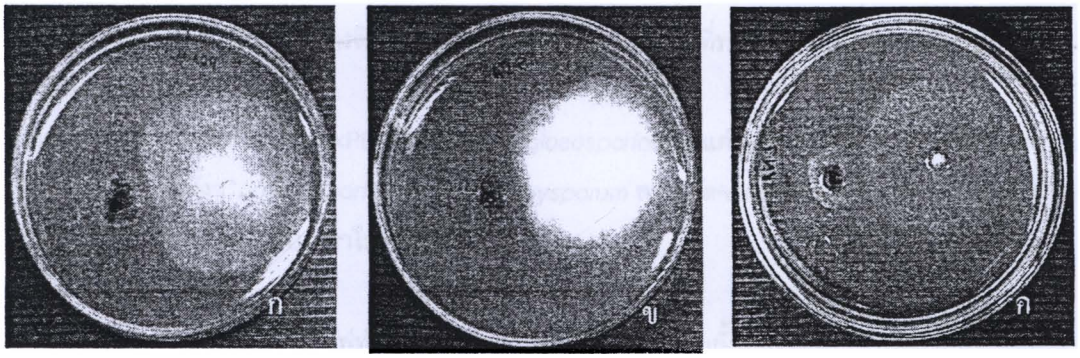
ตารางที่ 6 ผล antibiosis ระหว่างราเอ็นโดไฟท์กับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน

เอ็นโดไฟท์	ระดับความสามารถในการเกิด antibiosis บนอาหารเลี้ยงเชื้อ								
	A. brassicicola			*C. gloeosporioides*			*F. oxysporum*		
	0.5x PDA	SDA	LNA	0.5x PDA	SDA	LNA	0.5x PDA	SDA	LNA
Th21	-	-	-	3+	2+	3+	ND	ND	ND
Th121	3+	3+	-	-	-	-	ND	ND	ND
Sc10A3	2+	2+	-	ND	ND	ND	2+	2+	-
Sc15A3	3+	3+	-	ND	ND	ND	2+	2+	-
Br 830	ND	ND	ND	4+	4+	1+	4+	3+	1+
Br 834	ND	ND	ND	4+	3+	4+	1+	3+	1+

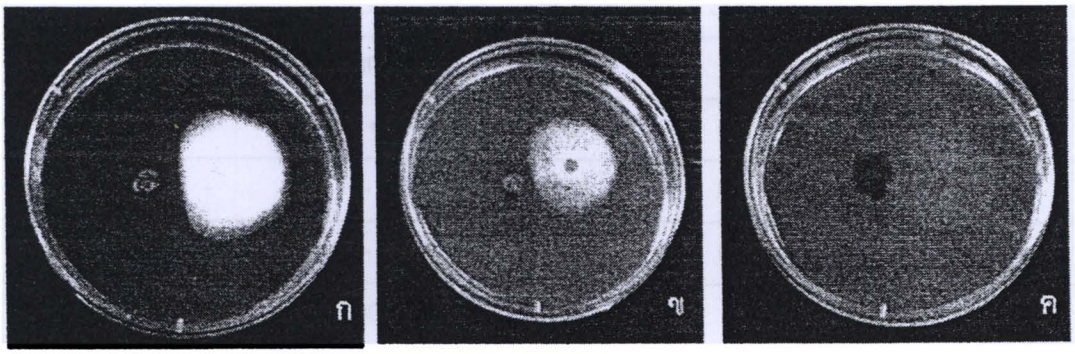
หมายเหตุ ND= ไม่ได้ทดสอบ



ภาพที่ 1 ระดับ antibiosis ในวันที่ 4 ของการเจริญ Th121 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร), ก: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร SDA; ค: ไม่พบ antibiosis บนอาหาร LNA



ภาพที่ 2 ระดับ antibiosis ของ SC15A3 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *F. oxysporum* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 วัน, ก: ระดับความแรง 2+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 2+ บนอาหาร SDA; ค: ไม่ยับยั้งการเจริญบนอาหาร LNA



ภาพที่ 3 ระดับ antibiosis เมื่อเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Br830 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *F. oxysporum* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 วัน, ก: ระดับความแรง 4+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร SDA; ค: ระดับความแรง 1+ บนอาหารLNA

4.2. การศึกษาชนิดอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงราเอ็นโดไฟท์เพื่อสกัดสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ

ผลจากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า เมื่อศึกษาสารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมักรา Th21 ที่เลี้ยงใน 0.5xPDB และ SDB พบว่าสารสกัดทั้งที่เตรียมจากน้ำหมัก 0.5xPDB และ SDB 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดี คือให้ผลการยับยั้งระดับ 3+ เหมือนกัน สารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมัก 0.5xPDA ของรา Th121 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้ง *A. brassicicola* ได้ในระดับ 1+ ขณะที่สารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมัก SDB ไม่ยับยั้ง แต่เมื่อเพิ่มปริมาสารสกัดที่ทดสอบเป็น 40 ไมโครลิตร สามารถยับยั้ง *A. brassicicola* ได้ในระดับ 1+

เมื่อศึกษาสารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมักรา Sc10A3 และ Sc15A3 ที่เลี้ยงใน 0.5xPDB และ SDB พบว่าสารสกัดที่เตรียมจาก 0.5xPDB และ SDB 20 ไมโครลิตร สามารถยับยั้ง *F. oxysporum* ที่ระดับ 2+ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *A. brassicicola*

สารสกัดจากรา Br830 ที่เลี้ยงใน 0.5xPDA ไม่ยับยั้ง *C. gloeosporioides* แต่ยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ดี (2+) ขณะที่เมื่อเลี้ยงใน SDA ไม่ยับยั้งทั้ง *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* สารสกัดจากรา Br834 ที่สกัดจาก culture filtrate ทั้ง 0.5xPDB และ SDB ไม่สามารถยับยั้งราโรคพืชทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหารต่างกัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน

เอ็นโดไฟท์	ระดับการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ					
	A. brassicicola		*C. gloeosporioides*		*F. oxysporum*	
	0.5x PDB	SDB	0.5x PDB	SDB	0.5x PDB	SDB
Th21	ND	ND	3+	3+	ND	ND
Th121	1+	1+	ND	ND	ND	ND
Sc10A3	-	-	ND	ND	2+	2+
Sc15A3	-	-	ND	ND	2+	2+
Br 830	ND	ND	-	-	2+	-
Br 834	ND	ND	-	-	-	-

หมายเหตุ ND: ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากให้ผล antibiosis เป็นลบ

