



การคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตตรงควัดฤและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสำหรับการย้อมสีไหม



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร  
ปีการศึกษา 2565  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตตรงควัตถุและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสำหรับการย้อมสีไหม



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร  
ปีการศึกษา 2565  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตตรงควัตถุและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสำหรับการ  
ย้อมสีไหม"

ของ ธนัญญา นวลจอน

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

### คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสุ ปฐมอารีย์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จวงจันทร์ จำปาทอง)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นารัตน์ นานแก้ว)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หนึ่งฤทัย สุพรรณ)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(ดร.ธรรณิศา บุญสร้างสม)

### อนุมัติ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตตรงควัตถุและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย สำหรับการย้อมสีไหม
ผู้วิจัย	ธนัญญา นวลจอน
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จวงจันทร์ จำปาทอง
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นารีนักษณ์ นาแก้ว ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หนึ่งฤทัย สุพรม
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร, มหาวิทยาลัย นเรศวร, 2565
คำสำคัญ	สีย้อมธรรมชาติจากแอกติโนแบคทีเรีย, สารต้านแบคทีเรีย, แอกติโน มายซิน, ทีแอลซี – ไบโอบีโอโตกราฟี

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตตรงควัตถุต้านแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพืช โดยมีแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 194 ไอโซเลต และพบว่าแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 44 ไอโซเลตที่สามารถผลิตตรงควัตถุบนปลายข้าวซึ่งใช้เป็นสับสเตรตได้ จากนั้น นำสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตมาทดสอบกับแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 527, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501, *Staphylococcus aureus* DMST 4745 และ *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518 โดยวิธี paper disc diffusion ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้ 8 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพียงกลุ่มแกรมบวกเท่านั้น ทั้งนี้พบว่า สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจาก TN183 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* TISTR 518 และ *S. aureus* DMST 4745 ได้ดีที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ  $17.63 \pm 1.48$  และ  $11.50 \pm 0.87$  มิลลิเมตรตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 8 ชนิด โดยเปรียบเทียบฐานข้อมูล EzBioCloud ปรากฏว่าแอกติโนแบคทีเรียทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งได้แก่ *Streptomyces* sp. (TN012, TN052 และ TN195), *Streptomyces shenzhenensis* (TN015), *Streptomyces adustus* (TN105), *Streptomyces gramineus* (TN166 และ TN183) และ *Streptomyces aquilus* (TN215) ในการศึกษาี้ ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต TN183 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีร่วมกับเทคนิคไบโอบีโอโตกราฟี จากนั้นนำส่วนแยกย่อยที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ LC-QTOF-MS/MS เมื่อนำสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 มาแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

(คอลัมน์ที่ 2) สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 37 กลุ่ม จากนั้นนำกลุ่มสารที่แยกได้มาศึกษาด้วยเทคนิค bioautography พบว่า sub-fraction กลุ่มที่ 22-31 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. epidermidis* TISTR 518 ได้ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion method พบว่า sub-fraction กลุ่มที่ 26-28 (ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. epidermidis* TISTR 518 ได้ โดย sub-fraction กลุ่มที่ 28 มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งมากที่สุดเท่ากับ  $20.03 \pm 0.60$  มิลลิเมตร รองลงมาคือ sub-fraction กลุ่มที่ 26 และ 27 เท่ากับ  $18.33 \pm 0.22$  และ  $18.90 \pm 0.50$  มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ส่วนแยกย่อยด้วย LC-QTOF-MS/MS พบว่า sub-fraction กลุ่มที่ 26 ตรวจพบสาร actinomycin D และสาร actinomycin X<sub>2</sub> ในขณะที่ sub-fraction กลุ่มที่ 27-28 พบสาร actinomycin D, actinomycin X<sub>2</sub> และ actinomycin X<sub>0β</sub> จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของสารสกัดหยาบของแอคติโนแบคทีเรีย 8 ชนิดบนเส้นใยไหม พบการติดสี 3 สีที่แตกต่างกัน ได้แก่ สีชมพู สีโอรส และสีเหลือง และเมื่อทดสอบศักยภาพในการต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ของสารสกัดหยาบ TN183 บนผ้าไหมด้วยการทดสอบเชิงปริมาณด้วยวิธี AATCC 100-2019 แสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ได้เท่ากับ 99.99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ผลทดสอบเชิงคุณภาพด้วยวิธี AATCC 147-2011 พบว่า มีบริเวณใสยับยั้งเท่ากับ 7.4 มิลลิเมตร นอกจากนี้ สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจาก TN183 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อไตผิวหนังของหนูชนิด L929 โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.029 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ ผลจากการศึกษานี้จะนำไปใช้ในการศึกษาศักยภาพในการยับยั้งของ TN183 ในฐานะสารสีชีวภาพสำหรับผ้าไหมเพื่อพัฒนาเป็นต้นแบบสีย้อมไหมที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไปในอนาคต

<b>Title</b>	SCREENING OF PIGMENT-PRODUCING ACTINOBACTERIA AND THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY FOR SILK DYEING
<b>Author</b>	Tananya Nuanjohn
<b>Advisor</b>	Assistant Professor Dr. Juangjun Jumpathong
<b>Co-Advisor</b>	Assistant Professor Dr. Nareeluk Nakaew Assistant Professor Dr. Nungruthai Suphrom
<b>Academic Paper</b>	M.S. Thesis in Agricultural Biotechnology, Naresuan University, 2022
<b>Keywords</b>	actinobacterial-based natural dyes antibacterial agents textiles Thin-layer chromatography (TLC)- bioautography

### ABSTRACT

This study aimed to isolate antibacterial pigment-producing actinobacteria from plant root-associated soils. A total of 194 actinobacteria isolates were isolated, and 44 isolates were found capable of pigment production on broken-rice as a solid substrate. Ethyl acetate crude extracts were tested against some bacteria: *Escherichia coli* TISTR 527, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501, *Staphylococcus aureus* DMST 4745, and *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518 by using the paper disc diffusion method. The bioassay results showed that eight extracts from actinobacteria isolates inhibited the growth of only gram-positive bacteria. The ethyl acetate crude extract from TN183 at concentration 100 µg/disc had a strongest inhibitory against *S. epidermidis* TISTR 518 and *S. aureus* DMST 4745 by showing the diameter zone at  $17.63 \pm 1.48$  and  $11.50 \pm 0.87$  mm, respectively. These eight isolates of actinobacteria were analyzed for the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene by EzBioCloud database. The result revealed that they were grouped in the genus *Streptomyces*, namely *Streptomyces* sp. (TN012, TN052 and TN195), *Streptomyces shenzhenensis* (TN015), *Streptomyces adustus* (TN105), *Streptomyces gramineus* (TN166 and TN183), and *Streptomyces aquilus* (TN215). In this study, chemical constituents in TN183 ethyl acetate crude extract were separated using column chromatography along with bioautography. The fractions obtained were then analyzed using LC-QTOF-MS/MS. All

37 groups of compounds were isolated from the TN183 crude extract using column chromatography (column 2). Sub-fractions 22-31 inhibited the growth of *S. epidermidis* TISTR 518 in the bioautographic assay. Sub-fractions 26-28 (5 µg/disc) inhibited the growth of *S. epidermidis* when tested using the paper disc diffusion method. The inhibitory zone on the sub-fraction 28 was the largest, measuring  $20.03 \pm 0.60$  mm, followed by the sub-fraction 26 and sub-fraction 27, measuring  $18.33 \pm 0.22$  and  $18.90 \pm 0.50$  mm, respectively. In LC-QTOF-MS/MS analysis, the fraction 26 contained actinomycin D and actinomycin X<sub>2</sub>, while the fraction 27-28 contained actinomycin D, actinomycin X<sub>2</sub>, and actinomycin X<sub>0β</sub>. The dyeing performance of eight actinobacteria crude extracts on silk fibers are found in different three colors; pink, orange, and yellow. The AATCC 100-2019 method for the antibacterial test of crude extract TN183 after dyeing on silk revealed that 99.99% of *S. aureus* grew, while the AATCC 147-2011 qualitative test on silk revealed an inhibitory area of 7.4 mm. Moreover, crude extract TN183 showed non cytotoxicity effects against cell line L929 with IC<sub>50</sub> value of 0.029 µg/ml. The findings of this study will be used to investigate the dyeing potential of TN183 as a bio-dye for silk in the future in order to develop a bioactive silk dye technique.

