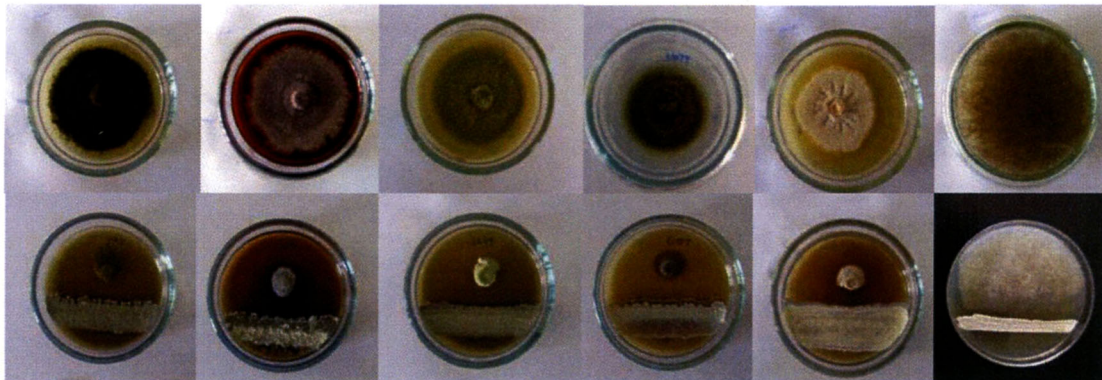


ผลการทดลอง

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นโดยวิธี dual culture technique

นำเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งหมด 206 ไอโซเลต และ actinomycetes 151 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ปนเปื้อนแผ่นยางพาราเบื้องต้นด้วยวิธี dual culture technique (รูปที่ 1) พบว่ามีเชื้อ *Bacillus* 33 ไอโซเลต (16%) ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างน้อย 1 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) ส่วนเชื้อ actinomycetes นั้นพบว่ามี 129 ไอโซเลต (85%) สามารถยับยั้งเชื้อราได้ (ตารางที่ 2) โดยเชื้อ *Bacillus* สามารถยับยั้งเชื้อราได้ในระดับต่ำ (+) ถึงปานกลาง (++) เท่านั้น ในขณะที่เชื้อ actinomycetes ประมาณ 10% สามารถยับยั้งเชื้อราได้ในระดับสูง (+++)



Aspergillus sp.SR9 *Fusarium* sp.SR2 *Penicillium* sp.PR02 *Cladosporium* sp.TT013 *Aspergillus* sp.NY05 *Rhizopus* sp.SR12

รูปที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นโดยวิธี dual culture technique

แถวบน: ชุดควบคุม แถวล่าง: ชุดทดสอบ

ตารางที่ 1 ผลของ *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

ระดับการยับยั้ง	จำนวนเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. (%) ที่ยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิด					
	RSR12	FSR2	ASR9	ANY05	PPR02	CTT013
+	5(2.43)	5(2.43)	6(2.91)	7(3.40)	3(1.46)	9(4.37)
++	3(1.46)	8(3.88)	3(1.46)	11(5.34)	6(2.91)	1(0.49)
+++	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
รวม	8(3.88)	13(6.31)	9(4.37)	18(8.74)	9(4.37)	10(4.85)

+ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเจริญไปติดขอบโคโลนีแต่ไม่เจริญข้าม

++ มีฤทธิ์ยับยั้งเกิด inhibition zone 1-5 mm

+++ มีฤทธิ์ยับยั้งเกิด inhibition zone 6-10 mm

RSR12: *Rhizopus* sp.SR12, FSR2: *Fusarium* sp.SR2, ASR9: *Aspergillus* sp.SR9,

ANY05: *Aspergillus* sp.NY05, PPR2: *Penicillium* sp.PR2, CTT013: *Cladosporium* sp.TT013

ตารางที่ 2 ผลของ actinomycetes ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากยางพาราแผ่น

ระดับ การยับยั้ง	จำนวนเชื้อ actinomycetes (%) ที่ยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิด					
	RSR12	FSR2	ASR9	ANY05	PPR02	CTT013
+	6(3.97)	22(14.57)	23(15.23)	6(3.97)	8(5.30)	12(7.95)
++	72(47.68)	62(41.06)	74(49.00)	90(59.60)	87(57.62)	76(50.33)
+++	15(9.93)	13(8.61)	12(7.95)	17(11.26)	16(10.60)	14(9.27)
รวม	93(61.59)	97(64.24)	109(72.19)	113(74.83)	111(73.51)	102(67.55)

+ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเจริญไปติดขอบโคโลนีแต่ไม่เจริญข้าม

++ มีฤทธิ์ยับยั้งเกิด inhibition zone 1-5 mm

+++ มีฤทธิ์ยับยั้งเกิด inhibition zone 6-10 mm

RSR12: *Rhizopus* sp.SR12, FSR2: *Fusarium* sp.SR2, ASR9: *Aspergillus* sp.SR9,

ANY05: *Aspergillus* sp.NY05, PPR2: *Penicillium* sp.PR2, CTT013: *Cladosporium* sp.TT013

2. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes

จากผลการทดลองเบื้องต้นในข้อ 1 จึงได้ทำการคัดเลือกเฉพาะเชื้อ actinomycetes มาทำการศึกษาต่อไป โดยคัดเลือก actinomycetes จำนวน 30 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP-2 และนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา และอีกส่วนหนึ่งนำไปสกัดด้วย ethyl acetate ผลการทดสอบ พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ทั้ง 30 ไอโซเลท มีความสามารถในการต้านเชื้อราแตกต่างกันไป โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes AC41 และ AC51 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 6 ไอโซเลทได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 80% (ตารางที่ 3)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes

จากผลการทดลองเบื้องต้น เมื่อทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes 151 ไอโซเลท กับเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางพารา สามารถคัดเลือกเชื้อ actinomycetes ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดจำนวน 30 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ISP-2 และนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปสกัดด้วย ethyl acetate แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านราโดยวิธี broth dilution ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml และหาค่า MIC และ MFC ผลแสดงในตารางที่ 4 พบว่ามีสารสกัดจำนวน 8, 12, 14, 15 และ 16 สารที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus* sp. SR12, *Aspergillus* sp. NY05, *Fusarium* sp. SR2 และ *Cladosporium* sp. TT013, *Aspergillus* sp. SR9 และ *Penicillium* sp. PR02 ได้ตามลำดับ และมีสาร

สกัดทั้งหมด 8 สาร จากเชื้อ AC37, 41, 51, 70, 72, 74, 78 และ 84 ที่สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ โดยที่สารสกัดจาก actinomycetes AC41 และ AC51 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราดีที่สุด มีค่า MIC ต่อเชื้อราทุกไอโซเลตอยู่ในช่วง 16-64 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า MIC ของสารต้านเชื้อราฟาราโนโตรปีนอล ที่ใช้เป็นตัวควบคุม (MIC 32-128 $\mu\text{g/ml}$) ดังตารางที่ 5 แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่ายา amphotericin B โดยสารสกัดทั้ง 8 ไม่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (MFC > 128 $\mu\text{g/ml}$)

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของของน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ในการยับยั้งเชื้อรา