4.3. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงราเพื่อเตรียมสารสกัดยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ของสารสกัดจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟท์ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB เป็นเวลา 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน พบว่า เมื่อเลี้ยงเอ็นโดไฟท์ใน 0.5xPDB สารสกัดจาก 0.5xPDB ของ Th21 อายุ 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน ให้ผลยับยั้ง *C. gloeosporioides* ในระดับ 3+ ไม่แตกต่างกัน สารสกัดจาก Th121 ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB 3 วัน และ 7 วัน ให้ผลการยับยั้ง *A. brassicicola* 2+ และ 1+ ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเลี้ยงนาน 14 วัน สารที่สกัดมา จากน้ำหมักไม่สามารถยับยั้ง *A. brassicicola*

สารสกัดจากน้ำหมักเอ็นโดไฟท์ Sc10A3 และ Sc15A3 ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน ให้ผลยับยั้ง *F. oxysporum* และ *A. brassicicola* ไม่แตกต่างกัน สารสกัดจากรา Br830 ที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB 3 วัน 7 วัน และ

14 วัน สามารถยับยั้ง *F. oxysporum* ได้ไม่แตกต่างกัน แต่สารสกัดจากน้ำหมัก Br830 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน สามารถยับยั้ง *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าสารสกัดจาก Br830 ที่เลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน เป็นเวลา 3 วัน และ 7 วัน 1 ระดับ

ตารางที่ 9 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบสารสกัดจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร SDB เป็นเวลา 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน ต่อความสามารถในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช พบว่าผลของสารสกัดที่สกัดได้จาก Th21, Sc10A3 และ Sc15A3 สอดคล้องกับผลของสารสกัดที่สกัดจากราชนิดเดียวกันที่เลี้ยงใน 0.5xPDB สารสกัดจาก Br830 ที่เลี้ยงในอาหาร SDB ต่างจากที่เลี้ยงในอาหาร 0.5xPDB เล็กน้อย ส่วนสารสกัดจากเอ็นโดไฟท์ Br834 ที่เลี้ยงในอาหาร SDB เป็นเวลา 3 วัน 7 วัน และ 14 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญราก่อโรคพืช *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides*

เนื่องจากการเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ใน 0.5xPDB และ SDB ทั้ง 3 วัน 7 วันและ 14 วันมีแนวโน้มไม่แตกต่างกัน เพื่อการประหยัดค่าใช้จ่ายด้านอาหารและเวลาในการหมักราเพื่อทำการสกัดสารจึงได้เลือกอาหาร 0.5xPDB และการหมักเป็นเวลา 3 วัน ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 8 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักใน 0.5xPDB ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

เอ็นโดไฟท์	ระดับการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชเมื่อเลี้ยงเป็นเวลาต่างกัน								
	A. brassicicola			*C. gloeosporioides*			*F. oxysporum*		
	3 วัน	7 วัน	14 วัน	3 วัน	7 วัน	14 วัน	3 วัน	7 วัน	14 วัน
Th21	ND	ND	ND	3+	3+	3+	ND	ND	ND
Th121	2+	1+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sc10A3	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
Sc15A3	-	-	-	ND	ND	ND	2+	2+	2+
Br830	ND	ND	ND	-	-	1+	2+	2+	2+
Br834	ND	ND	ND	-	-	-	1+	-	-

หมายเหตุ ND: ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากให้ผล antibiosis เป็นลบ

ตารางที่ 9 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักใน SDB ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช

เอ็นโดไฟท์	ระดับการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชเมื่อเลี้ยงเป็นเวลาต่างกัน								
	A. brassicicola			*C. gloeosporioides*			*A. brassicicola*		
	3 วัน	7 วัน	14 วัน	3 วัน	7 วัน	14 วัน	3 วัน	7 วัน	14 วัน
Th21	ND	ND	ND	3+	3+	3+	ND	ND	ND
Th121	1+	1+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sc10A3	-	-	-	ND	ND	ND	-	-	-
Sc15A3	-	-	-	ND	ND	ND	2+	2+	2+
Br830	ND	ND	ND	-	1+	1+	2+	2+	2+
Br834	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ND: ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากให้ผล antibiosis เป็นลบ

4.4. การศึกษาผลของความเค็มที่เหมาะสมที่ใช้เลี้ยงราเอ็นโดไฟท์เพื่อสกัดสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ

การทดสอบสารสกัดสารจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟท์ ที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 วันในอาหาร 0.5xPDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น และที่เตรียมด้วยน้ำทะเลที่ปรับให้มีค่าความเค็ม 10, 15, 20 และ 30 ppt (ส่วนในพันส่วน) ดังแสดงตารางที่ 7 พบค่าความเค็มที่เหมาะสมของอาหารในการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักอยู่ระหว่าง 0-15 ppt โดยน้ำกลั่นเหมาะสมต่อการใช้เตรียมอาหารเพื่อเลี้ยงราในการเตรียมสารสกัดยับยั้งราสาเหตุโรคพืชมากที่สุด รองลงมาคือ 10 และ 15 ppt ขณะที่ที่ค่าความเค็มอื่น สารสกัดให้ผลทดสอบลบ

4.5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักราที่คัดเลือก

เลือกรา TH121 และ Br830 ซึ่งให้ผลยับยั้ง (antibiosis) ดี (3+ - 4+) แต่ผลการทดสอบสารสกัดอ่อนกว่ามาทดสอบค่าความเค็มและชนิดอาหารที่เหมาะสมในลักษณะคล้ายคลึงกับที่กล่าวมาข้างต้นอีกครั้งหนึ่ง (ทำ 3 ซ้ำ) แต่เพิ่มชนิดอาหารเป็น 5 ชนิด นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับราก่อโรคพืชทั้ง 3 ชนิด วัดระยะการยับยั้งและคำนวณหาค่าเฉลี่ย

ผลในตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำกลั่นเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Th121 เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ยับยั้งรายับยั้งราสาเหตุโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่ง A. *brassicicola* และ *F. oxysporum* ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเค็ม 10 ppt เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Br830 เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ยับยั้งรา สาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides*

ตารางที่ 11 แสดงการทดสอบอาหารที่เหมาะสมจะนำมาเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ 5 ชนิด โดยเพิ่มอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์อีก 2 ชนิด (PDB และ YMB) เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ซึ่งจะเห็นว่า 0.5xPDB และ PDB

เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Th111 เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ (ภาพที่ 4ก) ขณะที่ SDB เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์ Br830 เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพ (ภาพที่ 4ข) ฤทธิ์ยับยั้งของสารที่สกัดได้จากราที่เลี้ยงใน YMB อยู่ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น แต่มีแนวโน้มเป็นอาหารที่ดีสำหรับการเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์แบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อให้สร้างสารก่อฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์กว้าง (ภาพที่ 4ก และภาพที่ 4ข)

