## วิธีดำเนินการ

### 1. การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และ Actinomycetes

**เชื้อ *Bacillus* spp.**

แยกเชื้อ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดิน โดยนำตัวอย่างดินผสมกับ 0.85% NaCl แช่ใน water bath ที่ 80 °C เป็นเวลา 5 นาที เจือจาง และเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *Bacillus* spp. นำมาศึกษาลักษณะและรูปร่างของสปอร์โดยการย้อมสีแกรม เก็บเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ศึกษาต่อไป เชื้อบางส่วนได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. เมตตา องค์สกุล และ ผศ.ดร.วิจิตรา ลีละศุภกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**เชื้อ actinomycetes**

เชื้อ actinomycetes แยกได้จากตัวอย่างดินและยางพาราแผ่น โดยนำตัวอย่างยางแผ่นมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 3x5 มิลลิเมตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อผสม tween 80 ส่วนตัวอย่างดินนำมาเจือจางในน้ำกลั่นไร้เชื้อ จากนั้นเกลี่ยสารละลายตัวอย่างบนอาหาร actinomycetes isolation agar บ่มเพาะเชื้อที่ 30 °C ประมาณ 7 วัน เลือกโคโลนีของ actinomycetes ไว้ทำการทดลองต่อไป เชื้อบางส่วนได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อำไพทิพย์ สุขหอม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### 2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยวิธี dual culture technique

เชื้อราที่นำมาทดสอบ มี 6 ไอโซเลท คือ *Fusarium* sp. SR2, *Aspergillus* sp. SR9, *Aspergillus* sp. NY5, *Penicillium* sp. PR2, *Cladosporium* sp. TT13 และ *Rhizopus* sp. SR12 ซึ่งแยกได้จากยางแผ่น โดยคุณสุพรรษา ชาญด้วยกิจ (2551) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA)ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วนำเชื้อ *Bacillus* spp. มาแตะเป็นจุดหรือขีดเป็นแนวยาว ให้ห่างจากขอบโคโลนีเชื้อรา 1 เซนติเมตร (Leelasuphakul *et al.*, 2006) ส่วนเชื้อ actinomycetes ให้เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร ISP-2 ไว้ ประมาณ 14-21 วัน หรือจนกว่าจะสร้างสปอร์ จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราตัวทดสอบมาวางให้ห่างจากแนวเชื้อ actinomycetes 1 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน ถ้ามีการยับยั้งเชื้อจะเห็นรอยเว้าของเชื้อรา (ดัดแปลงจาก Jimenez-Esquilin and Roane, 2005)

### 3.การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เพาะเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ในอาหารเหลว ISP-2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองด้วยแผ่น

กรองขนาด 0.45 μm นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ผสมกับ PDA double strength หลอมเหลว เทใส่จานไร้เชื้อ จากนั้นนำก้อนเชื้อราที่เจาะจากบริเวณขอบโคโลนีมาวางบนกึ่งกลางอาหารวุ้น ชุดควบคุมใช้อาหาร ISP-2 ไร้เชื้อแทนน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes บ่มที่ 25 °C จนกว่าเชื้อในชุดควบคุมจะเจริญจนเกือบเต็มจาน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราชุดทดสอบและชุดควบคุม โดยวัดสองแนวตั้งฉากกัน นำค่าเฉลี่ยมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร (Gamliel *et al.*, 1989)

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = 100-(\frac{R^2 \times 100}{r^2})$$

R และ r เป็นค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีราชุดทดสอบและชุดควบคุมตามลำดับ

**4 การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes**

ทำการสกัดโดยใช้ ethyl acetate (EtOAc) โดยเติม EtOAc ในน้ำเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 2:1 ในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น นำส่วน EtOAc ที่ได้จากการสกัดสองครั้งมารวมกัน ใส่สารกำจัดน้ำ คือ sodium sulphate anhydrous กรองสารละลาย EtOAc แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 $^0$C จะได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes สำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

**5 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ในการยับยั้งเชื้อรา**

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 200 μg/ml ด้วยวิธี microbroth dilution (CLSI, 2000) สารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้จะนำมาทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) โดยเจือจางสารสกัดแบบลำดับสอง 10 ความเข้มข้น (0.25 -128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยอาหาร RPMI-1640 ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และเติม spore suspension ของเชื้อรา ($1x10^4$ - $5x10^4$ CFU/ml) โดยใช้ amphotericin B และ พาราไนโตรฟีนอล เป็นสารต้านราสำหรับเปรียบเทียบ บ่มที่อุณหภูมิ 25 $^0$C นาน 3-7 วัน โดยก่อนอ่านผล 1 วันจะเติมสี resazurin (1.8%) ปริมาตร 20 μl แล้วบ่มต่อจนครบเวลา ถ้ามีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สี resazurin จะเป็นสีน้ำเงินหรือม่วง ถ้ามีการเจริญของเชื้อรา จะเป็นสีชมพู ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารในหลุมที่ยังคงเป็นสีน้ำเงินหรือม่วง และดูดเชื้อจากหลุมที่เป็นสีน้ำเงินหรือม่วงทุกหลุม หลุมละ 10 μl หยดลงบนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน ค่า MFC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ไม่มีเชื้อขึ้น

**6. จำแนกชนิดของ actinomycetesที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา**

6.1 จัดจำแนกด้วยวิธีสัณฐานวิทยา

เลี้ยงเชื้อ actinomycetes บนอาหาร ISP-2 เพื่อดูลักษณะ สี ของ aerial mycelium และ substrate mycelium เปรียบเทียบกับหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology นอกจากนี้ก็นำไปส่องดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อลักษณะของสปอร์

6.2 จำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

โดยส่งไปจัดจำแนกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**7. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารต้านเชื้อราของเชื้อ actinomycetes**