Actinomycetes	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง					
	RSR12	FSR2	ASR9	ANY5	PPR2	CTT13
AC27	99.35	95.36	23.91	81.05	56.2	80.32
AC30	99.11	88.56	30.69	44.31	55.77	82.92
AC37	99.79	94.06	79.57	85.45	71.22	86.36
AC40	97.16	86.54	36.68	73.10	86.11	75.05
AC41	99.6	95.24	83.00	86.74	81.96	88.09
AC43	42.89	31.72	55.20	52.12	38.27	8.41
AC44	95.64	56.81	22.69	62.68	28.91	30.10
AC46	86.51	79.62	83.87	68.54	37.95	73.58
AC49	88.59	45.18	46.87	27.38	38.78	51.69
AC50	92.38	86.93	53.59	41.52	48.40	73.03
AC51	99.61	99.06	85.96	93.14	84.84	93.93
AC52	94.09	59.59	71.63	32.80	57.08	52.17
AC53	96.28	67.42	45.69	41.84	58.85	70.99
AC54	96.79	56.81	49.36	82.00	62.68	64.27
AC55	88.10	10.10	36.26	24.03	28.07	34.50
AC59	89.90	47.62	58.56	6.57	50.57	12.03
AC62	99.06	88.30	41.64	78.52	39.72	56.04
AC70	99.04	83.12	69.38	83.29	87.73	90.52
AC71	91.91	53.98	63.98	15.37	34.72	36.95
AC72	93.61	79.21	73.62	58.97	62.44	59.84
AC73	58.16	37.39	21.56	45.72	26.77	37.71
AC74	76.68	64.59	49.42	54.87	32.17	54.07
AC76	96.17	76.81	82.49	33.37	78.10	83.07
AC78	86.20	99.14	84.05	71.59	23.98	81.99
AC80	88.10	60.18	30.16	63.10	44.31	45.26
AC83	99.51	95.86	41.42	78.10	46.06	51.81
AC84	99.69	96.26	94.03	85.45	64.00	76.67
AC86	91.84	80.52	85.74	76.34	70.97	90.09
AC91	91.03	86.25	79.89	80.25	85.72	83.47
AC97	90.90	86.05	87.02	60.79	83.71	85.87

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งคำนวณได้จากสูตร: ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $100 - \left(\frac{R^2 \times 100}{r^2} \right)$

R และ r เป็นค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีชุดทดสอบและชุดควบคุมตามลำดับ

ตารางที่ 4 ค่า MIC และ MFC ของสารสกัดยาจากน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ต่อการยับยั้งเชื้อรา

Code	FSR2			RSR12			PPR02			SR9			CTT013			ANY05		
	SC	MIC	MFC	SC	MIC	MFC	SC	MIC	MFC	SC	MIC	MFC	SC	MIC	MFC	SC	MIC	MFC
AC27BE	+	128	>128	-			+	16	>128	-			+	64	>128	+	128	>128
AC30BE	-			-			-			-			-			-		
AC37BE	+	64	>128	+	8	>128	+	32	>128	+	64	>128	+	128	>128	+	128	>128
AC40BE	-			-			-			-			-			-		
AC41BE	+	64	>128	+	16	>128	+	32	>128	+	64	>128	+	64	>128	+	64	>128
AC43BE	-			-			-			-			-			-		
AC44BE	-			-			-			-			-			-		
AC46BE	+	200	>128	-			+	32	>128	+	200	>128	-			-		
AC49BE	-			-			-			-			-			-		
AC50BE	-			-			-			-			+	200	>128	-		
AC51BE	+	32	>128	+	16	>128	+	32	>128	+	32	>128	+	64	>128	+	64	>128
AC52BE	-			-			-			-			-			-		
AC53BE	+	128	>128	-			+	128	>128	+	64	>128	-			+	200	>128
AC54BE	-			-			-			-			-			-		
AC55BE	-			-			-			-			-			-		
AC59BE	-			-			-			+	64	>128	+	200	>128	-		
AC62BE	+	64	>128	-			+	32	>128	-			+	128	>128	+	128	>128
AC70BE	+	128	>128	+	64	>128	+	128	>128	+	128	>128	+	200	>128	+	200	>128
AC71BE	-			-			-			-			-			-		
AC72BE	+	200	>128	+	128	>128	+	200	>128	+	128	>128	+	200	>128	+	200	>128
AC73BE	-			-			-			-			-			-		
AC74BE	+	128	>128	+	64	>128	+	64	>128	+	64	>128	+	200	>128	+	200	>128
AC76BE	-			-			-			-			-			-		
AC78BE	+	64	>128	+	32	>128	+	32	>128	+	64	>128	+	128	>128	+	128	>128
AC80BE	-			-			-			-			-			-		
AC83BE	+	64	>128	-			+	32	>128	+	32	>128	+	128	>128	+	64	>128
AC84BE	+	64	>128	+	16	>128	+	32	>128	+	64	>128	+	128	>128	+	64	>128
AC86BE	-			-			+	128	>128	+	200	>128	-			-		
AC91BE	-			-			+	64	>128	+	200	>128	-			-		
AC97BE	+	200	>128	-			+	128	>128	+	128	>128	+	200	>128	-		
จำนวนที่ให้ผลบวก(%)	14 (47)			8 (27)	12 (40)	12 (40)	12 (40)			15 (50)			12 (40)			14 (47)		
Amphotericin B	+	0.5	1	+	0.25	4	+	2	128	+	2	64	+	8	64	+	0.5	32
p-nitrophenol	+	128	>128	+	64	>128	+	32	128	+	64	>128	+	128	>128	+	32	128

concentration

RSR12: *Rhizopus* sp.SR12, FSR2: *Fusarium* sp.SR2, ASR9: *Aspergillus* sp.SR9, ANY5: *Aspergillus* sp.NY5,

PPR2: *Penicillium* sp.PR2, CTT13: *Cladosporium* sp.TT13

ตารางที่ 5 ค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 6 สายพันธุ์

Extract	MIC (µg/ml)					
	FSR2	RSR12	PPR02	ASR9	ANY05	CTT013
AC37BE	64	8	32	64	128	128
AC41BE	64	16	32	64	64	64
AC51BE	32	16	32	32	64	64
AC70BE	128	64	128	128	200	200
AC72BE	200	128	200	128	200	200
AC74BE	128	64	64	64	200	200
AC78BE	64	32	32	64	128	128
AC84BE	64	16	32	64	64	128
p-nitrophenol	128	64	32	64	32	128

FSR2: *Fusarium* sp.SR2, RSR12: *Rhizopus* sp.SR12, PPR2: *Penicillium* sp.PR2,

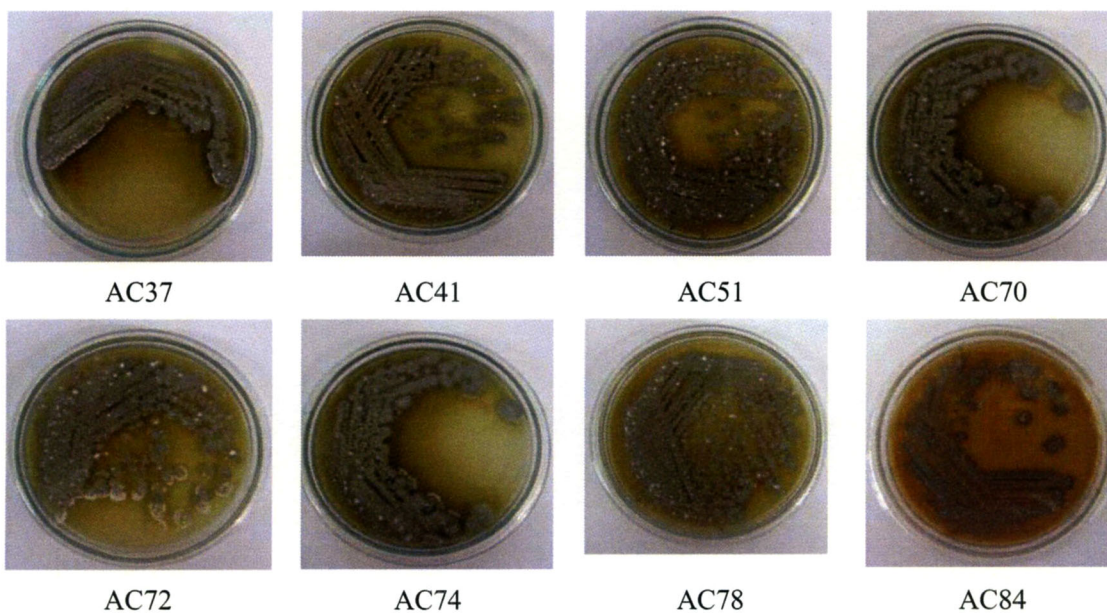
ASR9: *Aspergillus* sp.SR9, ANY05: *Aspergillus* sp.NY05, CTT013: *Cladosporium* sp.TT013