ตารางที่ 10 ความเค็มที่เหมาะสมของอาหารเหลวในการเตรียมสารสกัดยับยั้งราโรคพืช จากน้ำหมักราที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ในอาหาร 0.5xPDB

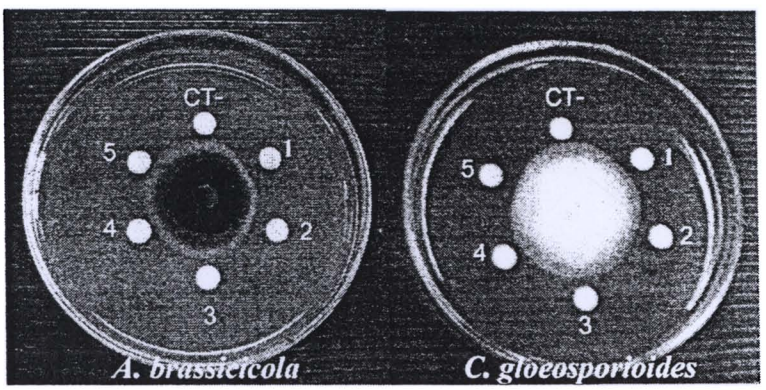
เอ็นโดไฟท์	ราสาเหตุโรคพืช	ระดับการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชเมื่อเลี้ยงที่ค่าความเค็มต่างกัน				
		0 ppt	10 ppt	15 ppt	20 ppt	30 ppt
Th21	*C. gloeosporioides*	3+	2+	-	-	-
Th111	*A. brassicicola*	1+	1+	-	-	-
Sc10A3	*A. brassicicola*	-	-	-	-	-
	F.oxysporum	1+	-	-	-	-
Sc15A3	*A. brassicicola*	-	-	-	-	-
	F.oxysporum	2+	-	-	-	-
Br830	*C. gloeosporioides*	-	1+	-	-	-
	F.oxysporum	1+	-	-	-	-
Br834	*C. gloeosporioides*	-	-	-	-	-
	F.oxysporum	1+	1+	1+	-	-

ตารางที่ 11 ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหาร 0.5xPDB ที่ความเค็มต่างกัน เป็นเวลา 3 วัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน

ราเอ็นโดไฟท์	ราสาเหตุโรคพืช	ค่าเฉลี่ยระยะยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เมื่อเลี้ยงที่ค่าความเค็มต่างๆ (ซ.ม.)				
		0 ppt	10 ppt	15 ppt	20 ppt	30 ppt
Th121	*A. brassicicola*	0.27 ± 0.05	0.13 ±0.05	0.13 ±0.05	0	0
	C. gloeosporioides	0.1	0.1± 0.02	0	0	0
	F. oxysporum	0.27 ±0.05	0.13 ±0.05	0.13 ±0.05	-	-
Br830	*A. brassicicola*	0	0.23 ±0.12	0.17 ±0.05	0.1	0.1
	C. gloeosporioides	0	0.13 ±0.05	0	0	0
	F. oxysporum	0.07 ±0.02	0	0	0	0

ตารางที่ 12 ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหารต่างกัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน

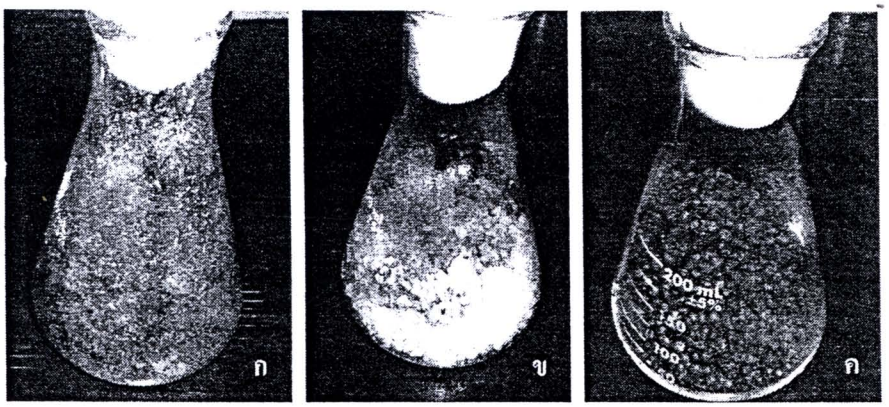
เอ็นโดไฟท์	ราสาเหตุโรคพืช	ค่าเฉลี่ยระยะยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ (ซ.ม.)				
		LNB	0.5x PDB	PDB	SDB	YMB
Th121	*A. brassicicola*	0.16 ±0.06	0.46 ± 0.08	0.37 ±0.09	0.05 ± 0.05	0.25 ± 0.08
	C. gloeosporioides	0.06 ±0.04	0.16 ±0.06	0.27 ±0.07	0.10 ±0.4	0.14 ± 0.08
	F. oxysporum	0.05 ±0.05	0.08 ±0.03	0.11 ±0.05	0.08 ±0.07	0.12 ±0.04
Br830	*A. brassicicola*	0.06 0.04	0.06 0.04	0.1 0.04	0.26 0.04	0.15 0.05
	C. gloeosporioides	0.07 ±0.07	0.1 ±0.04	0.1	0.27 ±0.04	0.2 ±0.06
	F. oxysporum	0.04 ±0.04	0.08 ±0.05	0.07 ±0.04	0.22 ±0.1	0.16 ±0.08



ภาพที่ 4 การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ ในวันที่ 4 ของการเจริญ, ก: สารสกัดจาก Th111 บนแผ่น disc เมื่อวางร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola;* ข: สารสกัดจาก Br830 บนแผ่น disc เมื่อวางร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides*; 1= PDB, 2 = 0.5xPDB, 3 = YMB, 4 = LNB, 5 = SDB, CT- = แผ่น disc ชุบสารละลาย 0.5%DMSO ใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ

4.6 การศึกษาสภาวะอาหารแข็งที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Br834