7.1 การเขย่า (เปรียบเทียบระหว่างสภาวะเขย่าและไม่เขย่า)

เพาะเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ในอาหารเหลว ISP-2 โดยเติม spore suspension ในอัตราส่วน $10^6$ spore/ml จากนั้นบ่มเพาะเชื้อ 2 แบบ คือวางไว้ไม่เขย่า และนำไปเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราทุกสัปดาห์ ด้วยวิธี agar dilution

7.2 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ISP-2 ที่มี pH 6, 7 และ 8 ในขวดแบน บ่มที่สภาวะไม่เขย่า เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราทุกสัปดาห์ ด้วยวิธี agar dilution

7.3 อุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ISP-2 ที่มี pH 7 ในขวดแบน บ่มที่สภาวะไม่เขย่าที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25, 30 และ 35 °C เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราทุกสัปดาห์ ด้วยวิธี agar dilution

**8. การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes และสารสกัดบนยางแผ่นในห้องทดลอง**

**8.1 การศึกษาผลของความชื้นต่อการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น**

นำยางพาราแผ่นดิบที่เตรียมใหม่และตากให้แห้ง มาตัดเป็นแผ่นชิ้นเล็ก ๆขนาด 5x5 ซม. ใส่ในกล่องใสที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 80% 90% และ 100% จากนั้นหยด spore suspension ของเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Penicillium* sp. PR02 และ *Aspergillus* sp. SR9 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ $1x10^6$ ถึง $5x10^6$ CFU/ml) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนชิ้นยางแผ่น บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลการเจริญของเชื้อราทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

**8.2 การศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อ actinomycetes และสารสกัดบนยางแผ่น**

นำแผ่นยางพาราขนาด 5x5 ซม. มาจุ่มน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. AC51 และสารสกัดจาก AC51 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 2 เท่าของค่า MIC จนถึง 16MIC แผ่นยางที่จุ่มด้วยพาราไนโตรฟีนอล (4MIC) และชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มสาร ผึ่งแผ่นยางให้แห้ง นำมาใส่ในกล่อง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100% แล้วหยด spore suspension ของเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Penicillium* sp. PR02 และ *Aspergillus* sp. SR9 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ $1x10^6$ ถึง $5x10^6$ CFU/ml) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนชิ้นยางแผ่น จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางทุกวันเป็นเวลา 14 วัน

**8.3 การทดสอบแผ่นยางพาราที่ชุบด้วยสารสกัดในสภาวะธรรมชาติ**

นำแผ่นยางพาราขนาด 5x5 ซม. ที่ชุบและไม่ได้ชุบด้วยสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปวางไว้ในสภาวะธรรมชาติ คล้ายกับโรงตากยางของเกษตรกร เพื่อให้เกิด natural infection จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางทุกวันเป็นเวลา 1 เดือน

**8.4 การศึกษาผลของการเติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ในขั้นตอนการทำยางพาราแผ่นและเพาะเลี้ยงเชื้อรา**

นำน้ำยางพาราสดมาเตรียมแผ่นยางโดยเติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 และพาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 4MIC, 8MIC, 16MIC และ 32MIC ในขั้นตอนการตกตะกอน จากนั้นนำไปรีดให้เป็นแผ่น ตากให้แห้งเป็นเวลา 1-2 วัน ตัดยางแผ่นดิบให้มีขนาดประมาณ 5x5 เซนติเมตร เพาะเชื้อรา *Aspergillus* sp. SR9 และ *Penicillium* sp. PR02 ($1x10^6$ ถึง $5x10^6$ CFU/ml) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยหยดลงบนชิ้นยางแผ่น เก็บชิ้นยางแผ่นไว้ในกล่องใส ความชื้นสัมพัทธ์ 100%RH ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลการเจริญของเชื้อรา 14 วัน

**8.5 การศึกษาผลของการเติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ในขั้นตอนการทำยางพาราแผ่นในสภาวะธรรมชาติ**

นำแผ่นยางพาราที่เติมสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 และ พาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 4MIC, 8MIC, 16MIC และ 32MIC ตามข้อ 8.4 ไปวางไว้ในสภาวะธรรมชาติ คล้ายกับโรงตากยางของเกษตรกรเพื่อให้เกิด natural infection จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อราบนแผ่นยางทุกวันเป็นเวลา 1 เดือน

**9. การศึกษาผลของสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. ต่อเส้นใยเชื้อรา**

โดยนำสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51 ความเข้มข้น 4MIC มาทดสอบโดยวิธี dual culture technique กับเชื้อรา *Penicillium* sp. PR02 และ *Rhizopus* sp. RS12 แล้วตัดปลายสายราไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope (SEM) ที่ศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารสกัด และที่สัมผัสกับ พาราไนโตรฟีนอล (4MIC)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 15 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 244851
เลขเรียกหนังสือ

**10. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจาก *Streptomyces* sp. AC51**

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. AC51 ด้วย TLC ชนิดธรรมดา และชนิด reverse phase RP-18 โดยใช้ระบบตัวเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ จากนั้นตรวจสอบสภาพการละลายของส่วนสกัดหยาบในตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ แล้วแยกส่วนสกัดหยาบออกเป็นส่วนย่อยด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อยที่ละลายและไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อีกครั้งด้วย TLC ชนิดธรรมดา และ/หรือชนิด reverse phase RP-18 แล้วแยกส่วนย่อยด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำส่วนย่อย ๆที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำหลายครั้งโดย เลือกตัวอยู่กับที่และตัวชะที่เหมาะสม

ใช้ข้อมูลสเปกโทรสโกปีต่าง ๆ เช่น อัลตราไวโอเลต และ วิซิเบิล อินฟราเรด นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ และแมสสเปกโทรสโกปี ในการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์