4. การจำแนกชนิดเชื้อ actinomycetes ที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านรา

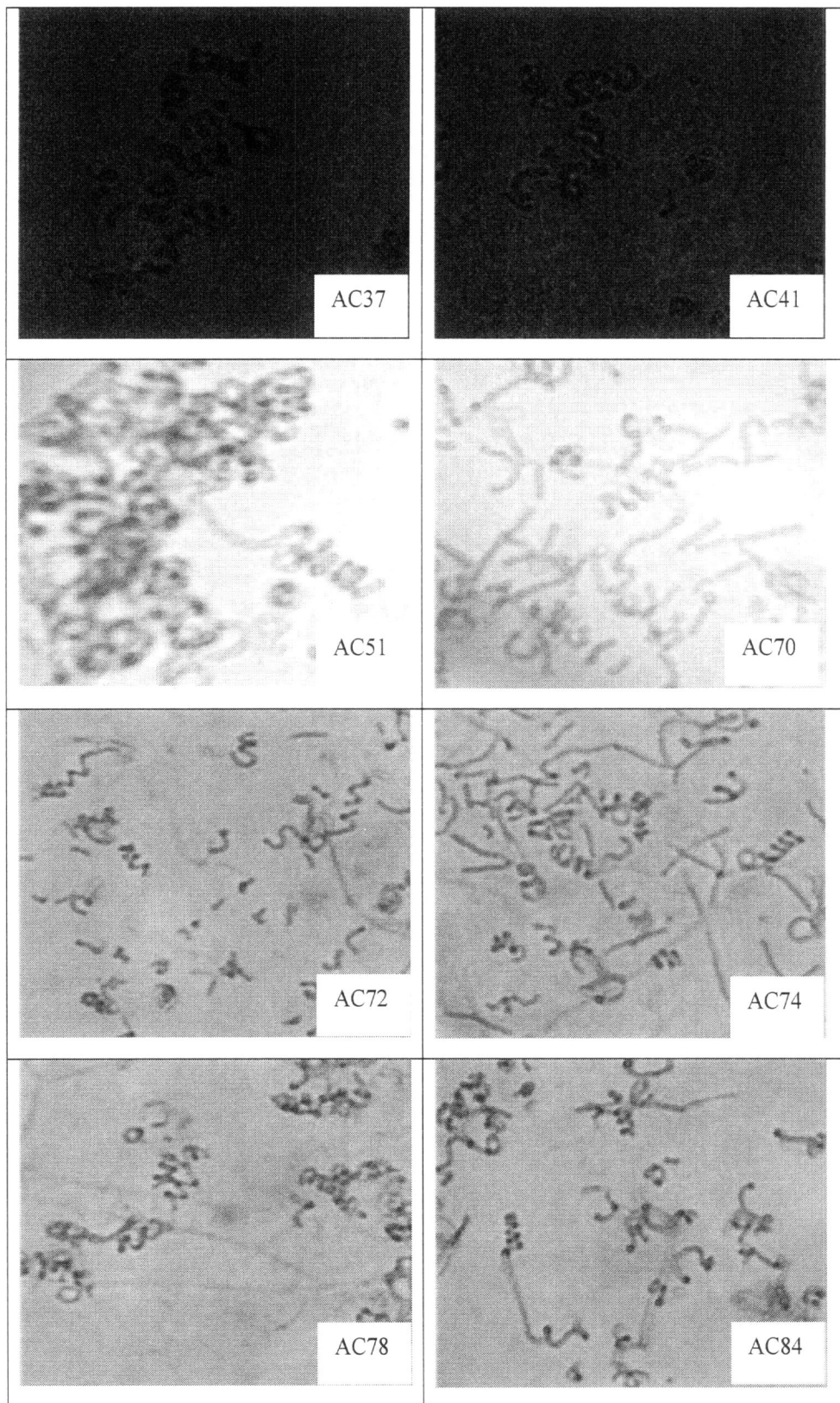
นำเชื้อ actinomycetes ทั้ง 8 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 2) มาจำแนกชนิดโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา และวิธีทางชีวโมเลกุล

4.1 การจำแนกชนิดโดยวิธีทางสัณฐานวิทยา

เมื่อนำเชื้อ actinomycetes มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร ISP-2 agar พบว่า ทุกไอโซเลทมีการเจริญเข้า โคลอนีมีลักษณะแห้ง สร้าง aerial mycelium สั้น ๆ สีเทา หรือน้ำตาลเทา (รูปที่ 2) มีกลิ่นดินชัดเจน เมื่อนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope พบว่าสร้างสปอร์เป็นสาย แบบเกลียว (spiral spore chain) (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อในจีนัส *Streptomyces*



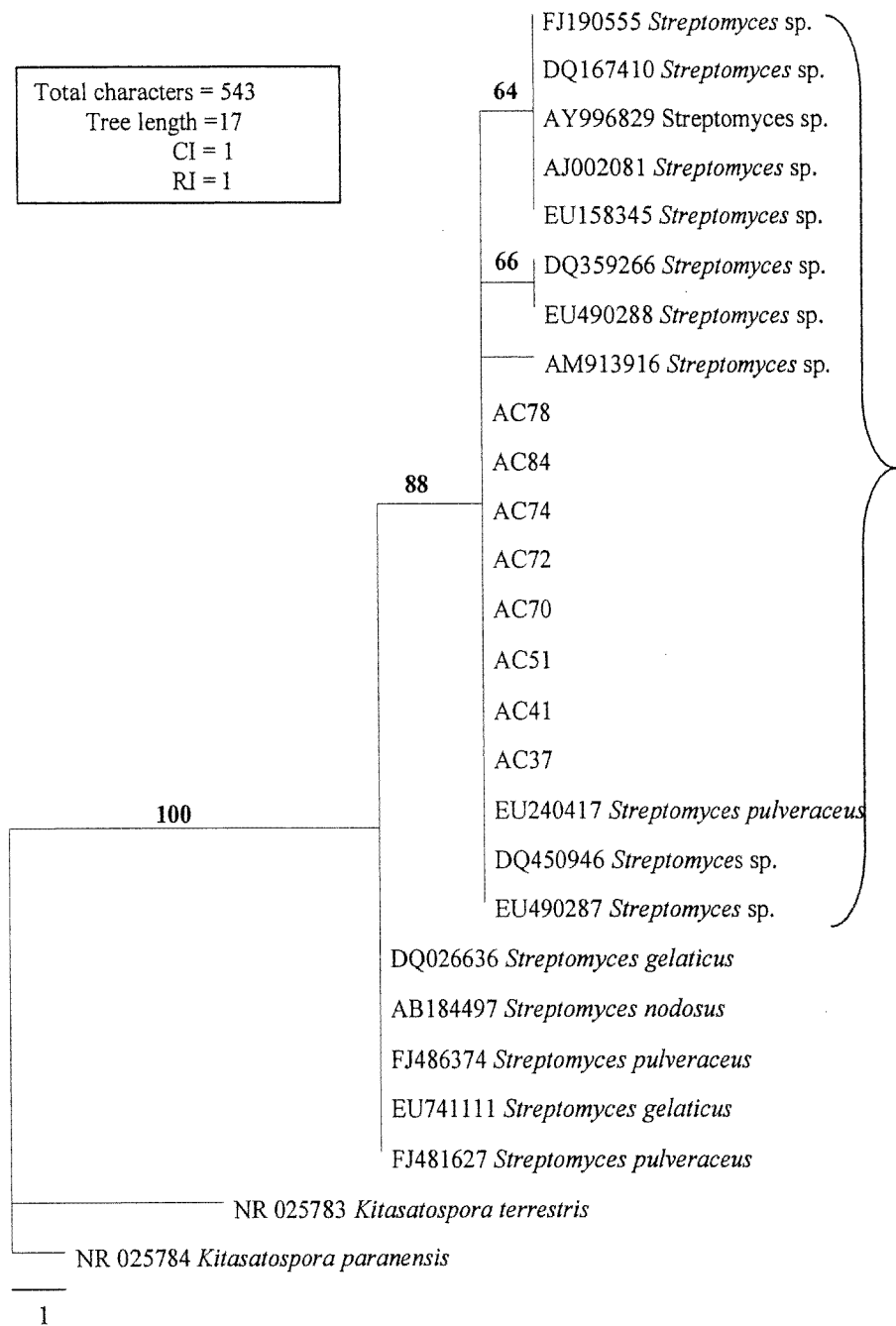
รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของ actinomycetes ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 6 สายพันธุ์