เมื่อทำการหมักราเอ็นโดไฟท์ Br834 ซึ่งเป็นราที่ให้ผล antibiosis ดีมาก แต่ไม่สร้างสารก่อฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช หรือสร้างน้อยมากเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บนอาหารแข็งที่เตรียมจากธัญพืชชนิดต่างๆ ในสัดส่วนต่างๆ กัน (Solid state fermentation) พบว่า Br834 เจริญได้ดีในอาหารเกือบทุกชนิด ยกเว้นอาหารที่มีข้าวฟ่างเป็นส่วนผสม (ภาพที่ 5) แต่เมื่อนำสารสกัด ethanol และ ethyl acetate จากอาหารที่เลี้ยงรา Br834 ไปทดสอบ พบว่าเฉพาะสารสกัด ethanol จากราที่เลี้ยงในอาหารที่มีข้าวฟ่างเป็นส่วนผสม ความเข้มข้น 1,000 µg/ml (10 µg /disc) ความเข้มข้นขึ้นไป เท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *A. brassicicola* ที่นำมาทดสอบ ผลการยับยั้งจะเห็นชัดเมื่อสารละลายเข้มข้นตั้งแต่ 3,000-4,000 µg/ml (40 µg /diac) และพบว่าอาหารที่มีอัตราส่วนรำต่อข้างฟ่าง 1:1 จะให้ผลดีที่สุดในการเลี้ยง Br834 เพื่อให้สร้างสารยับยั้ง (ตารางที่ 12 และภาพที่ 6)



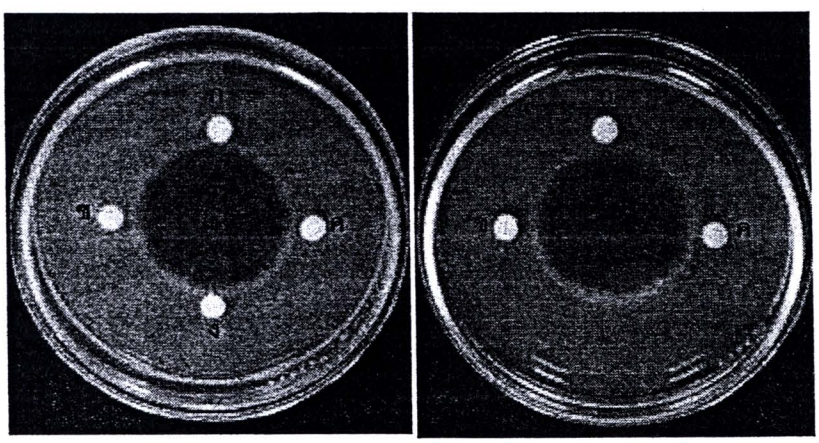
ภาพที่ 5 การเจริญราเอ็นโดไฟท์ *A. brassicicola* ที่เลี้ยงในอาหารเตรียมจากธัญพืชชนิดต่างๆ ในวันที่ 4 ของการเจริญ, ก: รำข้าวผสมกับน้ำกลั่น อัตราส่วน 60 กรัม: 40 มิลลิลิตร; ข: ปลายข้าวหุงสุก 100 กรัม; ค: ข้าวฟ่างหุงสุก 100 กรัม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 13 ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Br834 ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* ในอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง

ความเข้มข้นสารสกัด (µg/ml)	ค่าเฉลี่ยระยะยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช (ซ.ม.)*	
	รำข้าว :ข้าวฟ่าง 1:1	รำข้าว :ข้าวฟ่าง 1:2
1000	0.5	0
2000	1	1
3000	1.8	1.2
4000	1.8	1.2
5000	1.6	1.5

* ค่าที่รายงานเป็นค่าที่เทียบกับสารละลายควบคุม เมื่อให้ระยะทางในชุดควบคุมเป็นศูนย์



ภาพที่ 6 การเจริญ *A. brassicicola* เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Br834 ที่เลี้ยงในอาหารเตรียมจากธัญพืช รำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง ความเข้มข้นสารสกัด 4,000 µg/ml (40 µg /diac), ก: สารสกัดจากรำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง อัตราส่วน 1:1; ข: สารสกัดจาก Br834 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:1; ค: สารสกัดจาก Br834 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:2; ง: สารละลาย 10%DMSO

4.7 การศึกษาสารองค์ประกอบโดยวิธี thin layer chromatography

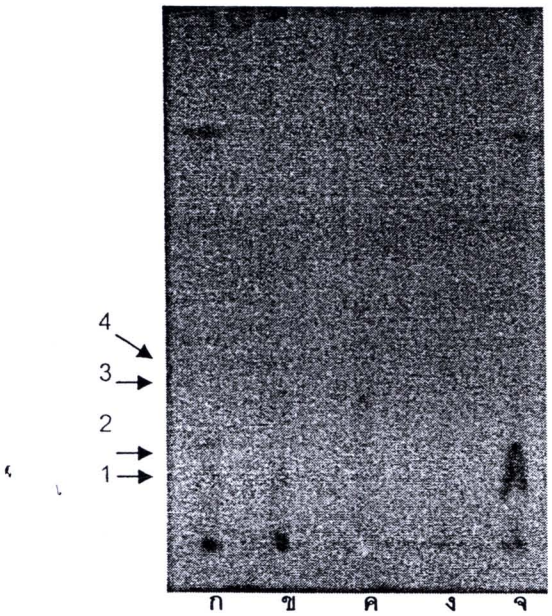
การวิเคราะห์ชนิดสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบที่ได้จากการหมักราเอ็นโดไฟท์ Th121 ซึ่งเป็นราที่ตอบสนองกับการปรับสภาวะดีที่สุดในอาหารเหลว PDB ที่มีค่าความเค็มต่าง ๆ กัน พบว่ารูปแบบของสารที่วิเคราะห์ได้หลังจากเลี้ยงในอาหาร PDB ยังไม่แตกต่างกันชัดเจน สารสกัดหยาบทั้งหมดประกอบด้วยสารประกอบ >2 ชนิด ที่มีค่า Rf ต่างกันเล็กน้อย (ตารางที่ 14) แต่หลังจากนำราเอ็นโดไฟท์ ไปหมักต่อในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น พบว่าสารสกัดจากราที่เลี้ยงในอาหารต่างกัน ให้รูปแบบสารองค์ประกอบต่างกัน (ตารางที่ 15) ในสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Th121 ที่เลี้ยงใน PDB และ YMB ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสม พบสารประมาณ 3 องค์ประกอบ ที่เป็นองค์ประกอบเด่น (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 14 จำนวนชนิดและรูปแบบสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบของราเอ็นโดไฟท์ สายพันธุ์ Th121

ความเค็ม (ppt)	สารประกอบที่พบ
0	2, 3
10	1, 2
15	1,2
20	1,2
30	2, 3

ตารางที่ 15 จำนวนชนิดและสารประกอบในสารสกัดเตรียมจากรา Th121 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น

อาหาร	สารประกอบที่พบ
LNB	4
0.5 PDB	2, 3
PDB	1,2
SDB	1,2
YMB	3



ภาพที่ 7 สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์ TLC ของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Th121 ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมจากน้ำกลั่น; ก: 0.5 PDB, ข: PDB, ค :YMB, ง: LNB, จ: SDB

