

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus pneumoniae*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* และ *Pseudomonas aeruginosa*) ที่คือต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด โดยสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่เก็บมาจากดินแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยจำนวน 13 ตัวอย่าง บนอาหาร Actinomycetes isolation agar (AIA) ได้ทั้งหมด 71 ไอโซเลท เมื่อนำไปทำการคัดเลือกบนอาหารแข็ง AIA, International Streptomyces project 2 (ISP2) และ Tryptic soy agar (TSA) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียคือยาสูงสุดบนอาหาร ISP2 โดยมีจำนวน 22 ไอโซเลทหรือร้อยละ 31 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรียคือยา ซึ่งในจำนวนนี้มีเชื้อจำนวน 11 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และจำนวน 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียคือยาที่ใช้ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อทั้ง 11 ไอโซเลทไปทดสอบการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวโดยวิธี Agar well diffusion ทำให้คัดเลือกได้เชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียคือยาดีที่สุดในจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ F29, G7, H6 และ M11 เพื่อมาทำการผลิตและสกัดสารปฏิชีวนะด้วย ethyl acetate จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Disc diffusion method และ Agar dilution method พบว่าสารสกัดจากไอโซเลท F29 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* และ *E. coli* ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration; MIC) เท่ากับ 0.125, 128, 32 และ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดจากไอโซเลท G7 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* และ *E. coli* ที่คือยา โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 128 - 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากไอโซเลท H6 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านได้เฉพาะเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากไอโซเลท M11 ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียคือยาที่ใช้ทดสอบทุกสายพันธุ์ จากการแยกสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ในระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ chloroform : methanol อัตราส่วน 90 : 10 และ 95 : 5 และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยเทคนิค Bioautography พบว่าสารสกัดจากไอโซเลท F29 ที่ค่า R_f 0.75 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียคือยาที่ใช้ทดสอบทุกสายพันธุ์ ในขณะที่สารสกัดจากไอโซเลท H6 ที่ค่า R_f 0.75 และ 0.84 และสารสกัดจากไอโซเลท G7 ที่ค่า R_f 0.81 มีฤทธิ์ต้านทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่คือยา โดยส่วนที่แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากไอโซเลท F29 พบว่ามีสารกลุ่มอะมิโน ในขณะที่สารสกัดจากไอโซเลท H6 และ G7 พบสารกลุ่มอะมิโน เทอร์ปีนและกรดไขมัน

This study aims to isolate and select actinomycetes capable of producing antibiotics against multi-drug resistant bacteria, including Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*). A total of 71 isolates were recovered from 13 soil samples collected from various areas in Thailand using Actinomycetes isolation agar (AIA) medium. All isolates were subjected to primary screening on AIA, International *Streptomyces* project 2 (ISP2) and Tryptic soy agar (TSA) media by streak plate method for antibiotic activity against multi-drug resistant bacteria. The result showed that the highest inhibition activity against test bacteria were obtained from ISP2 medium. It was found that 22 isolates (31%) showed inhibitory effect on growth of the drug-resistant bacteria, which the amount of 11 isolates exhibited antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative drug-resistant bacteria, and that only 2 isolates could inhibit growth of all tested strains. Altogether 11 putative isolates were subjected to secondary screening on broth medium by Agar well diffusion. Finally, 4 isolates of actinomycetes, including F29, G7, H6 and M11 were selected for further investigation on the production of antibiotics. The antibacterial substances were extracted with ethyl acetate and tested against drug-resistant bacteria by Disc diffusion and Agar dilution method. The best result revealed that the crude extract from the isolate F29 exhibited broad spectrum antibacterial activity against *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *A.*

baumannii and *E. coli* with the minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.125, 128, 32 and 128 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The crude extract from the isolate G7 showed weaker antibacterial activity against *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* and *E. coli* with the MIC ranging from 128 - 512 $\mu\text{g/ml}$, and that the crude extract from the isolate H6 exhibited activity against only *S. aureus*, showing the lowest MIC of 0.25 $\mu\text{g/ml}$, whereas the crude extract from the isolate M11 did not express antibacterial activity to all strains of tested bacteria. Active ingredients were separated from the crude extracts by Thin layer chromatography (TLC) technique, using chloroform : methanol ratio of 90:10 and 95:5 as mobile phase. The TLC chromatograms were then investigated for antibacterial activity against multi-drug resistant bacteria by direct bioautography technique. It was found that the band with R_f value of 0.75 of the isolate F29 showed antibacterial activity against all strains of tested bacteria, whereas the active fractions of the crude extract from the isolate H6 with R_f value of 0.75 and 0.84, and from the isolate G7 with R_f value of 0.81 exhibited antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative drug-resistant bacteria. The chemical composition of an active fraction from the isolate F29 was amino group, whereas the active fractions from the isolate H6 and G7 were amino terpene and fatty acid.