## ประกาศคุณูปการ

ข้าพเจ้า นางสาวธัญญา นวลจอน ผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จวงจันทร์ จำปาทอง ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาพร้อมทั้งให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือมอบทุนการศึกษาตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หนึ่งฤทัย สุพรม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมถึงขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วสุ ปฐมอารีย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐนิตา บุญสร้างสม กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

ขอขอบคุณ ดร.จรัญ มากน้อย นักพฤกษศาสตร์ประจำสวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า และสวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า ในพระราชดำริพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและประสานงานในการขออนุญาตเข้าเก็บตัวอย่างในงานวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.มงคล ศิริจันทร์ ที่ได้ให้ความรู้และเทคนิคสำคัญในการศึกษาสารทุติยภูมิ

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษารังควัตถุสำหรับสีย้อมจากจุลินทรีย์

ธัญญา นวลจอน



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. สิ่งทอ (Textiles).....	5
1.1 ลักษณะของเส้นใย.....	5
1.1.1 เส้นใยประดิษฐ์ (man-made fibers).....	5
1.1.2 เส้นใยธรรมชาติ (natural fibers).....	5
1.2 การย้อมสีในสิ่งทอ.....	6

1.2.1 การย้อมโดยตรง (Direct dyeing).....	6
1.2.2 การย้อมแบบแวต (Vat dyeing).....	7
1.2.3 การย้อมโดยใช้สารช่วยสีติด (Mordant dyeing).....	7
2. ผลของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อสิ่งทอ .....	7
2.1 การสร้างกลิ่นตัว.....	8
2.2 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในสิ่งทอ.....	8
3. สิ่งทอต้านจุลชีพ .....	10
4. แอคติโนแบคทีเรีย.....	11
4.1 ลักษณะของแอคติโนแบคทีเรีย .....	11
4.2 ชนิดรงควัตถุของแอคติโนแบคทีเรีย .....	12
4.2.1 Prodigiosins .....	13
4.2.2 Melanins .....	13
4.2.3 Actinorhodins.....	13
4.2.4 Actinomycins .....	13
4.3 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแอคติโนแบคทีเรีย.....	14
4.4 การสกัดสารและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารจากแอคติโนแบคทีเรีย.....	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	16
กลุ่มตัวอย่าง.....	16
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ .....	16
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	16
เครื่องมือ .....	16
อุปกรณ์.....	17

สารเคมี.....	18
อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	19
วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
1. การคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรีย.....	19
2. การผลิตตรงคว้ตจากแอกติโนแบคทีเรียในอาหารแข็ง.....	20
2.1 การคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตตรงคว้ตบน เมล็ดข้าวเสาไห้.....	20
2.2 การผลิตตรงคว้ตจากแอกติโนแบคทีเรียบนปลายข้าว.....	20
2.3 การผลิตตรงคว้ตจากแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารร้าสกัดน้้ำมัน.....	21
2.4 การผลิตตรงคว้ตจากแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารร้าสกัดน้้ำมันผสมปลาย ข้าว.....	21
2.5 วิธีกร้าสกัดด้วยตัวทำละลาย.....	21
2.5.1 กร้าสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท.....	21
2.5.2 กร้าสกัดแบบล้าดับส่วน (sequential extraction).....	22
2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิดด้วยวิธี paper disc diffusion method.....	22
3. การจ้าแนกชนิดของแอกติโนแบคทีเรีย.....	23
3.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพบนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	23
3.2 การวิเคราะห์ห้าล้าดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโน แบคทีเรีย.....	23
4. การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแอกติโนแบคทีเรีย.....	23
4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดห้ยาบของแอกติโน แบคทีเรีย.....	23

4.2 การแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	24
5. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค bioautography ....	24
6. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยวิธี paper disc diffusion method.....	26
7. การศึกษา chemical profile ของตัวอย่างด้วยเทคนิค Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).....	26
8. การศึกษาการติดสีรงควัตถุของสารสกัดหยาบ .....	27
8.1 การศึกษาการติดสีรงควัตถุของสารสกัดหยาบของเส้นใยไหม .....	27
8.2 การศึกษาการติดสีรงควัตถุของสารสกัดหยาบในผ้าไหม .....	28
9. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative methods) ด้วยวิธี AATCC 147-2011.....	28
10. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงปริมาณ (quantitative methods) ด้วยวิธี AATCC 100-2019 .....	29
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	30
1. การคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรีย .....	30
2. การผลิตรงควัตถุจากแอคติโนแบคทีเรียในอาหารแข็ง .....	31
2.1 การคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตรงควัตถุบนเมล็ดข้าวเส้าให้.....	31
2.2 การผลิตรงควัตถุจากแอคติโนแบคทีเรียบนปลายข้าว .....	32
2.3 การผลิตรงควัตถุจากแอคติโนแบคทีเรียที่มีส่วนผสมของรำสกัดน้ำมันและรำสกัดน้ำมันผสมปลายข้าว.....	34
2.4 การสกัดแบบลำดับส่วน (sequential extraction) .....	34

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิดด้วยวิธี paper disc diffusion method	34
3. การจัดจำแนกชนิดของแอคติโนแบคทีเรีย	40
3.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	40
3.2 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอคติโนแบคทีเรีย	40
4. การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรีย	43
4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบของแอคติโนแบคทีเรีย	43
4.2 การแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี	43
5. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค bioautography	46
6. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยวิธี paper disc diffusion method	47
7. การศึกษา chemical profile ของตัวอย่างด้วยเทคนิค Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)	51
8. การศึกษาการติดสีรงควัตถุของสารสกัดหยาบ	56
8.1 การศึกษาการติดสีรงควัตถุของสารสกัดหยาบของเส้นใยไหม	56
8.2 การศึกษาการติดสีรงควัตถุของสารสกัดหยาบในผ้าไหม	58
9. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative methods)	58
10. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงปริมาณ (quantitative methods)	59
บทที่ 5 บทสรุป	60
สรุปผลการวิจัย	60
อภิปรายผล	62

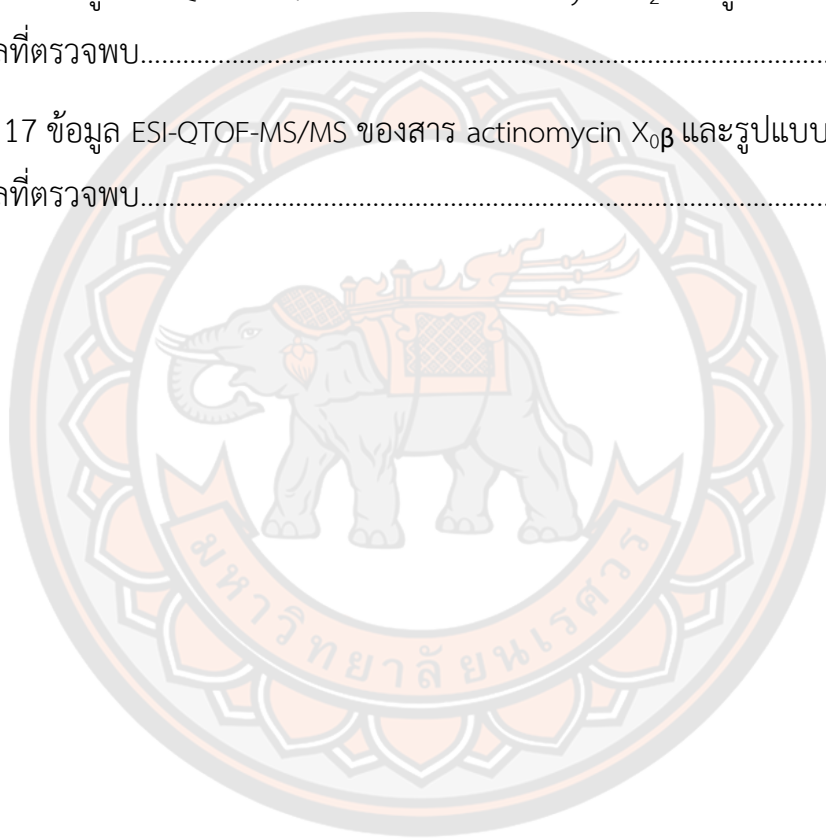
ข้อเสนอแนะ .....	65
บรรณานุกรม .....	66
ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	81
ภาคผนวก ข ผลการผลิตรงควัตถุจากแอคติโนแบคทีเรียในอาหารแข็ง.....	84
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมี.....	87
ภาคผนวก ง ผลการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรีย .....	88
ประวัติผู้วิจัย .....	110