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย แอคติโนมัยซีท

4.8 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง

ได้นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกแล้ว จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ A1-3, A3-3, A11-8, A11-9, A 16-1, A 16-2, และ A 19-5 มาทดสอบความสามารถสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, E.coli, Candida albicans,*) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่อาหาร International Streptomyces Project 2 (ISP2), และ อาหาร ISP2 ที่เติมสารอาหารธรรมชาติ เช่น ISP2+soybean meal, ISP2+ oatmeal, ISP2+ น้ำมันงา ISP2+ น้ำมันปลา รวมทั้งเปรียบเทียบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เบนอาหาร Glucose Yeast Extract (GY), อาหาร Antibiotic Production medium 2(AB2), International Streptomyces Project 2 (ISP2), Trypticase Soy medium (TSA), Starch Casein Agar (SCA) (ตารางที่ 17) ผลการทดสอบพบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีททุกสายพันธุ์ ส่วนมากสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดในอาหาร ISP2 รงมทั้งสามารถยับยั้ง MRSA P 39 (Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus P39)*/หรือ MRSA P37 และ(MRSA SP 22 และทุกสายพันธุ์ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี และเป็นที่แน่ชัดว่าอาหาร ISP2 เป็นอาหารที่เชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่สร้างสารออกฤทธิ์ได้มาก (ตารางที่ 16,17)

ตารางที่ 16 การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมด้วยอาหารธรรมชาติต่าง ๆ กัน ของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากป่าชายเลน

Isolate ID	Medium	Antibiosis to (cm)				
		M. luteus	*E. coli*	*C. albicans*	*MRSA SP37*	*MRSA P39*
54-4	ISP2+oatmeal	-	0.5	-	0.7	0.5
	ISP2+soybean meal					
	ISP2 + sesami					
	ISP2+ fishoil					
	ISP2					
A1-3	ISP2+oatmeal	-	0.6	-	4.3	5
	ISP2+soybean meal	-	0.5	-	4.5	5.5
	ISP2 + sesami	-	-	-	-	-
	ISP2+ fishoil	-	-	-	-	-
	ISP2	-	1.2	0.2	1	1.2
					MRSA SP22	MRSA P39
A3-3	ISP2+oatmeal	-	1.3	0.2	1.2	1.5
	ISP2+soybean meal		1.5	-	1.2	1.5
	ISP2 + sesami		1.8	d	1.5	1.8
	ISP2+ fishoil		1	0.6	>4.0	>4.0
	ISP2		1.8	0.3	2.1	1.9
A16-1	ISP2+oatmeal	-	0.7	-	0.6	0.6
	ISP2+soybean meal		1.2	-	1	1
	ISP2 + sesami		0.9	-	0.8	0.8
	ISP2+ fishoil		1	-	0.5	1

	ISP2		3.5	-	1	2.5
A16-2	ISP2+oatmeal		0.7	-	0.6	0.6
	ISP2+soybean meal		1	-	0.9	0.9
	ISP2 + sesami		0.8	-	0.5	0.7
	ISP2+ fishoil			-	-	-
	ISP2		2.3	1.2	1.8	>3.0
A11-8	ISP2+oatmeal		scarce growth	scarce growth	scarce growth	scarce growth
	ISP2+soybean meal		3.8	NG	3.5	3.5
	ISP2 + sesami		scarce growth	scarce growth	scarce growth	scarce growth
	ISP2+ fishoil		scarce growth	scarce growth	scarce growth	scarce growth
	ISP2		5.2	1.5	2.8	5
A11-9	ISP2+oatmeal		0.6	-	0.6	0.6
	ISP2+soybean meal			-	-	0
	ISP2 + sesami		0.6	-	1	0.8
	ISP2+ fishoil		0.2		0.2	0.2
	ISP2		1.7	0.2	1.2	2

ตารางที่ 17 การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ ของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากป่าชายเลน

	ระยะการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ (cm)					
Isolate ID	Medium	*M. luteus*	*E. coli*	*C. albicans*	*MRSA SP37*	*MRSA P39*
CH 54-4	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	1,1	-	1.5	1.6
	AB2	0.3	-	-	-	-
	TSA	-	-	1.5	-	-
	ISP2	-	-	0.2	-	-
A1-3	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	1.0	0.1	1.0	1.0
	AB2	-	>3.5	-	-	-
	TSA	-	0.3	0.1	0.3	0.4
	ISP2	-	1.2	0.2	1.0	1.2
A3-3	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	1.8	0.2	1.6	1.8
	AB2	-	>3.5	-	-	-
	TSA	-	-	0.5	-	-
	ISP2	-	1.8	0.3	2.1	1.9
A11-8	GY	-	0.9	-	-	-
	SCA	-	3.0	-	2.8	2.8
	AB2	-	1.6	-	2.2	1.8
	TSA	-	3.1	-	3.0	3.3
	ISP2	-	5.2	1.5	2.8	5.0
A11-9	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	1.2	-	1.1	1.2
	AB2	-	-	-	-	-
	TSA	-	-	-	-	-
	ISP2	-	1.7	0.5	1.2	2.0

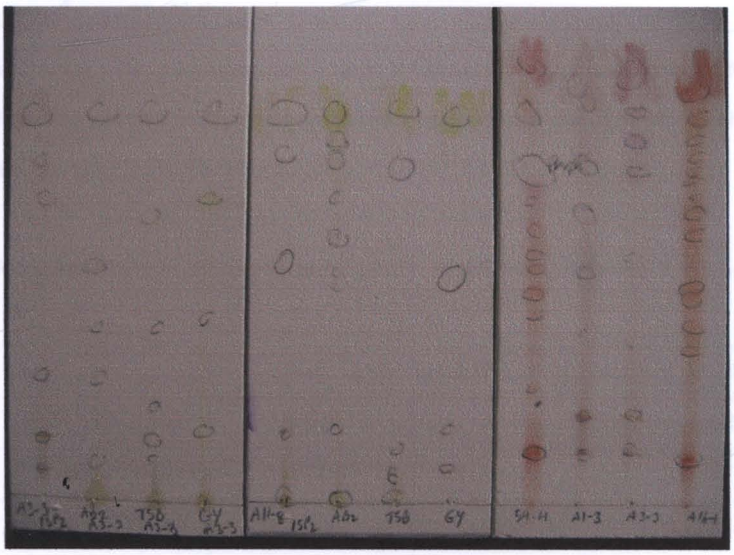
A16-1	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	0.6	-	0.7	
	AB2	-	1.2	0.1	1.1	1.2
	TSA					
	ISP2	-	3.5	-	1.0	2.5
A16-2	GY	-	-	-	-	-
	SCA	-	0.7	-	0.6	0.8
	AB2	-	0.9	-	0.8	0.8
	TSA	-	0.5	-	1.1	1.2
	ISP2	-	2.3	1.2	1.8	>3.5