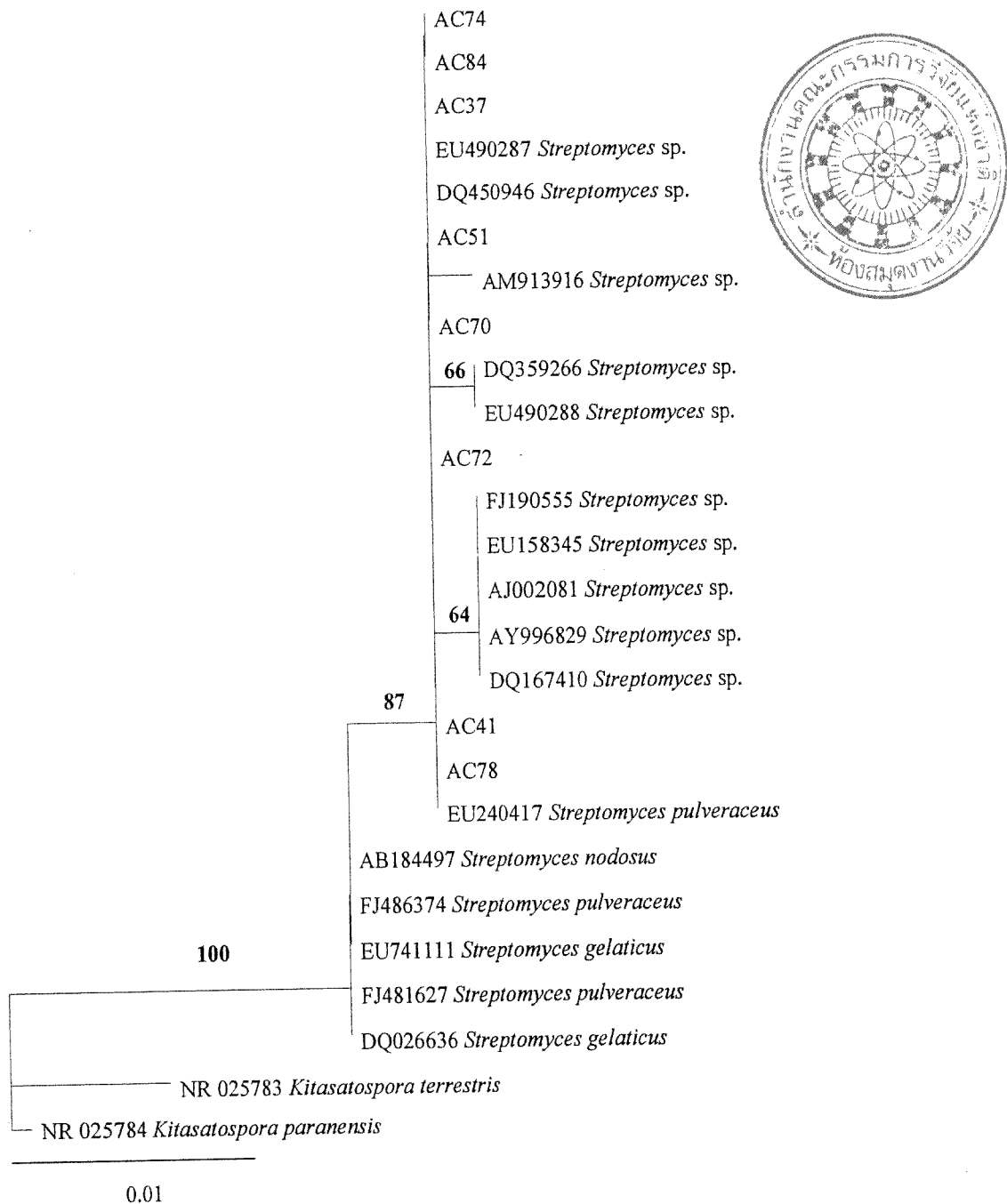
รูปที่ 3 ลักษณะสปอร์ของ actinomycetes ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 6 สายพันธุ์

4.2 การจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

การจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวโมเลกุลอาศัยการวิเคราะห์ 16S rDNA โดยส่งเชื้อทั้ง 8 ไอโซเลท ไปที่ KU Vector มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อได้ลำดับเบสแล้ว นำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม PAUP*4.0b10 โดยใช้การวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony และ Neighbour-joining และสร้าง Phylogenetic tree (รูปที่ 4 และ 5) พบว่าเชื้อ actinomycetes ทั้ง 8 ไอโซเลท อยู่ใน clade เดียวกัน และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก มี sequence similarity 100% และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Streptomyces* sp. EU490287, *Streptomyces pulveraceus* EU240417 และ *Streptomyces* sp. DQ450946 จึงสรุปได้ว่า actinomycetes ทั้ง 8 ไอโซเลท อยู่ในจีนัส *Streptomyces*



รูปที่ 4 Phylogram ที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ 16S rDNA sequence โดยหลักการ maximum parsimony ของเชื้อ actinomycetes AC37, AC41, AC51, AC70, AC72, AC74, AC78 และ AC84



รูปที่ 5 Phylogram ที่เหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์ 16S rDNA sequence โดยหลักการ Neighbour-joining ของเชื้อ actinomycetes AC37, AC41, AC51, AC70, AC72, AC74, AC78 และ AC84

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านรา

สารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC41 และ AC51 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราดีที่สุด จึงได้คัดเลือกมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านราในอาหารเหลว ดังนี้