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 จุลินทรีย์และสาเหตุการก่อโรค.....	9
ตาราง 2 จำนวนไอโซเลตที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบบรอกพีชชนิดต่างๆ .....	30
ตาราง 3 การจัดกลุ่มตามลักษณะสีของแอกติโนแบคทีเรียบนบนเมล็ดข้าวจำนวน 44 ไอโซเลต.....	31
ตาราง 4 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ 24 ชั่วโมง ของตัวอย่างสารสกัดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์ .....	33
ตาราง 5 ปริมาณสารสกัดหยาบของแอกติโนแบคทีเรียที่เลี้ยงบนปลายข้าวจากการสกัดแบบลำดับส่วน .....	34
ตาราง 6 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. epidermidis</i> (TISTR 518) ที่ 24 ชั่วโมง ของตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์.....	36
ตาราง 7 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> (DMST 4745) ที่ 24 ชั่วโมง ของตัวอย่างสารสกัด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์ .....	38
ตาราง 8 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูล EzBioCloud .....	42
ตาราง 9 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย <i>S. epidermidis</i> (TISTR 518) ด้วยวิธี paper disc diffusion method ของส่วนแยกย่อยที่ได้ในกลุ่มที่ 8 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์....	48
ตาราง 10 ค่าสีของเส้นใยไหมที่วัดได้ในระบบ CIELAB.....	57
ตาราง 11 ค่าสีของผ้าไหมที่วัดได้ในระบบ CIELAB.....	58
ตาราง 12 การแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดไอโซเลต TN183 (3.02 กรัม) .....	88

ตาราง 13 การแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของกลุ่มที่ 8 ที่แยกได้จาก คอลัมน์ที่ 1 (500 มิลลิกรัม).....	93
ตาราง 14 ข้อมูลของสารกลุ่มแยกย่อยที่ทดสอบด้วยเทคนิค bioautography .....	102
ตาราง 15 ข้อมูล ESI-QTOF-MS/MS ของสาร actinomycin D และรูปแบบการ แตกหักโมเลกุลที่ตรวจพบ .....	102
ตาราง 16 ข้อมูล ESI-QTOF-MS/MS ของสาร actinomycin X <sub>2</sub> และรูปแบบการแตกหัก โมเลกุลที่ตรวจพบ.....	105
ตาราง 17 ข้อมูล ESI-QTOF-MS/MS ของสาร actinomycin X <sub>0β</sub> และรูปแบบการแตกหัก โมเลกุลที่ตรวจพบ.....	107





## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 วงจรชีวิตของแอกติโนแบคทีเรีย .....	12
ภาพ 2 โครงสร้างของ actinomycin D, X <sub>2</sub> และ X <sub>0β</sub> .....	14
ภาพ 3 วิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค bioautography ...	25
ภาพ 4 ตัวอย่างกลุ่มรงควัตถุที่ผลิตได้จากแอกติโนแบคทีเรีย .....	32
ภาพ 5 รงควัตถุจากแอกติโนแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน บนปลายข้าวที่อบแล้ว.....	33
ภาพ 6 บริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบต่างๆ จากแอกติโนแบคทีเรียต่อเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (TISTR 518) ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์ .....	37
ภาพ 7 บริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบต่างๆ จากแอกติโนแบคทีเรียต่อเชื้อ <i>S. aureus</i> (DMST 4745) ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์ .....	39
ภาพ 8 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส.....	40
ภาพ 9 Phylogenetic tree บริเวณยีน 16S rRNA ของไอโซเลต TN183 วิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor joining (NJ).....	43
ภาพ 10 แผนภาพการแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	44
ภาพ 11 TLC profile ของสารสกัด TN183 จากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ทั้งหมด 26 กลุ่ม.....	45
ภาพ 12 TLC profile จากส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 8 ส่วน sub-fraction ที่ G8.SG22-G8.SG31 .....	46
ภาพ 13 การแยกสารเมแทบอไลต์จากไอโซเลต TN183 จากส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 8.....	47

ภาพ 14 บริเวณยับยั้งเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (TISTR 518) ที่ 24 ชั่วโมง ของส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 8 จำนวน 37 ตัวอย่างที่แยกได้จากคอสม์ที่ 2 ของการแยกสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์ .....	49
ภาพ 15 บริเวณยับยั้งเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (TISTR 518) ที่ 48 ชั่วโมง ของส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 8 จำนวน 37 ตัวอย่างที่แยกได้จากคอสม์ที่ 2 ของการแยกสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์ .....	50
ภาพ 16 Base Peak Chromatogram (BPC) ของส่วนแยกย่อย G8.SG26-G8.SG28 ใน positive mode .....	51
ภาพ 17 MS/MS spectra ของ G8.SG26-28 และสารมาตรฐาน actinomycin D ที่แสดงรูปแบบการแตกหักของโมเลกุล (fragmentation) ที่ระดับค่าพลังงาน 40V .....	52
ภาพ 18 MS/MS spectra ของ G8.SG26-28 และสารมาตรฐาน actinomycin X <sub>2</sub> ที่แสดงรูปแบบการแตกหักของโมเลกุล (fragmentation) ที่ระดับค่าพลังงาน 40V .....	53
ภาพ 19 MS/MS spectra ของ G8.SG27, G8.SG28 และสารมาตรฐาน actinomycin X <sub>0β</sub> ที่แสดงรูปแบบการแตกหักของโมเลกุล (fragmentation) ที่ระดับค่าพลังงาน 40V .....	54
ภาพ 20 บริเวณที่พบการสูญเสียของกรดอะมิโนเพื่อระบุชนิดของสาร actinomycin D, X <sub>2</sub> และ X <sub>0β</sub> .....	55
ภาพ 21 การติดสีของแอกติโนแบคทีเรียในเส้นใยไหมที่ผ่านการย้อมเป็นจำนวน 2 ครั้ง .....	58
ภาพ 22 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอโดยการทดสอบตามวิธีมาตรฐานที่ 24 ชั่วโมง .....	59
ภาพ 23 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีชมพู .....	84
ภาพ 24 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีเหลือง .....	84
ภาพ 25 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีน้ำตาล .....	85
ภาพ 26 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีเทา .....	85
ภาพ 27 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีม่วง .....	85

ภาพ 28 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีเขียวขี้ม้า	86
ภาพ 29 รังควัตถุสีจากแอกติโนแบคทีเรียไฮโซเลต TN183 ที่เลี้ยงบนวัสดุหลงเหลือทางการเกษตรเป็นเวลา 7 วัน	86
ภาพ 30 รังควัตถุสีจากแอกติโนแบคทีเรียไฮโซเลต TN183 ที่เลี้ยงบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน	86
ภาพ 31 TLC profile สารสกัด TN183 จากเอทิลอะซิเตท ของแต่ละหลอดที่ทำการบันทึกผล หลอดที่ 1-45	90
ภาพ 32 TLC profile สารสกัด TN183 จากเอทิลอะซิเตท ของแต่ละหลอดที่ทำการบันทึกผล หลอดที่ 46-90	91
ภาพ 33 TLC profile สารสกัด TN183 จากเอทิลอะซิเตท ของแต่ละหลอดที่ทำการบันทึกผล หลอดที่ 91-136	92
ภาพ 34 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 1-67	95
ภาพ 35 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 67-133	96
ภาพ 36 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 133-199	97
ภาพ 37 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 199-265	98
ภาพ 38 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 265-331	99
ภาพ 39 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 331-397	100
ภาพ 40 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 397-441	101