4.9 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวสำเร็จรูป

เลือกแอคติโนมัยซีทที่ให้สารออกฤทธิ์ และบางสายพันธุ์ก็สร้างรงค์วัตถุ ด้วย คือ A11-8, A16-1 และ A3-3 มาทดลองเลี้ยงต่อในอาหารเหลว ทั้ง 5 ชนิด คือ อาหาร ISP2, AB2, GY, SCA และอาหาร TSA ในflask ขนาด 250 ml ที่อุณหภูมิ 30 ° C เขย่าซ้ายขวา ด้วยความเร็ว 110 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 10- 14 วัน สกัดด้วย ethyl acetate/ methanol / Chlor oform/methanol (จนกว่าสารจะออกหมด หรือขึ้นกับสารของเชื้อแต่ละชนิดว่าสามารถละลายในตัวทำละลายใดได้ดีกว่า) แล้วระเหยเอา solvent ออก ด้วยเครื่อง evaporator แล้วเก็บสารที่ได้ใน vial ที่ทราบน้ำหนัก ตารางที่ 18 แสดงจำนวนองค์ประกอบของสาร ที่เห็นได้ บนแผ่นโครมาโทแกรม สารเมตาโบไลท์ที่สร้างได้ของแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY, SCA, AB2, TSA และ ISP2

Medium	GY	SCA	AB2	TSB	ISP2
Isolate ID					
A3-3	6	No growth	7	8	6
A11-8	4	No growth	6	5	6
A16-1	7	No growth	5	8	7

สารสกัดหยาบ ของแอคติโนมัยซีทชนิดต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารต่างกัน พบว่าเชื้อชนิดเดียวกันอาจสร้างสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป (ทั้งปริมาณและชนิด) ขึ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น แอคติโนมัยซีท A3-3 สามารถสร้างสารไบโอแอคทีฟได้ถึง 8, 7 และ 6 กลุ่ม ที่ให้ค่า Rf ต่างกันออกไปในบางกลุ่มสาร ในอาหารเหลว TSB, AB2 และ ISP 2 ตามลำดับ (ในอาหาร SCA เชื้อไม่เจริญ)แอคติโนมัยซีท A11-8 สร้าง สารไบโอแอคทีฟได้ 6, 5 และ 4 กลุ่ม ในอาหาร ISP2 , TSB และ GY ตามลำดับ (ในอาหาร SCA เชื้อไม่เจริญ)ส่วน แอคติโนมัยซีท A16-1สร้างสารไบโอแอคทีฟได้ 8, 7, และ 7 กลุ่ม ในอาหาร TSB, GY และ ISP2 ตามลำดับ



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพที่ 7 แสดง จำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารออกฤทธิ์ บนแผ่นโครมาโทแกรม เมื่อนำสารสกัดหยาบ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารต่างกัน จะพบว่าจำนวนองค์ประกอบของสารจะแตกต่างออกไป

ตารางที่ 19 แสดงปริมาณการสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อาหารเหลวธรรมชาติ (กรัม/100 ml)

Isolate ID	ISP2+Glucose	Oat meal	Kidney bean	Soybean meal	Wheat bran
CH 54-4	0.1107	0.0470	0.0566	0.0340	0.0195
A1-3	0.320	0.1218	0.0566	0.0363	0.0421
A19-5	0.2248	0.2137	0.0477	0.0480	0.2015

เมื่อเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยอาหารเหลว จากธรรมชาติเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP2+ glucose จะพบว่า อาหาร ISP2 ยังเป็นอาหารที่แอคติโนมัยซีทชนิดต่าง ๆสร้างสารออกฤทธิ์ได้มากกว่าอาหารจากธรรมชาติอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ ทั้งหมด เช่นอาหารข้าวโอ๊ต ถั่วแดง ถั่วเหลือง และรำข้าว

4.10 ผลการศึกษาการทำ Bioautograpgy Assay

เมื่อนำสารสกัดหยาบของสายพันธุ์ A1-3, A3-3, A16-1, 54-4, 54-5 A11-8, A19-5 ที่ได้ มา ละลายด้วย DMSO (Dimethyl sulphoxide) มาแยกสารเบื้องต้นวิธีทางโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography) ด้วยนำสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละ strain มา spot ลงบนแผ่น Silica gel 60 F_{254} (Merck) แล้วแยกด้วย Chloroform: Methanol 9:1 ใน Chromatography tank ทำให้ทราบว่าแอคติโนมัยซีทแต่ละสายพันธุ์นั้น สามารถสร้างสาร

นำสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละ strain มา spot ลงบนแผ่น Silica gel 60 F_{254} (Merck) แล้วแยกด้วย Chloroform: Methanol 9:1 ใน Chromatography tank ทำให้ทราบว่าแอคติโนมัยซีทแต่ละสายพันธุ์นั้น สามารถสร้างสารได้หลายชนิด และ จากการศึกษา Bioautoassay ทำให้ทราบว่า แต่ละสายพันธุ์สร้างสารออกฤทธิ์ได้มากกว่า 1 สาร (ตารางที่ 20) โดยมี MRSA22 เป็นเชื้อทดสอบ

ตารางที่ 20 แสดงผลของการศึกษา Bioautography assay ของแอคติโนมัยซีท A1-3, A3-3, A16-1, 54-4, 54-5 ต่อเชื้อ MRSA 22