5.1 ผลของการเขย่า

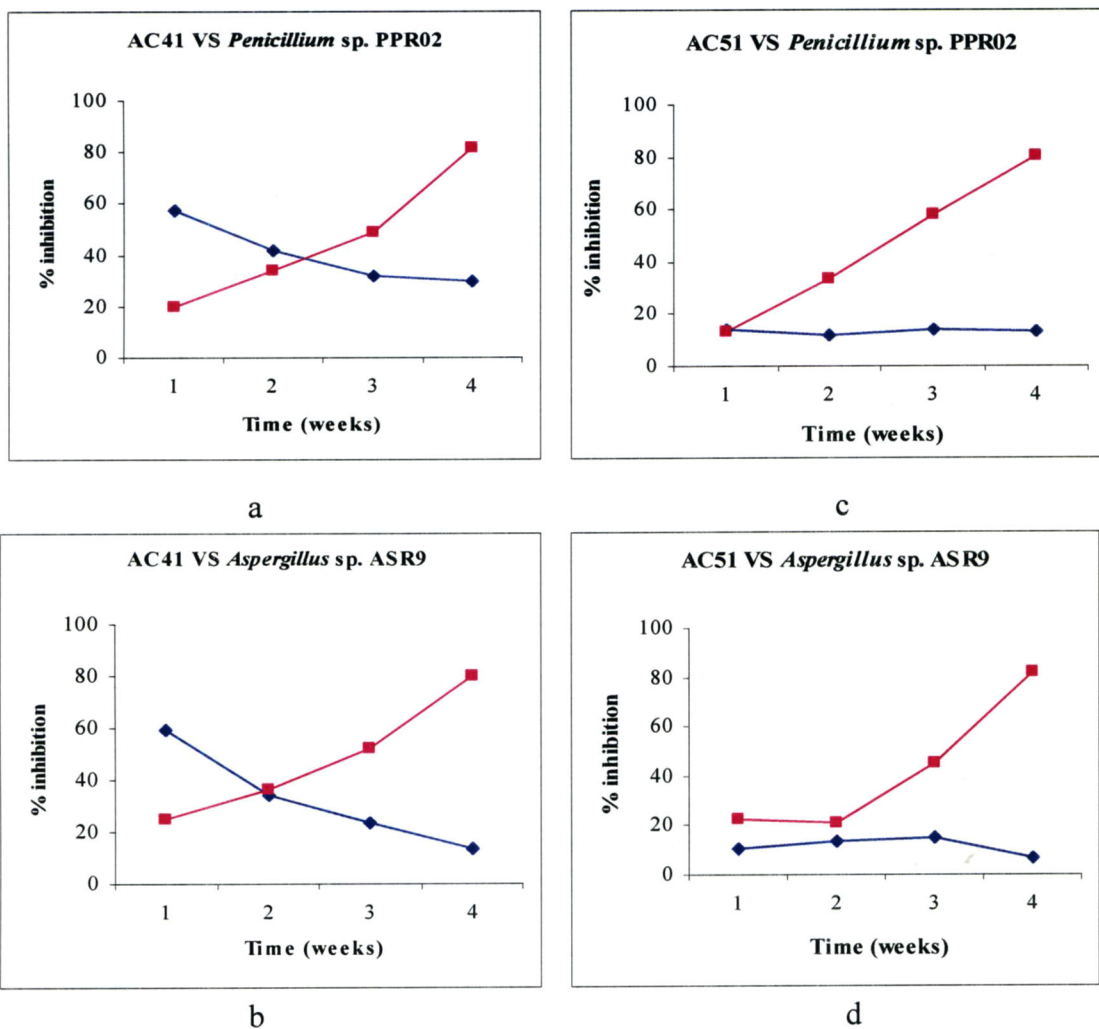
ทำการศึกษาผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า 200 รอบ/นาที เปรียบเทียบโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์มาตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Penicillium* sp. PR02 และ *Aspergillus* sp. SR9 ผลการทดลองดังรูปที่ 6 โดยพบว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ทั้ง 2 สายพันธุ์ในสภาวะการเลี้ยงแบบไม่เขย่าสูงกว่าการเลี้ยงแบบเขย่า โดยในสัปดาห์ที่ 4 ให้ %การยับยั้งเชื้อรามากกว่า 80%

5.2 ผลของ pH เริ่มต้น

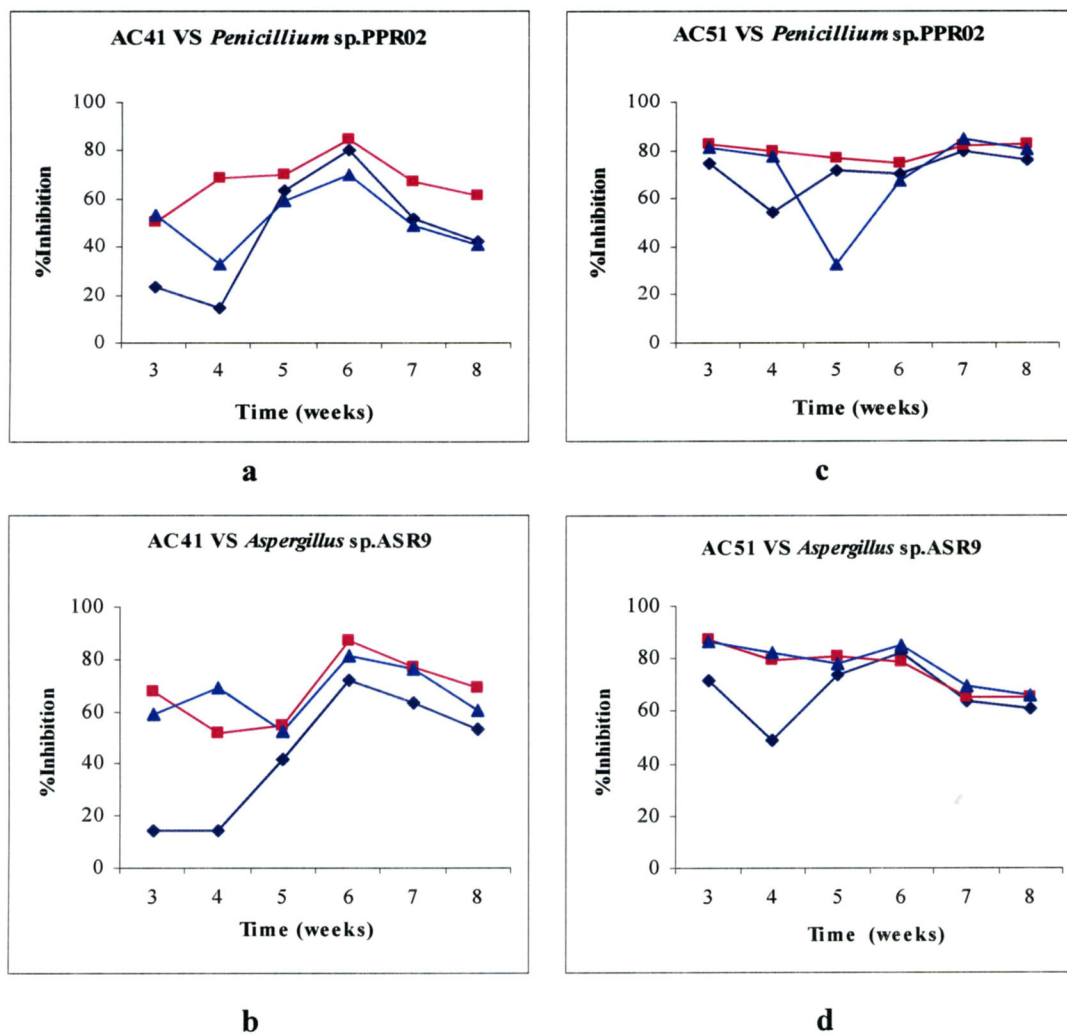
ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหาร ISP-2 medium ที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 6, 7 และ 8 แบบไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า *Streptomyces* sp. AC41 แสดงฤทธิ์ต้านราดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH เริ่มต้น 7 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่วน *Streptomyces* sp. AC51 แสดงฤทธิ์ต้านราดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH เริ่มต้น 7 และ 8 เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (รูปที่ 7)