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาของปัญหา

สิ่งทอ (Textile) เช่น เส้นใย เส้นด้าย ผืนผ้า รวมไปถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเส้นใย เส้นด้าย และผืนผ้า เกิดขึ้นจากการนำเส้นใยหรือเส้นด้ายหลายเส้นมาประสานกันบนเครื่องทอผ้าในแบบที่เหมาะสมจนเกิดเป็นเนื้อเดียวกัน จากการแสดงผลงานสิ่งทอและเครื่องจักสานในยุโรปช่วง 27,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช แสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการและศิลปะอันยาวนาน (Lambert, 1998) ในอดีต สิ่งทอมีความเกี่ยวข้องกับวิถีชีวิตของมนุษย์โดยเฉพาะเครื่องนุ่งห่ม โดยมีหลักฐานแสดงว่าในช่วง 5,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช มนุษย์ได้มีการผลิตผ้าลินิน เพื่อนำมาใช้ในสมัยอียิปต์โบราณ จนกระทั่งในช่วง 2,500 ปีก่อนคริสต์ศักราช ในยุคสำริดพบว่าอารยธรรมลุ่มแม่น้ำสินธุได้มีการเพาะปลูกฝ้ายในชมพูทวีป (Roche, 1994) ในสมัยทวารวดี อาณาจักรสยาม (ประเทศไทยในปัจจุบัน) ได้มีการค้าขายระหว่างประเทศอินเดียและประเทศจีน ซึ่งในสมัยนั้นพบหลักฐานว่ามีการซื้อและทอผ้าพื้นเมืองสำหรับใช้เอง รวมถึงมีการใช้แวดินเผาสำหรับปั่นเส้นด้าย (สำนักพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ กรมศิลปากร, 2553)

ในปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกสิ่งทอที่เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ได้แก่ เส้นใยประดิษฐ์ เส้นด้าย ผ้าผืน และเครื่องนุ่งห่ม ซึ่งในปี 2565 (มกราคม-กันยายน 2565) พบว่า การส่งออกสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม มีมูลค่าการส่งออกคิดเป็น 5,306.7 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (ประมาณ 190,032.93 ล้านบาท) ขยายตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 11.2 เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปี 2564 (สถาบันพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ, 2565) ด้วยปัจจัยการฟื้นตัวของประเทศคู่ค้าหลักของประเทศไทย ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และประเทศกลุ่มอาเซียน ทำให้มีปริมาณความต้องการและการส่งออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (กรุงเทพฯธุรกิจ, 2565) ทว่ามูลค่าการส่งออกดังกล่าวมีแนวโน้มการส่งออกที่ลดน้อยลงเนื่องจากมีการแข่งขันในตลาดโลกเพิ่มมากขึ้น เพื่อเป็นการยกระดับมูลค่าการส่งออก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงได้มีการพัฒนาต่อยอดภูมิปัญญา สร้างสรรค์ลวดลายใหม่ขึ้นมาโดยจัดทำโครงการยกระดับผ้าทอสู่สากล โดยเฉพาะผ้าทออีสานที่มีอัตลักษณ์และสร้างชื่อเสียงให้กับประเทศไทย นอกจากนี้ ยังมีการทำงานร่วมกันของนักออกแบบที่เข้ามามีส่วนร่วมในการพัฒนาให้ผ้าทอของไทยทันยุคสมัย มีประสิทธิภาพและเป็นสากลมากขึ้น

ปัญหาสำคัญของการผลิตผ้าทอ พบว่า คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย้อมด้วยสีย้อมธรรมชาติจากพืชมีข้อเสียคือ มีความไวต่อแสง ทำให้สีซีดง่าย มีกระบวนการย้อมที่ยุ่งยาก และใช้ระยะเวลาานาน อีกทั้งมีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนสิ่งทอในระหว่างการใช้งานและการเก็บรักษา เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีอากาศร้อน ทำให้มีเชื้อสะสมอยู่ที่เนื้อผ้า ส่งผลให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เชื้อรา และแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรีย ทำให้ผู้สวมใส่เกิดกลิ่นกาย (Wasif and Laga, 2009) จุลินทรีย์บางชนิดทำให้เส้นใยเกิดความเสียหายและเสื่อมสภาพจากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ ในปัจจุบัน อุตสาหกรรมสิ่งทอ เช่น เสื้อผ้ากีฬา ชุดชั้นใน ถุงเท้า และสิ่งทอทางการแพทย์ ได้มีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่มาประยุกต์ใช้ โดยอาศัยเทคนิคการเคลือบสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หรือผสมสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในเส้นใยสังเคราะห์ระหว่างการขึ้นรูป ทำให้สร้างความมั่นใจให้แก่ผู้บริโภคในด้านความปลอดภัยและสีที่ได้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ด้วยเทคนิคที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตผ้าทอเพื่อรักษาสภาพเส้นใยและลดอายุการใช้งานของผ้าทอ ให้มีอายุการใช้งานที่ยาวนานขึ้น รวมถึงยกระดับคุณภาพของผ้าทอและเพิ่มมูลค่าทางการค้าให้สูงขึ้น

ในการศึกษานี้ ได้ทำการแยกแอคติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพืชดอก (Magnoliophyta) บางชนิด เช่น *Phanera*, *Grevillea*, *Cinnamomum* และ *Magnolia* เนื่องจากพืชดอกเป็นพืชไม่มิ่งคลที่เชื่อมโยงกับความรู้สึก และความเชื่อที่อยู่ในวิถีชีวิตของคนไทยมาตลอดและสมมติฐานได้ว่า บริเวณดินรอบรากพืชดอกดังกล่าว เป็นแหล่งอาศัยของแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตตรงควัดที่มีความหลากหลาย แอคติโนแบคทีเรียดังกล่าวจะนำมาศึกษาวิธีการผลิตตรงควัด และพัฒนาคุณภาพให้เป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์สีย้อมจากแอคติโนแบคทีเรีย ที่มีคุณค่าทางด้านศิลปะและสร้างมูลค่าให้แก่ผู้สนใจนำไปพัฒนาทางการค้า ในการศึกษาวิจัยนี้ อาศัยเทคนิคทางด้านจุลชีววิทยา ได้แก่ การแยกแอคติโนแบคทีเรีย การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตตรงควัด การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เป็นต้น สำหรับเทคนิคทางด้านเคมี ได้แก่ การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของกลุ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และทดสอบประสิทธิภาพในการติดสีของสารสกัดหยาบผลสำเร็จที่ได้รับจากการศึกษานี้ จะนำไปพัฒนาเป็นรงควัตถุทางการค้าที่สร้างสรรค์เอกลักษณ์ ศิลปะ และมูลค่าแก่ชุมชนในอนาคตต่อไป

### จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อแยกแอคติโนแบคทีเรียบริเวณรอบรากพืชดอกบางชนิดที่สามารถผลิตตรงควัดในวัสดุหลงเหลือทางการเกษตร

2. เพื่อคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิดและการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์
3. เพื่อจำแนกชนิดของแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตรงควัตถุที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิด
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการติดสีย้อมของสารสกัดหยาบ

### ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการแยกและคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตรงควัตถุ การผลิตสารสกัดหยาบเพื่อแยกโครงสร้างของกลุ่มสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียที่สร้างกลิ่นไม่พึงประสงค์ในสิ่งทอ โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนผ้าทั้งเชิงคุณภาพ (Qualitative test) และเชิงปริมาณ (Quantitative test) นอกจากนี้ ได้มีการระบุชนิดของแอกติโนแบคทีเรียและเพิ่มปริมาณสารสกัดบนปลายข้าว ซึ่งรงควัตถุที่ได้จะนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และทดสอบการติดสีของสารสกัดหยาบเพื่อพัฒนาเป็นต้นแบบสีย้อมผ้าและระบุชนิดของแอกติโนแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษา

### ความสำคัญของการวิจัย

1. ทราบชนิดของแอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตรงควัตถุในวัสดุหลงเหลือทางการเกษตร
2. ทราบชนิดของกลุ่มสารออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่สร้างกลิ่นไม่พึงประสงค์ในสิ่งทอ
3. ทราบถึงประสิทธิภาพในการติดสีของสารสกัดหยาบ
4. ทราบถึงชนิดของแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตรงควัตถุที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (โดยรงควัตถุดังกล่าวมีความปลอดภัยไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ผลิตและสิ่งแวดล้อม)

### นิยามศัพท์เฉพาะ

1. แอกติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา มีความสามารถในการผลิตรงควัตถุและสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส
2. สีย้อมธรรมชาติจากแอกติโนแบคทีเรีย (Actinobacterial-Based Natural Dyes) เป็นรงควัตถุที่ผลิตได้จากแอกติโนแบคทีเรีย โดยมีคุณสมบัติเป็นสีย้อมสำหรับสิ่งทอ

3. สารต้านแบคทีเรีย (Antibacterial agents) เป็นสารประกอบที่ได้จากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งมีประสิทธิภาพต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของแบคทีเรีย

4. สิ่งทอ (Textiles) ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเส้นใยที่ได้จากธรรมชาติหรือเส้นใยที่สังเคราะห์ขึ้น และทำให้เกิดสีจากกระบวนการย้อม โดยนำไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย เช่น ผ้าพันคอ เสื้อ หมอน เข็มขัด เป็นต้น

### สมมติฐานของการวิจัย

แอคติโนแบคทีเรียจากดินอาจเป็นแหล่งของรงควัตถุที่มีความหลากหลาย รงควัตถุที่ได้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิดและสารสกัดดังกล่าวมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นต้นแบบสีย้อมผ้า



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. สิ่งทอ (Textiles)

สิ่งทอ แต่เดิมหมายถึงเฉพาะผ้าทอเท่านั้น แต่ปัจจุบันได้หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตเส้นใย เส้นด้ายธรรมชาติหรือเส้นใยที่สังเคราะห์ขึ้น โดยการสานหรือทอรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งเป็นปัจจัยพื้นฐานในการทำเครื่องนุ่งห่มเพื่อให้เกิดความสวยงาม การนำมาใช้ตกแต่งสิ่งของหรือเพื่อประดับภายในที่พักอาศัย เช่น ผ้าปูโต๊ะ ผ้าม่าน ผ้าปูที่นอน เป็นต้น ซึ่งตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้ โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ สิ่งทอจากเส้นใยประดิษฐ์ (man-made fibers) เช่น ไนลอน โพลีเอสเตอร์ อะคริลิก และสิ่งทอจากเส้นใยธรรมชาติ (natural fibers) ที่ได้จากสัตว์และพืช เช่น ผ้าไหม ปอกระเจา ผ้าย้าย เป็นต้น

##### 1.1 ลักษณะของเส้นใย

###### 1.1.1 เส้นใยประดิษฐ์ (man-made fibers)

สิ่งทอที่อยู่ในกลุ่มของเส้นใยประดิษฐ์นั้น ใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมเป็นหลัก โดยเฉพาะสิ่งทอทางเทคนิค ซึ่งเป็นวัสดุสิ่งทอและผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นเพื่อให้มีคุณสมบัติทางเทคนิคเฉพาะด้านและมีประสิทธิภาพสูง สิ่งทอนี้มีความสำคัญในด้านเศรษฐกิจมากกว่าอุตสาหกรรมสิ่งทอชนิดอื่นๆ จึงทำให้สิ่งทอทางเทคนิคเป็นสินค้าที่มีมูลค่าสูงเนื่องจากต้องอาศัยเทคนิคและความชำนาญ และทักษะในการผลิต การพัฒนาเทคโนโลยีสิ่งทอทางเทคนิค จำเป็นต้องใช้ความรู้พื้นฐานทางด้านวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ในการจัดการเส้นใย ความหลากหลายของสิ่งทอทางเทคนิคและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มนุษย์ประดิษฐ์ขึ้นช่วยทดแทนคุณสมบัติบางประการที่เส้นใยธรรมชาติไม่สามารถนำมาใช้ได้ และในบางครั้งเส้นใยประดิษฐ์กลับมีคุณสมบัติบางประการที่เหนือกว่าเส้นใยธรรมชาติที่ไม่สามารถเปรียบเทียบได้

###### 1.1.2 เส้นใยธรรมชาติ (natural fibers)

เป็นเส้นใยที่ได้มาจากแหล่งพืชหรือสัตว์ (Ticoalu et al., 2010) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ เส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากพืช เช่น ผ้าย้าย ปอกระเจา ผ้าลินิน และป่าน เป็นต้น และเส้นใยโปรตีนที่ได้จากสัตว์ เช่น ขนแกะและไหม (Faruk et al., 2012) โดยเส้นใยธรรมชาติมีลักษณะเด่นคือ มีความแข็งแรง มีน้ำหนักเบา และราคาถูก (Kalia et al., 2011) ในการเพิ่มมูลค่าเส้นใยธรรมชาตินั้น จำเป็นต้องเพิ่มคุณสมบัติบางประการที่ดีและมีประโยชน์เพื่อให้ผู้บริโภคเกิดความสนใจ เช่น การปรับปรุงคุณภาพของผ้าย้ายและผ้าลินิน โดยใช้สารละลายแอมโมเนียเพื่อปรับปรุงความเสถียรของขนาด



เส้นใย รักษาสภาพเส้นใยที่มีลักษณะบวม เพิ่มคุณสมบัติในการคืนตัวเมื่อเกิดรอยพับ และทำให้เส้นด้ายอ่อนตัวลงและเพิ่มการยืดตัวในระยะยาว (Dorny et al., 2008) นอกจากนี้ การใช้สีจากธรรมชาติในการย้อมเส้นใยธรรมชาติช่วยลดความกังวลในเรื่องการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม

### 1) ไหม

ไหม เป็นเส้นใยโปรตีนธรรมชาติที่ได้จากสัตว์ (Faruk et al., 2012) โดยมีลักษณะเด่น คือ มีความแข็งแรง รูปลักษณ์ที่หรูหรา และการสัมผัสที่นุ่มนวล แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อเสียของไหม คือ การเกิดรอยยับ ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยจุลินทรีย์จำนวนมาก และสีซีดจางเมื่อได้รับแสง ในขณะเดียวกันไหมยังมีความสามารถในการดูดซับความชื้นได้ดีทำให้เส้นใยดังกล่าวมีผลต่อการโจมตีจากแบคทีเรียหลายชนิด (Wang et al., 2021) โดยข้อบกพร่องเหล่านี้ ไหมจึงถูกจำกัดการใช้ในหลายด้าน เช่น เสื้อผ้าและวัสดุชีวภาพ เพื่อตอบสนองความต้องการที่เพิ่มขึ้นในความสะดวกสบายต่อการสวมใส่ของผู้บริโภค วิธีการทางเคมีและชีวภาพที่หลากหลายถูกนำมาใช้เพื่อทำให้เส้นใยไหมใช้งานได้จริงและสามารถยืดอายุการใช้งานได้