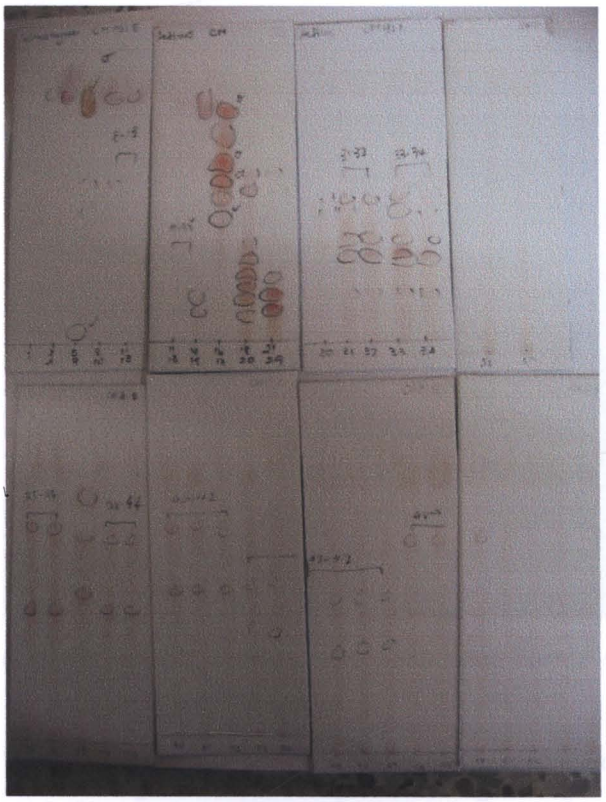
	ค่า R_f ของกลุ่มสารที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทแกรม				
กลุ่มสาร	A1-3	A3-3	A16-1	54-4	54-5
1	0.5609(+)	0.0300(-)	0.0170(+)	0.2317(+)	0.1066(-)
2	0.8414(+)	0.0850(-)	0.0820(+)	0.2804(+)	0.1800(+)
3		0.1280(-)	0.1350(+)	0.3353(+)	0.2266(+)
4		0.1700(-)	0.1760(+)	0.3963(+)	0.2600(+)
5		0.3650(-)	0.2240(-)	0.5670(-)	0.2933(+)
6		0.4570(+)	0.6350(-)	0.6280(-)	0.3133(+)
7		0.6400(+)	0.8940(-)	0.6890(-)	0.3466(+)
8		0.8170(+)		0.7560(+)	0.3733(-)
9				0.8902(-)	0.4000(-)
10					0.4600(-)
11					0.5600(-)
12					0.6733(-)
13					0.8200(-)
14					0.8800(-)

หมายเหตุ (+) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ MRSA 22

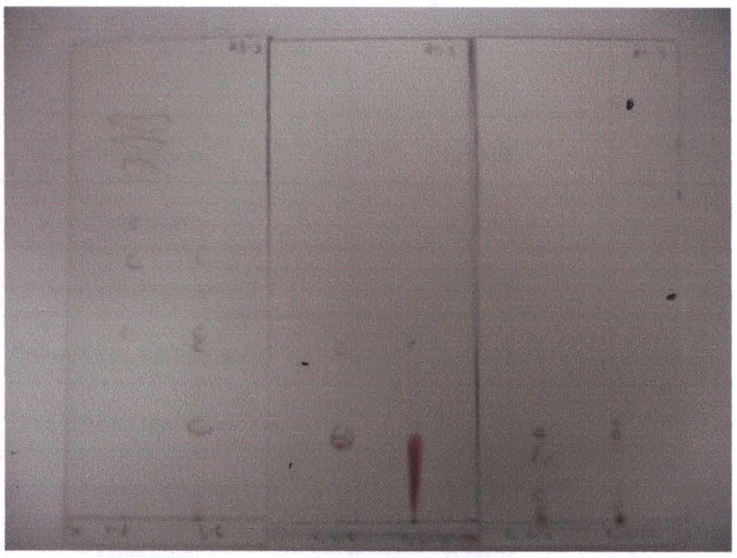
(-) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ MRSA 22

4.11 ทำสารให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วย Column Chromatography **และ** TLC

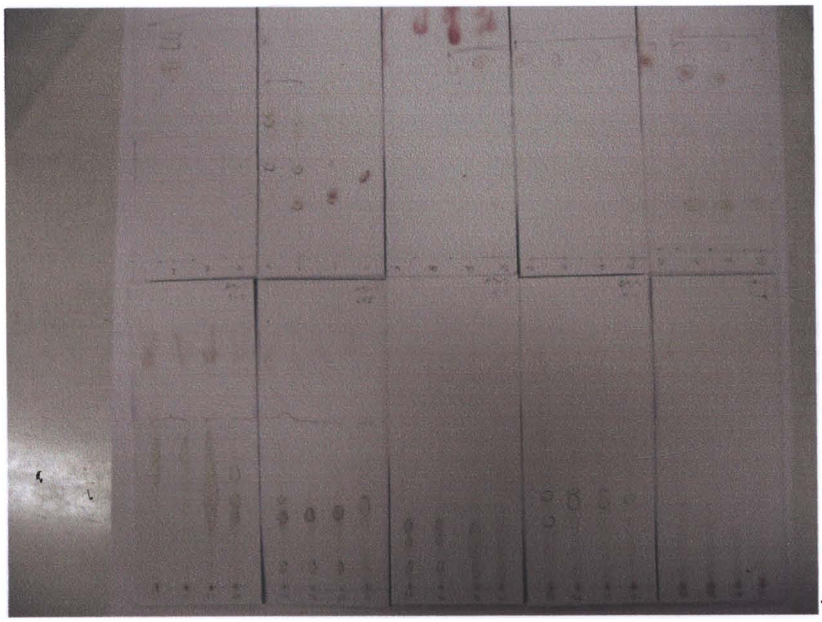
เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์สีแดงได้ดี มาเลี้ยงในปริมาณมากขึ้น ในอาหารเหลว ISP2 ซึ่งประกอบด้วย เชื้อแอคติโนมัยซีท 54-4, A1-3, A3-3 และ A 16-1 โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท บนจานเพาะเชื้อ เพื่อให้ได้สปอร์เชื้อปริมาณมาก ที่ 30 °C เป็นเวลา 3-4 วันก่อนถ่ายเชื้อลงใน flask ขนาด 1000 ml 4-6 flasks เมื่อสกัดสารด้วย ethyl acetate และหรือ chloroform: methanol 2:1 สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีท 54-4 ได้สารทั้งหมด 0.150 g/l เมื่อทำ fractionation ด้วย Colum Cromatography (เก็บ fraction ครั้งละ 10 ml) แล้ว จึงนำสาร มา spot ลงบนแผ่น Silica gel 60 และ แยกสารออกจากกันด้วย Chloroform : methanol 9:1, 8:2, และ 7:3 (ขึ้นกับสารที่ได้จาก fraction ต่าง ๆ)



ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fraction ของแอคติโนมัยซีท 54-4



ภาพที่ 9 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fraction ของแอคติโนมัยซีท A1-3



ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fraction ของแอคติโนมัยซีท A3-3

และได้นำสารจากเชื้อแอคติโนมัยซีท A1-3, A3-3 มาทำ Fractionation ด้วย Column Chromatograpgy ต่อไป โดยเริ่มจากสารสกัดหยาบ A1-3 ปริมาณ 0.1791 กรัม ผลการแยกสารสกัดหยาบแสดงดังตารางที่ 21 และ A3-3 ในตารางที่ 22

ตารางที่ 21 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A1-3 ด้วย Column Chromatography

fraction	ระบบตัวทำละลาย	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ผลการรวม fraction
1	Chloroform	0.0162	1
2	Chloroform	0.0051	2
3	Chloroform: Methanol 3:7	0.0532	3
4	Chloroform: Methanol 3:7	0.0128	4
5	Chloroform: Methanol 2:8	0.0029	5-8
6	Chloroform: Methanol 2:8	0.0030	
7	Methanol	0.0021	
8	Methanol	0.0019	