5.3 ผลของอุณหภูมิ

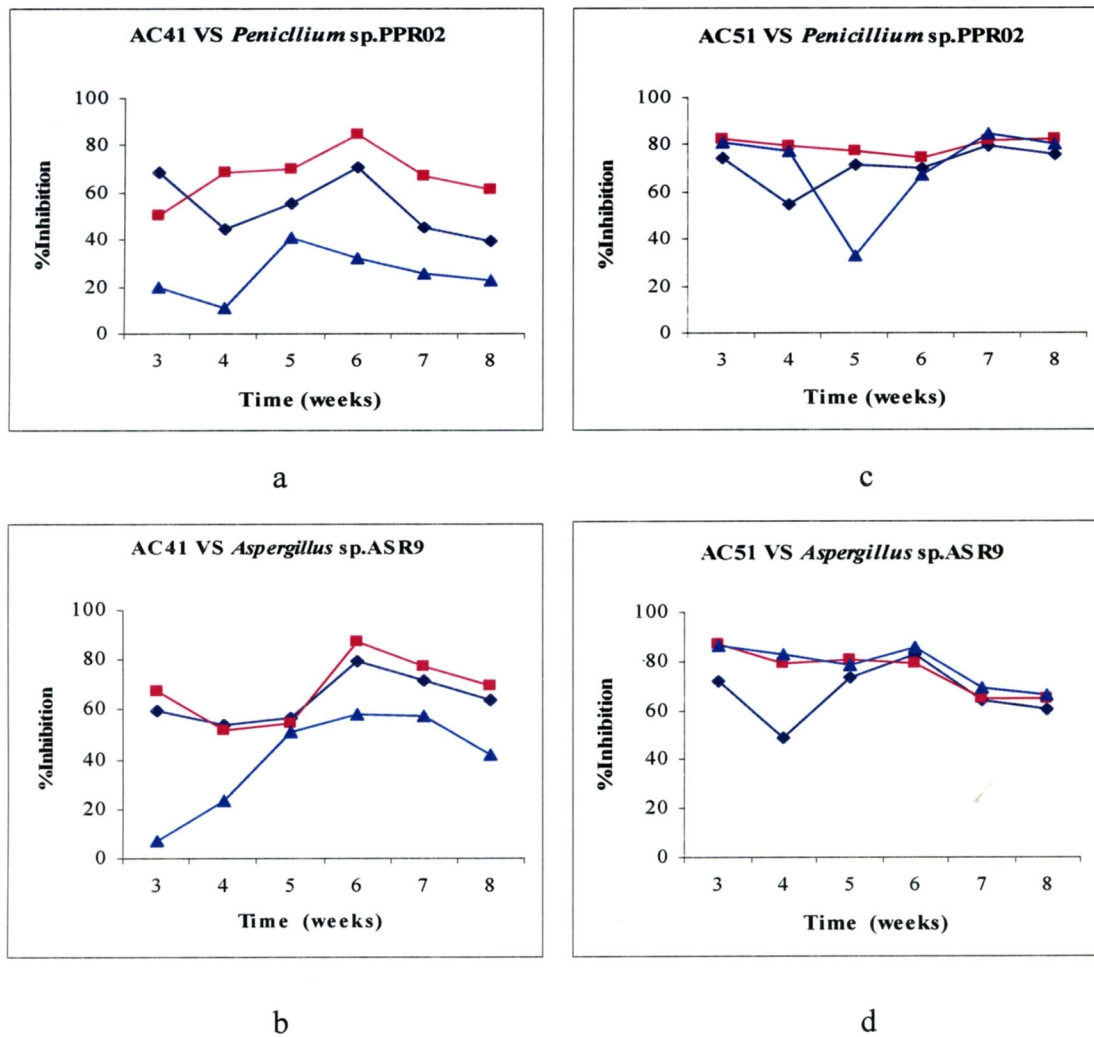
ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหาร ISP-2 medium ที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 7 แบบไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า *Streptomyces* sp. AC41 แสดงฤทธิ์ต้านราดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่ *Streptomyces* sp. AC51 แสดงฤทธิ์ต้านราดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (รูปที่ 8)



รูปที่ 6 ผลของการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า (◆) และแบบไม่เขย่า (■) ต่อการสร้างสารต้านราของเชื้อ *Streptomyces* sp. AC41 (a และ b) และ AC51 (c และ d)



รูปที่ 7 ผลของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (◆, pH 6; ■, pH 7; ▲, pH 8) ต่อการสร้างสารต้านราของเชื้อ *Streptomyces* sp. AC41 (a และ b) และ AC51 (c และ d)



รูปที่ 8 ผลของอุณหภูมิ (♦, 25 °C; ■, 30 °C ; ▲, 35 °C) ต่อการสังเคราะห์สารต้านราของเชื้อ *Streptomyces* sp. AC41 (a และ b) และ AC51 (c และ d)

6. การเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาณมากเพื่อการสกัดสาร

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. AC41 และ AC51 ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ทดลองได้ คือ ในอาหาร ISP-2 medium ที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 7 แบบไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับนำไปทดสอบกับยางแผ่น อีกส่วนหนึ่งนำไปสกัดสารเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

7. การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes และสารสกัดบนยางแผ่นในห้องทดลอง

7.1 ผลของความชื้นต่อการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น

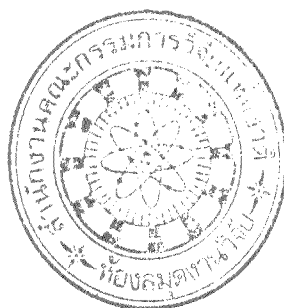
เนื่องจากความชื้นมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา จึงได้ทำการทดสอบเพื่อหาความชื้นที่เหมาะสมที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น โดยนำยางแผ่นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 5x5 ซม. ใส่ในกล่องใสที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 80% 90% และ 100% จากนั้นหยด spore suspension ของเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Penicillium* sp. PR02 และ *Aspergillus* sp. SR9 พบว่าเชื้อราเจริญบนยางแผ่นที่อยู่ในกล่องที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 90% และ 100% ในวันที่ 2 ส่วนในยางแผ่นที่อยู่ในกล่องที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 80% นั้น สังเกตเห็นการเจริญของเชื้อราได้ชัดเจนในวันที่ 4 (ตารางที่ 6) จึงได้เลือกความชื้นสัมพัทธ์ 100% สำหรับการทดลองต่อไป

7.2 ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes และสารสกัดบนยางแผ่น

นำแผ่นยางมาจุ่มน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. AC51 และสารสกัดจาก AC51 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 2 เท่าของค่า MIC จนถึง 16MIC เปรียบเทียบกับแผ่นยางที่จุ่มด้วย พาราโนโตรฟินอล (4MIC) และชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มสาร ผึ่งแผ่นยางให้แห้ง นำมาใส่ในกล่องที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100% แล้วหยด spore suspension ของเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Penicillium* sp. PR02 และ *Aspergillus* sp. SR9 จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางทุกวันเป็นเวลา 14 วัน พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ AC51 ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางได้ แต่สารสกัดความเข้มข้น 16 เท่าของค่า MIC (512 µg/ml) สังเกตพบเชื้อรา *Aspergillus* sp. SR9 บนแผ่นยางในวันที่ 3 ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้ และที่ทดสอบกับพาราโนโตรฟินอล (4MIC, 256 µg/ml) และชุดควบคุม สังเกตพบเชื้อราในวันที่ 2 สำหรับการทดสอบกับเชื้อ *Penicillium* sp. PR02 พบว่า สารสกัดความเข้มข้น 8MIC (256 µg/ml) และ 16 MIC (512 µg/ml) และพาราโนโตรฟินอล (4MIC, 128 µg/ml) สังเกตพบเชื้อราช้ากว่าชุดควบคุม 1 วันเช่นกัน (ตารางที่ 7) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด AC51 และพาราโนโตรฟินอล เป็น 1 mg/ml พบว่า สารสกัด AC51 และ พาราโนโตรฟินอล สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ดีขึ้น โดยสังเกตพบเชื้อราในวันที่ 9 และ 10 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมพบเชื้อราตั้งแต่วันที่ 5 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การเจริญของ *Aspergillus* sp. SR9 และ *Penicillium* sp. PR02 บนแผ่นยางที่จุ่มสารสกัด
จาก *Streptomyces* sp. AC51 และ พาราไนโตรฟินอล ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่ความชื้น
สัมพัทธ์ 100%

การทดสอบ	วันที่													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Aspergillus</i> sp. SR9														
Control	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 1 mg/ml	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
พาราไนโตรฟินอล 1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. PR02														
Control	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
พาราไนโตรฟินอล 1 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+



7.3 การทดสอบแผ่นยางพาราที่ชุบด้วยสารสกัดในสภาวะธรรมชาติ

เมื่อนำแผ่นยางพาราที่ชุบและไม่ได้ชุบด้วยสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปวางไว้ในสภาวะธรรมชาติ เพื่อให้เกิด natural infection พบว่าเริ่มสังเกตเห็นเชื้อราบนแผ่นยางพาราหาคควบคุมที่ไม่ได้ชุบด้วยสารสกัดในวันที่ 23 เช่นเดียวกันแผ่นยางพาราที่ชุบด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 2 MIC ส่วนแผ่นยางที่ชุบด้วยสารสกัดที่ 8 MIC นั้น เริ่มมีเชื้อราขึ้นในวันที่ 28 และแผ่นยางพาราที่ชุบด้วยสารสกัดที่ 16 MIC นั้น มีเชื้อราขึ้นในวันที่ 32 ซึ่งดีกว่าแผ่นยางพาราที่ชุบด้วยพาราโนโตรฟินอล 4 MIC ที่มีเชื้อราขึ้นวันที่ 28 (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การเกิดเชื้อราบนแผ่นยางพาราที่ชุบและไม่ได้ชุบด้วยสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะธรรมชาติ

ชนิดสารทดสอบ เวลา	วันที่													
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Control (ยาง)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 2MIC (64 µg/ml)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 4MIC (128 µg/ml)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 8MIC (256 µg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 16MIC (512 µg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
พาราโนโตรฟินอล 4MIC (256 µg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+, Fungal growth; -, no fungal growth

7.4 การเติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ในการทำยางพาราแผ่น และเพาะเลี้ยงเชื้อรา

นำยางพาราสดมาเตรียมแผ่นยางโดยเติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 และพาราโนโตรฟินอล ความเข้มข้น 4MIC, 8MIC, 16MIC และ 32MIC ในขั้นตอนการตกตะกอน จากนั้นนำไปรีดให้เป็นแผ่น ตากให้แห้งเป็นเวลา 1-2 วัน ตัดยางแผ่นดิบให้มีขนาดประมาณ 5x5 เซนติเมตร เพาะเชื้อรา *Aspergillus* sp. SR9 และ *Penicillium* sp. PR02 (1×10^6 ถึง 5×10^6 CFU/ml) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยหยดลงบนชิ้นยางแผ่น เก็บชิ้นยางแผ่นไว้ในกล่องใส ความชื้นสัมพัทธ์ 100%RH ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลการเจริญของเชื้อรา 14 วัน ผลดังตารางที่ 10

การทดสอบกับเชื้อรา *Aspergillus* sp. SR9 พบว่าแผ่นยางที่เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นที่ 4MIC และ 8MIC มีเชื้อราขึ้นในวันที่ 2 เช่นเดียวกับแผ่นยางควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัด ส่วนแผ่นยางที่เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นที่ 16MIC มีเชื้อราขึ้นในวันที่ 3 และที่ความเข้มข้น 32MIC มีเชื้อราขึ้นในวันที่ 4 แผ่นยางที่เติมพาราโนโตรฟินอล ที่ความเข้มข้น 4MIC, 8MIC, 16MIC และ 32MIC มีเชื้อราขึ้นในวันที่ 2, 3, 12 และ 14 ตามลำดับ

การทดสอบกับเชื้อ *Penicillium* sp.PR02 พบว่าแผ่นยางควบคุมนั้นมีเชื้อขึ้นในวันที่ 4 เช่นเดียวกับแผ่นยางเดิมสารสกัดที่ความเข้มข้น 4MIC ส่วนที่ความเข้มข้น 8MIC, 16MIC และ 32MIC นั้น มีเชื้อราขึ้นวันที่ 6, 7 และ 10 ตามลำดับ สำหรับแผ่นยางที่เติมพาราโนโตรฟินอล ที่ความเข้มข้น 4MIC, 8MIC, 16MIC และ 32MIC มีเชื้อราขึ้นในวันที่ 5, 9, 13 และ 14 ตามลำดับ

ตารางที่ 10 การเจริญของ *Aspergillus* sp. SR9 และ *Penicillium* sp. PR02 บนแผ่นยางที่เติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 100%

เวลา ชนิดสารทดสอบ	วันที่													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Aspergillus</i> sp. SR9														
Control	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 4MIC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 8MIC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 16MIC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 32MIC	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (4MIC)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (8MIC)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (16MIC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (32MIC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Penicillium</i> sp. RR02														
Control	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 4MIC	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 8MIC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 16MIC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 32MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (4MIC)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (8MIC)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (16MIC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (32MIC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+, Fungal growth; -, no fungal growth

7.5 การทดสอบแผ่นยางพาราที่เติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ในสถานะธรรมชาติ

นำแผ่นยางพาราที่เติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ที่ความเข้มข้นต่างๆ และที่ไม่ได้เติม ไปวางไว้ในสถานะธรรมชาติ เพื่อให้เกิด natural infection พบว่าเชื้อราเริ่มขึ้นบนแผ่นยางพาราที่ไม่ได้เติมสารสกัดในวันที่ 27 ส่วนแผ่นยางพาราที่เติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 4MIC, 8MIC, 16MIC และ 32MIC นั้น มีเชื้อราขึ้นในวันที่ 29, 32, 35 และ 38 ตามลำดับ ในส่วนของแผ่นยางพาราที่เติมพาราโนโตรฟินอล ที่ความเข้มข้น 4MIC, 8MIC, 16MIC และ 32MIC นั้น มีเชื้อราขึ้นในวันที่ 29, 33, 36 และ 39 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

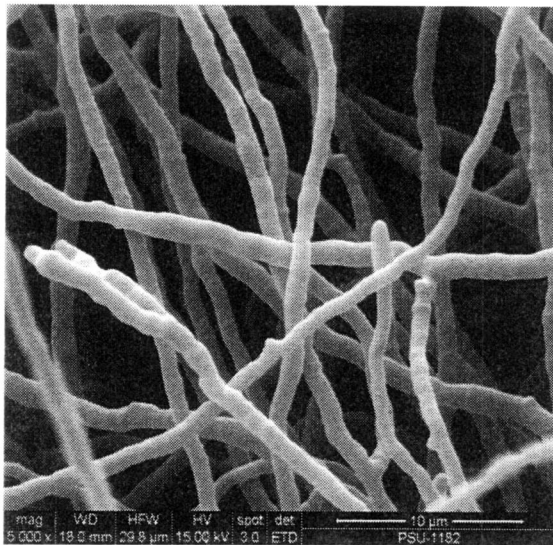
ตารางที่ 11 การเกิดเชื้อราบนแผ่นยางพาราที่เติมและไม่ได้เติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสถานะธรรมชาติ

ชนิดสารทดสอบ \ เวลา	วันที่													
	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Control (ยาง)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 4MIC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 8MIC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 16MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
สารสกัด 32MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (4MIC)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (8MIC)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (16MIC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>p</i> -nitrophenol (32MIC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

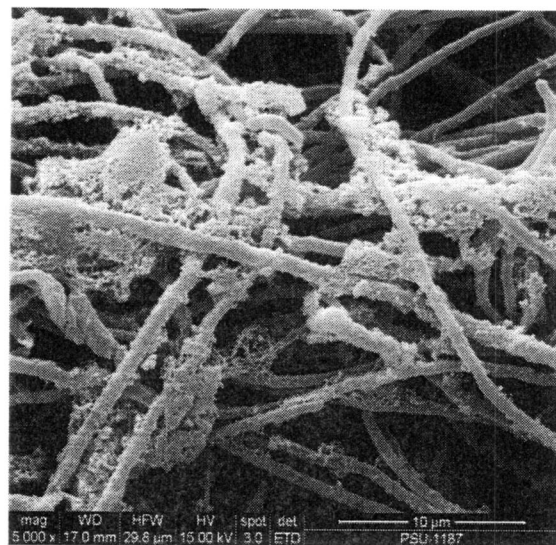
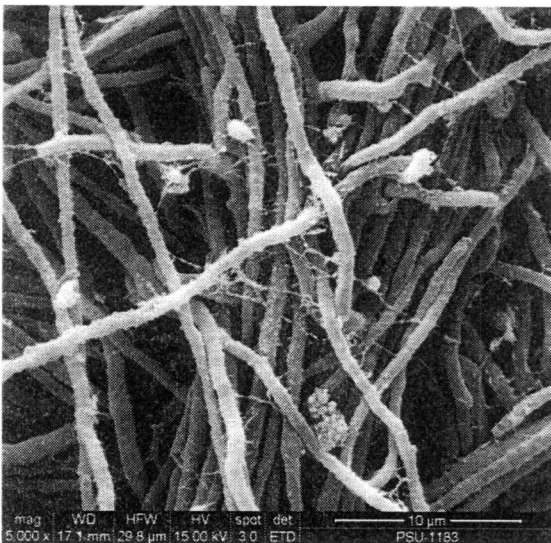
+, Fungal growth; -, no fungal growth