### 1.2 การย้อมสีในสิ่งทอ

การย้อมเป็นกระบวนการที่ทำให้สีย้อมติดอยู่กับเส้นใย โดยสีที่ใช้ย้อมมีแหล่งที่มาจาก 2 แหล่ง หลักๆ คือ 1) สีย้อมจากธรรมชาติ เช่น พืช สัตว์ จุลินทรีย์ (Samanta and Konar, 2011) และ 2) สีย้อมที่สังเคราะห์ขึ้น (Subramanian, 2005) ในกระบวนการย้อมนั้น สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือสภาวะและปัจจัยที่มีผลต่อการย้อม เช่น เวลา อุณหภูมิ และสารเคมี (กรด ด่าง และเกลือ) (วรรณัฐ สดกาการ, 2535) คุณสมบัติเส้นใยบางชนิดมีผลต่อการติดของสีย้อม เช่น เส้นใยเซลลูโลสและเส้นใยโปรตีนนั้นมีรูพรุน สามารถรับน้ำได้จึงทำให้สีย้อมเข้าไปแทรกซึมตามรูพรุนดังกล่าว ในขณะที่เส้นใยสังเคราะห์นั้นมีรูพรุนน้อย ดังนั้นในกระบวนการย้อมต้องอาศัยความร้อนเพื่อให้เกิดความอ่อนตัว เส้นใยสังเคราะห์เกิดการคลายตัวจนทำให้สีย้อมสามารถซึมเข้าแทรกผ่านรูพรุนได้ (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2560) ทั้งนี้ ในการทำปฏิกิริยาสีย้อมนั้น เริ่มต้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลภายนอกของเส้นใยก่อน จากนั้นเมื่อความชื้นหรือความร้อนเกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะทำให้เส้นใยพอง ช่วยทำให้สารสีแทรกซึมเข้าไปภายในเส้นใยได้มากขึ้น จนเกิดการเชื่อมโยงกับโมเลกุลภายในเส้นใยและเมื่อเส้นใยกลับสู่สภาวะปกติ สีย้อมนั้นจะติดอยู่บนเส้นใยตามที่ต้องการ (นวลแข ปาลิวณิช, 2542) โดยการย้อมสีมี 3 วิธี คือ

#### 1.2.1 การย้อมโดยตรง (Direct dyeing)

สามารถติดสีเส้นใยได้โดยตรง จากการเกิดพันธะของสีธรรมชาติที่เกิดกับเส้นใย โดยเส้นใยเซลลูโลส ได้แก่ ฝ้าย มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) เป็นองค์ประกอบ ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ

สีได้ ส่วนเส้นใยโปรตีน ได้แก่ ขนสัตว์ หรือไหม ที่มีทั้งหมู่กรดและเบสเป็นองค์ประกอบสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของสีทำให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวกันแบบพันธะไอออนิก ซึ่งวิธีการนี้มีความคงทนต่อการติดสีต่ำ สีที่ได้ไม่สดใส

### 1.2.2 การย้อมแบบแวต (Vat dyeing)

สีธรรมชาติที่ไม่ละลายน้ำ โดยขั้นแรกของการย้อมสีต้องทำให้สีละลายน้ำ ด้วยการทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์และตัวรีดิวซ์ เมื่อย้อมเส้นใยแล้ว ต้องทำให้โมเลกุลของสีกลับไปอยู่ในแบบที่ไม่ละลายน้ำและจับตัวอยู่บนเส้นใยได้ด้วยออกซิเจนในอากาศ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือโพแทสเซียมไดโคร ซึ่งวิธีการนี้มีความคงทน นิยมใช้ในผ้าฝ้ายและยีนส์

### 1.2.3 การย้อมโดยใช้สารช่วยติดสี (Mordant dyeing)

การย้อมด้วยวิธีนี้เป็นการย้อมแบบใช้สารช่วยติดสี สารช่วยย้อม หรือมอร์แดนต์ โดยสารนี้ทำหน้าที่ช่วยให้การยึดติดเส้นใยกับสีย้อมได้ดีขึ้นเมื่อแช่หรือต้มเส้นใยกับมอร์แดนต์ ในระหว่างที่มีการย้อม สีย้อมจะซึมเข้าไปจับกับมอร์แดนต์ ซึ่งวิธีการนี้จะเกิดการติดสีที่มีความคงทน ไม่ตกสีหรือซีดง่าย โดยมอร์แดนต์ที่ใช้อาจเป็นสารละลายของเกลือโลหะหรือมอร์แดนต์ที่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำขี้เถ้า น้ำบาดาล น้ำโคลน เป็นต้น (ณรงค์ศิลป์ รูปพนม, 2531; วิชาญ วันโพนทอง, 2548) ในการย้อมมอร์แดนต์มีอยู่ 3 วิธี คือ การย้อมมอร์แดนต์ก่อนการย้อมสี การย้อมมอร์แดนต์พร้อมกับการย้อมสี และการย้อมมอร์แดนต์หลังการย้อมสี

ปัจจุบัน การย้อมสีในสิ่งทอควรคำนึงถึงความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมเป็นหลัก โดยมุ่งเน้นไปที่สีในกระบวนการย้อม มีการรายงานเกี่ยวกับการใช้สีธรรมชาติที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เช่น ทับทิม ขมิ้น สีเสียด เปลือกหอมหัวแดง และส่วนผสมของเปลือกหอมหัวแดงกับขมิ้น ซึ่งผ้าที่ย้อมด้วยสีดังกล่าวเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สามารถการป้องกันรังสี UV และมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ สายพันธุ์ *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Candida albicans* (Gawish et al. 2017) นอกจากนี้ วิธีการย้อมโดยใช้มอร์แดนต์อินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ Sodium Citrate, Ammonium Acetate และ Potassium Acetate ในการทำปฏิกิริยา สามารถลดปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำทิ้งได้ทั้งหมด 6-29 เปอร์เซ็นต์ (Riaz et al. 2019)

## 2. ผลของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อสิ่งทอ

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ไม่เพียงแต่สร้างความเสียหายให้กับสิ่งทอเท่านั้น แต่ยังส่งผลกระทบต่อผู้สวมใส่โดยการสร้างกลิ่นไม่พึงประสงค์ คราบเหลืองโคล การเปลี่ยนสีเนื้อผ้าและสีซีด การลดความแข็งแรงของผ้า และการเพิ่มโอกาสในการสะสมของจุลินทรีย์ (Purwar et al., 2004)

เนื่องจากสิ่งทอเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ ทำให้สิ่งทอโดยเฉพาะเสื้อผ้า นั้น เป็นแหล่งอาศัยของเชื้อโรค ทำให้เกิดการแพร่กระจายของจุลินทรีย์และเกิดการติดเชื้อในร่างกายของมนุษย์ โดยบริเวณใต้วงแขนและบริเวณข้อพับมักเป็นแหล่งที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีเนื่องจากมีสภาพที่เหมาะสม (Wollina et al., 2006) ผลของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียซึ่งมีอยู่มากในธรรมชาติและสัมผัสได้ทั่วไป ทำให้เกิดปัญหาต่างๆ ดังนี้

### 2.1 การสร้างกลิ่นตัว

ผลข้างเคียงที่เกิดจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ซึ่งเป็นส่วนที่มีความสำคัญอย่างมาก (Kloos and Musselwhite, 1975; Thiry, 2001) โดยจุลินทรีย์จะมีการเผาผลาญเหงื่อและสิ่งสกปรกที่อยู่ในผ้าเพื่อการเจริญเติบโต เมื่อเหงื่อออก จุลินทรีย์จะสร้างสารเคมีที่มีกลิ่นเหม็น เช่น แบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus* สามารถสร้างกรด 3-methyl-2-hexanoic acid (E-3M2H) ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นตัวเฉพาะบุคคล (Wasif and Laga, 2009) และในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Proteus vulgaris* สามารถเผาผลาญยูเรียในรูปแบบของแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นในผ้าอ้อมเด็กทารก (Mao and Murphy, 2001) โดยในการศึกษาของ Callewaert et al. (2014) ได้ตรวจสอบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการพัฒนากลิ่นในฝ้ายและฝ้ายสังเคราะห์หลังจากที่มีการใช้งานแล้ว พบว่าเชื้อโพลีเอสเทอร์มีกลิ่นและความรุนแรงมากกว่าฝ้ายฝ้าย โดยมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียสกุล *Micrococci* ซึ่งสรุปได้ว่าองค์ประกอบของเส้นใยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันส่งผลให้เกิดกลิ่นในผ้าที่ต่างกัน