9	Methanol : Acetone : น้ำ 4 : 4: 2	0.0014	9-10
10	Methanol : Acetone : น้ำ 4 : 4: 2	0.0009	

ตารางที่ 22 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A3-3 ด้วย Column Chromatography

fraction	ตัวทำละลาย	น้ำหนักแห้ง(กรัม)	ผลการรวม fraction
1	Chloroform	0.1228	1-4
2	Chloroform	0.0470	
3	Chloroform	0.0274	
4	Chloroform	0.0235	
5	mix	0.0120	5-6
6	Chloroform : Methanol 90:10	0.0159	
7	Chloroform : Methanol 90:10	0.0193	7-8
8	Chloroform : Methanol 90:10	0.0223	
9	Chloroform : Methanol 90:10	0.0247	9-10
10	Mix	0.0271	
11	Chloroform : Methanol 80:20	0.0218	11-16
12	Chloroform : Methanol 80:20	0.0287	
13	Chloroform : Methanol 80:20	0.0276	
14	Chloroform : Methanol 70:30	0.0245	
15	Chloroform : Methanol 70:30	0.0084	
16	Chloroform : Methanol 70:30	0.0019	
17	Mix	0.0148	17-20
18	Chloroform : Methanol 50:50	0.0179	
19	Mix	0.0036	
20	Methanol	0.0093	

ตารางที่ 23 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A16-1 ด้วย Column Chromatography

fraction	ตัวทำละลาย	น้ำหนักแห้ง(กรัม)	ผลการรวม fraction
1	Chloroform	0.1285	1
2	Chloroform	0.0030	2
3	Chloroform	0.0012	3
4	Chloroform	0.0022	4
5	mix	0.0014	5
6	Chloroform : Methanol 95:5	0.0149	6
7	Chloroform : Methanol 95:5	0.0062	7-9
8	Chloroform : Methanol 95:5	0.0035	
9	Chloroform : Methanol 95:5	0.0047	
10	Chloroform : Methanol 90:10	0.0216	10-12
11	Chloroform : Methanol 90:10	0.0089	
12	Chloroform : Methanol 90:10	0.0028	
13	Chloroform : Methanol 90:10	0.0008	13-16
14	Mix	0.0045	
15	Chloroform : Methanol 70:30	0.0064	
16	Chloroform : Methanol 70:30	0.0006	
17	Mix	0.0124	17-19
18	Chloroform : Methanol 50:50	0.0081	
19	Mix	0.0032	
20	Methanol	0.0093	20-21
21	Methanol	0.0113	

เมื่อนำสารที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วย Column Chromatography มาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ อีกครั้ง พบว่าสารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากทุกสายพันธุ์ มีจำนวนองค์ประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์มากขึ้นมาก ไม่ว่าจะเป็น A1-3, A3-3 หรือ A16-1 ดังตารางที่ 24, 25 และ 26

ตารางที่ 24 แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A1-3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ MRSA P86

fraction	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ค่า R_f ของแต่ละกลุ่มสาร			
		1	2	3	4
1	0.0162	0.5469 +	0.7679 +		
2	0.0051	0.8066 +			
3	0.0532	0.2544 +	0.6804 -		
4	0.0128	0.1538 +	0.7514 -		
5-8	0.0099	0.1803 +	0.5519 +	0.7158 +	0.8579 -
9-10	0.0023	0.0437 -			

หมายเหตุ + มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA P86)

- ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบP86)

ตารางที่ 25 แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A3-3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ MRSA H78

fraction	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ค่า R_f ของแต่ละกลุ่มสาร						
		1	2	3	4	5	6	7
1-4	0.0090	0.3380 -	0.7660 +	0.8550 -	0.9330 -			
5-6	0.0041	0.0770 +	0.1940 +	0.2500 -	0.3330 -	0.3830 -	0.8270 -	
7-8	0.0039	0.0550 +	0.1270 +	0.1880 +	0.2380 +	0.3830 +	0.4440 +	0.7000 -
9-10	0.0059	0.1330 +						

11-16	0.0350	0.0550 +	0.1000 +	0.2380 +				
17-20	0.0035	0.0330 +	0.1000 +	0.2330 +				

หมายเหตุ + มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA H78)

- ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA H78)

ตารางที่ 26 แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A16-1 ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ MRSA P45

fraction	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ค่า R_f ของแต่ละกลุ่มสาร					
		1	2	3	4	5	6
1	0.1285	0.1345 (-)	0.9122 (-)				
2	0.0030	0.0643 (-)	0.2397 (-)	0.9064 (-)			
3	0.0012	0.0529 (-)	0.1941 (-)	0.2235 (-)	0.9117 (-)		
4	0.0022	0.0647 (-)	0.2000 (-)	0.2235 (-)	0.8823 (-)		
5	0.0014	0.5853 (-)	0.7012 (-)	0.7865 (+)	0.9207 (+)		
6	0.0149	0.5487 (+)	0.6219 (+)	0.7256 (+)	0.7865 (+)	0.8597 (+)	0.9451 (+)
7-9	0.0144	0.36477 (-)	0.4402 (+)	0.5094 (+)	0.5974 (+)	0.7106 (+)	0.786 (+)
10-12	0.0333	0.2955 (+)	0.3522 (+)	0.3836 (-)	0.4402 (-)	0.5660 (-)	0.6729 (-)
13-16	0.0123	0.0389 (-)	0.0947 (-)	0.1688 (-)	0.2727 (-)	0.3831 (-)	
17-19	0.0237	0.0389 (-)	0.0714 (-)	0.1168 (-)	0.1623 (-)		
20-21	0.01476	0.0413 (-)	0.1448 (-)	0.2896 (-)	0.6551 (-)	0.7793 (-)	

หมายเหตุ (+) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA P45)

(-) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ (MRSA P45)

จะเห็นได้ชัดเจนว่า แอคติโนมัยซีท ทุก ๆสายพันธุ์ มีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์อยู่เป็นจำนวนมาก เฉพาะแอคติโนมัยซีท A16-1 สายพันธุ์เดียวก็ให้สารออกฤทธิ์ จากทุก ๆ fraction รวมกันมากถึง 15 องค์ประกอบ (ตารางที่ 26) จากการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งและคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่า A16-1 และ A16-2 เป็นชนิดเดียวกัน และ A11-8 ให้ผลไม่ชัดเจนต่อฟทธิ์ยับยั้ง จึงไม่ได้นำมาทำ fractionation