8. การทดสอบผลของสารสกัดต่อเส้นใยเชื้อรา

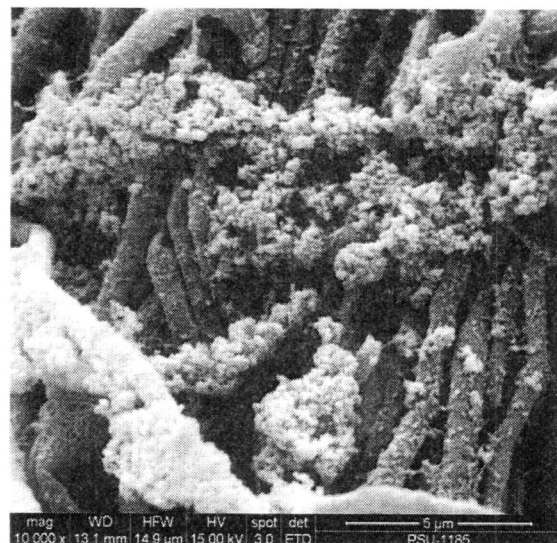
ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากโครงการวิจัยที่เสนอไว้ โดยนำสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ความเข้มข้น 4MIC มาทดสอบโดยวิธี dual culture technique กับเชื้อรา *Penicillium* sp. PR02 และ *Rhizopus* sp. RS12 แล้วตัดปลายสายราไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope (SEM) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารสกัด และที่สัมผัสกับพาราโนโตรฟินอล (4MIC) ผลการทดสอบดังรูปที่ 9 และ 10



Control PR02

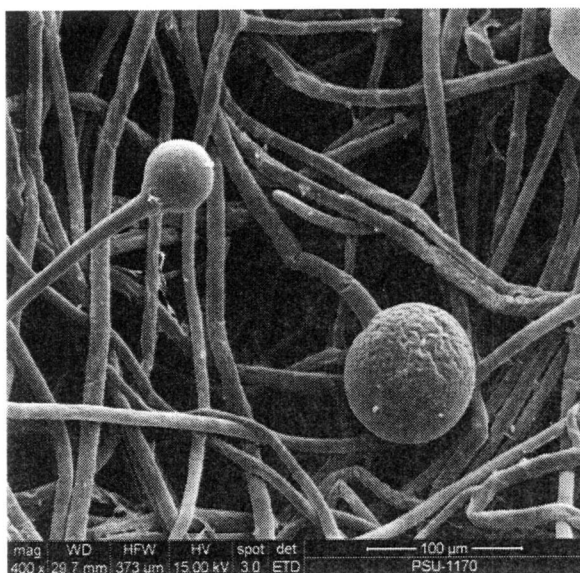
PR02+ *p*-nitrophenol (4MIC)

PR02 + AC51 (4MIC)

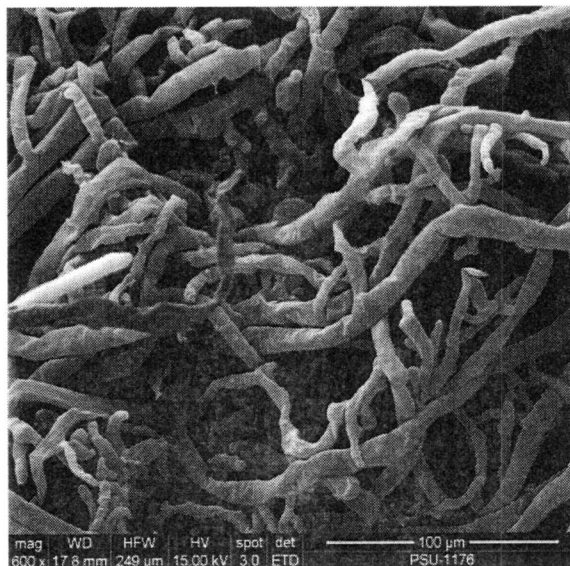


PR02 + AC51 (4MIC)

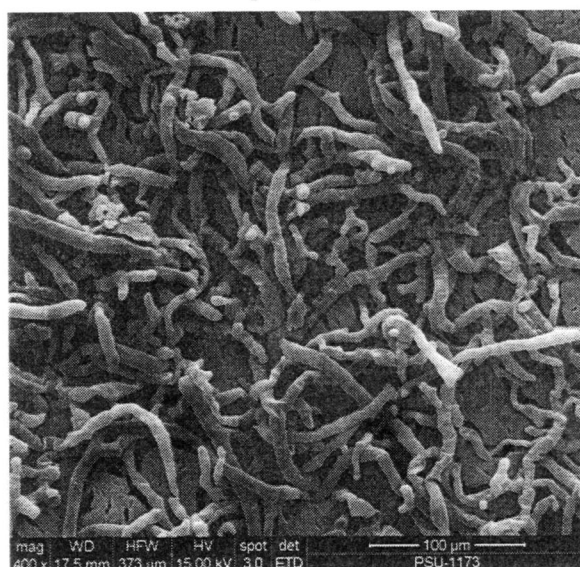
รูปที่ 9 SEM ของเชื้อรา *Penicillium* sp. PR02 เมื่อทดสอบกับสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 และ พาราไนโตรฟินอล



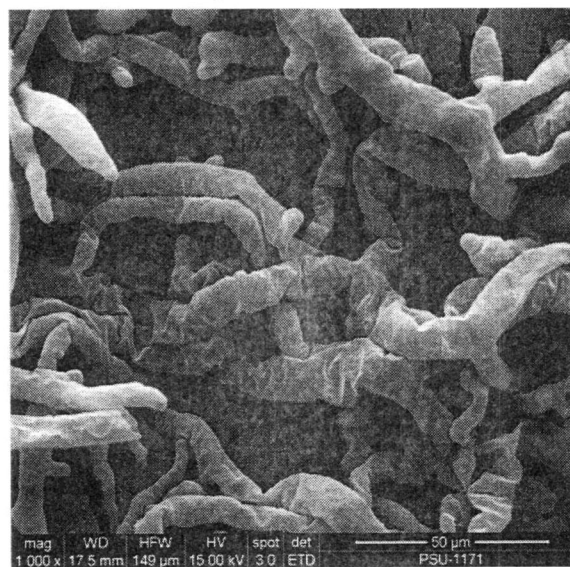
Rhizopus sp. RS12



RS12 + *p*-nitrophenol (4MIC)



RS12 + AC51 (4MIC)

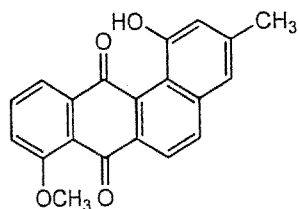


RS12 + AC51 (4MIC)

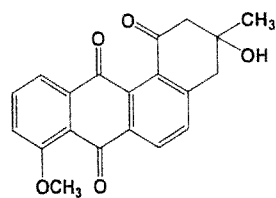
รูปที่ 10 SEM ของเชื้อรา *Rhizopus* sp. RS12 เมื่อทดสอบกับสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 และ พาราไนโตรฟินอล

9. การศึกษากลุ่มประกอบทางเคมี

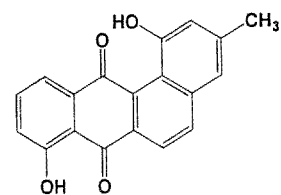
ทำการแยกสารจากส่วนสกัดหยาบเอริธโรซิเตทจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. AC51 แยกได้สาร tetrangulol methyl ester เป็นสารหลัก และสาร 8-*O*-methyltetrangomycin และ tetrangulol (รูปที่ 11)



tetrangulol methyl ester



8-*O*-methyltetrangomycin



tetrangulol

รูปที่ 11 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. AC51