### 2.2 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในสิ่งทอ

บนร่างกายของมนุษย์มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อาศัยบนผิวหนังแตกต่างกันออกไป เช่น ใต้วงแขนมีแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus epidermidis* และ *Coryneform* ในขณะที่บริเวณขาและกระเป่าเสื้อมีการสะสมของแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus spp.*, *S. epidermis* และ *Micrococci spp.* นอกจากนี้ พบว่าบริเวณขาหนีบและเท้า เป็นแหล่งอาศัยของ *S. aureus* ยีสต์และ *Candida albicans* (Vigo and Benjaminson, 1981) โดยทั่วไป คนปกติมักจะมีปริมาณจุลินทรีย์บนผิวหนังเฉลี่ย  $1 \times 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> อีกทั้งยังพบว่าในพื้นที่ผิวที่แห้งมากอย่างปลายแขน ลำตัว และขา มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ย  $1 \times 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup> และพื้นที่รักแร้ สะดือ และปลายเท้ามีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ย  $1 \times 10^7$  CFU/cm<sup>2</sup> (Leyden et al., 1981) ซึ่งการสวมใส่เสื้อผ้าในสภาวะต่างๆ สามารถเพิ่มการติดเชื้อของจุลินทรีย์ได้หากเสื้อผ้ามีความชื้น มีการปนเปื้อนจากปัสสาวะ อุจจาระ และสิ่งปฏิกูลต่างๆ แบคทีเรียที่แยกได้จากเสื้อผ้ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวหนัง (Barnes et al., 1971) ดังนั้น การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในเนื้อผ้า ยังพบว่าเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้

เช่น การปนเปื้อนในเสื้อผ้าบริเวณขาหนีบ เนื่องจากการเจริญเติบโตของ *Brevibacterium ammoniagenes*, *E. coli* และ *Proteus mirabilis* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดผื่นผ้าอ้อมและการติดเชื้อที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น (ตาราง 1)

**ตาราง 1 จุลินทรีย์และสาเหตุการก่อโรค**

จุลินทรีย์	สาเหตุหรือสภาวะการเกิดโรค	อ้างอิง
<u>แบคทีเรียแกรมลบ</u>		
<i>Escherichia coli</i>	การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ	(Kloos and Musselwhite, 1975)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	การติดเชื้อของแผลและการเผาไหม้	(Rodger et al., 2000)
<i>Proteus mirabilis</i>	การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ	(Kloos and Musselwhite, 1975)
<i>Proteus vulgaris</i>	ก่อให้เกิดกลิ่นตัวและเกิดผื่นผ้าอ้อม	(Mao and Murphy, 2001)
<u>แบคทีเรียแกรมบวก</u>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ก่อให้เกิดกลิ่นตัว	(Wasif and Laga, 2009)
<i>Staphylococcus epidermis</i>	ก่อให้เกิดกลิ่นตัว	(Wasif and Laga, 2009)
<i>Corynebacterium ditheroideis</i>	ก่อให้เกิดกลิ่นตัว	(Natsch et al., 2003)
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	เกิดผื่นผ้าอ้อม	(Kloos and Musselwhite, 1975)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	โรคปอดบวมจากแบคทีเรีย	(Weycker et al., 2010)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	โรควัณโรค	(Keshavjee and Farmer, 2012)
<u>รา</u>		
<i>Candida albicans</i>	เกิดผื่นผ้าอ้อม	(Klunk et al., 2014)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	การติดเชื้อของผิวหนังและเล็บ	(Bassiri-Jahromi and

จุลินทรีย์	สาเหตุหรือสภาวะการเกิดโรค	อ้างอิง
		Khaksari., 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	ทำให้ผ้าฝ้ายเสียหาย	(Sevevtekin and Ucarci, 1993)

ที่มา: ตัดแปลงจาก Sagarika Devi, 2018

### 3. สิ่งทอต้านจุลชีพ

ปัจจุบัน การใช้สารต้านจุลชีพในสิ่งทอถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สิ่งทอมีความทนทานต่อการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ ซึ่งสารต้านจุลชีพที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (-static) และออกฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ (-cidal) โดยสารต้านจุลชีพเกือบทั้งหมดที่ใช้ในสิ่งทอเชิงพาณิชย์เป็นสารที่ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น chitosan, triclosan, polyhexamethylene biguanide (PHMB) และสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพมนุษย์ มีความเป็นพิษและอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิวหนัง (Höfer and Hammer, 2011) triclosan เป็นสารที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทออย่างแพร่หลาย แต่ปัจจุบันถูกห้ามใช้ในหลายประเทศ เนื่องจากสารพิษของ polychlorinated dioxins (Latch et al., 2003; Canosa et al., 2007) อีกทั้งสียที่ใช้ในกระบวนการย้อมหรือสีย้อมสังเคราะห์เกิดการปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมต่อแหล่งน้ำคือ การปนเปื้อนของสีย้อม การเกิดสารพิษ หรือสารที่อาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งในสิ่งมีชีวิต (ศุภวิน วัชรมูล, 2009) เนื่องจากสียที่ใช้ย้อมไม่สามารถยึดติดกับเส้นใยในกระบวนการย้อมได้หมด (Guaratini and Zanoni, 2000; Kunz et al., 2002) ดังนั้น ในการวิจัยปัจจุบันจึงมีการพัฒนาสารต้านจุลชีพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมในการปรับปรุงสิ่งทอ โดยมุ่งเน้นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติในกระบวนการผลิต เพื่อช่วยลดปัญหาสภาพแวดล้อมที่เลวจากการสังเคราะห์โดยการย่อยสลายตามธรรมชาติซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Joshi et al., 2009) และมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเชื้อรา กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์และจุลินทรีย์บนผิวหนังหรือจุลินทรีย์อื่นที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ที่สวมใส่หรือผู้ใช้สิ่งทอ ซึ่งสิ่งทอที่มีคุณสมบัติต้านจุลชีพนี้จะช่วยยืดอายุของผลิตภัณฑ์สิ่งทออีกด้วย (Singh et al., 2005; Gutarowska et al., 2013)

#### 4. แอคติโนแบคทีเรีย

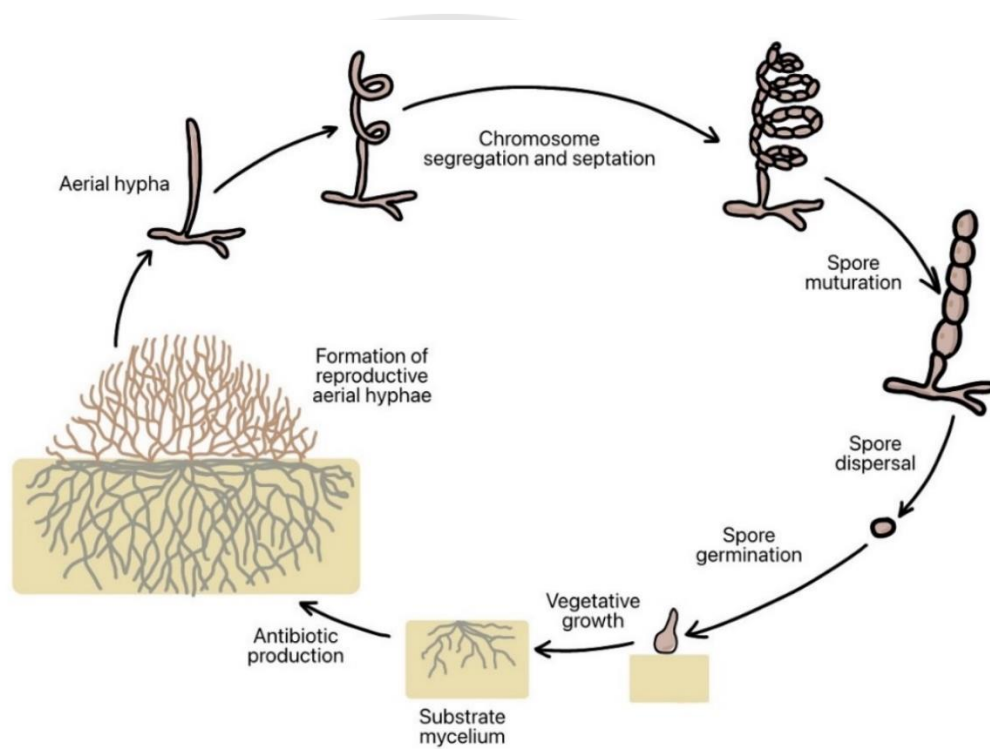
##### 4.1 ลักษณะของแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรีย (Actinobacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่แตกต่างจากแบคทีเรียทั่วไป โดยมีปริมาณของ guanine และ cytosine สูงใน DNA ประมาณ 57-75 โมลเปอร์เซ็นต์ (Dhananjeyan et al., 2010; Naikpatil and Rathod, 2011) โดยตามคู่มือการจัดหมวดหมู่พื้นฐานแบคทีเรียของ Bergy's Manual of Systematic Bacteriology จัดอยู่ในไฟลัม *Actinobacteria* (Golinska et al., 2015) โดยไฟลัม *Actinobacteria* สามารถแบ่งออกเป็น 6 คลาส ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ได้แก่ *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubroacteria* และ *Thermoleophilia* โดยสมาชิกในออเดอร์ของ *Actinomycetales* มักถูกเรียกว่า แอคติโนมายซีต (actinomycetes) (Goodfellow et al., 2012) ซึ่งในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา มีการศึกษาถึงความหลากหลายของแอคติโนมายซีตจนเกิดความเข้าใจเพิ่มมากขึ้น โดยนักวิทยาศาสตร์พบว่า แอคติโนแบคทีเรียเป็นได้ทั้ง Eubacteriales และ Hypomycetes อีกทั้งยังพบว่าในไฟลัม *Actinobacteria* เป็นหนึ่งในหน่วยอนุกรมวิธานที่มีความสำคัญและใหญ่ที่สุดในปัจจุบันจึงได้รับการยอมรับภายในโดเมนแบคทีเรียให้มีชื่อว่า แอคติโนแบคทีเรีย (Ludwig et al., 2012)

โดยส่วนใหญ่แหล่งที่พบแอคติโนแบคทีเรียมาจากแหล่งที่แยกได้จากบริเวณต่างๆ โดยเฉพาะในดิน ซึ่งเริ่มจากการค้นพบ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ Streptothricin ในปี ค.ศ. 1942 และค้นพบ Streptomycin ในอีก 2 ปีต่อมา จึงทำให้มีการศึกษาแอคติโนแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะทางการแพทย์ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยาต้านเชื้อรา ยาต้านไวรัส ยาต้านเนื้องอก ยาต้านความดันเลือดสูง ยาปฏิชีวนะ และยาที่กดภูมิคุ้มกันต้านทานโรค (Omura et al., 2001; Patzer and Volkmar, 2010; Khan, 2011) นอกจากนี้แอคติโนแบคทีเรียยังมีบทบาทสำคัญในด้านการเกษตร เช่น การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การควบคุมทางชีวภาพ การผลิตไฟโตฮอร์โมน และการละลายฟอสเฟต เป็นต้น (El-Tarabily et al., 2006; El-Tarabily et al. 2008; Jog et al. 2016)

ในแอคติโนแบคทีเรียมีเส้นใยที่เจริญบนอาหารมีลักษณะ 2 แบบ คือ การเจริญที่จมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อได้รับอาหารอย่างเต็มที่ (substrate mycelium) และการเจริญผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการสืบพันธุ์ (aerial mycelium) (Lechevalier and Pine, 1974) ดังภาพ 1 ในระยะแรกๆ เส้นใยเหนือผิวอาหารเป็นสีขาวและเมื่อเริ่มมีการสร้างสปอร์จะเปลี่ยนเป็นสีต่างๆ โดยสี

ของเส้นใยใต้ผิวและเหนือผิวอาหารที่เกิดจากบางชนิดมีการผลิตรงควัตถุ (pigment) ที่มีความละลายน้ำและแพร่เข้ามาในอาหาร เช่น เหลือง แดง น้ำตาล น้ำเงิน (Rudd, 1978; Lambert et al., 1967; Lambert, 1989; Hopwood, 1999) เป็นต้น นอกจากความสามารถในการผลิตสารรงควัตถุแล้ว แอคติโนแบคทีเรียยังมีบทบาทอื่นในระบบนิเวศ รวมไปถึงการย่อยสลายสารอินทรีย์ทุกประเภทและความหลากหลายของคลัสเตอร์ยีนสังเคราะห์ทางชีวภาพ ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงทำให้แอคติโนแบคทีเรียเป็นแหล่งที่สำคัญในการศึกษาสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Hassana et al., 2017)



ภาพ 1 วงจรชีวิตของแอคติโนแบคทีเรีย

ที่มา: ดัดแปลงภาพจาก Barka et al., 2016

#### 4.2 ชนิดรงควัตถุของแอคติโนแบคทีเรีย

นอกจากความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะแล้ว ยังพบว่าแอคติโนแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตรงควัตถุ ซึ่งรงควัตถุเป็นสารประกอบที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสีย้อม อุตสาหกรรมการพิมพ์ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมยาและผลิตเครื่องสำอาง เป็นต้น (Raisainen et al., 2002; Lee et al., 2006)

ความหลากหลายของการผลิตสีของแอกติโนแบคทีเรียที่เรื้อรังอาศัยปัจจัยต่างๆ เช่น ส่วนประกอบของอาหาร ค่า pH การเกิดออกซิเดชัน และอุณหภูมิ (Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009)

#### 4.2.1 Prodigiosins

Prodigiosin เป็นรงควัตถุ tripyrrole สีแดง ที่ได้รับการยอมรับว่ามีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ โดยจากการศึกษาของ Han et al. (1998) พบว่า แบคทีเรีย เช่น *Serratia marcescens* รวมถึงแอกติโนแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* ได้ผลิตรงควัตถุสีแดง ที่เรียกว่า prodigiosins สารชนิดนี้เป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์ซึ่งได้นำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมหลายกลุ่ม เช่น สารกันบูดในอาหาร และเครื่องสำอาง รวมไปถึงด้านการแพทย์เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Poongodi et al., 2012)

#### 4.2.2 Melanins

แอกติโนแบคทีเรียสามารถผลิตรงควัตถุสีน้ำตาลเข้มเรียกว่า เมลานินหรือเม็ดสีเมลานิน ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีเมอร์ชนิดหนึ่ง เกิดจากปฏิกิริยา oxidative polymerization ของ indolic หรือ phenolic (Manivasagan et al., 2013b) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการปรับปรุงในกลไกการดำรงชีวิตของแอกติโนแบคทีเรีย ป้องกันไม่ให้เกิดความเครียดจากสภาพแวดล้อมที่มีอนุมูลอิสระสูง (Manivasagan et al., 2013a; Sivaperumal et al., 2014) ในทางชีววิทยา เมลานินมีคุณสมบัติทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ต้านอนุมูลอิสระ (Strohl, 2004) ต้านจุลชีพ (Dastager et al., 2006) ต้านเซลล์มะเร็ง (Chaudhary et al., 2013) และต้านไวรัส (Montefiori et al., 1991) เป็นต้น ด้วยคุณสมบัติที่หลากหลาย ทำให้เมลานินถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในด้านเภสัชวิทยาและเครื่องสำอาง (Manivasagan et al., 2013)

#### 4.2.3 Actinorhodins

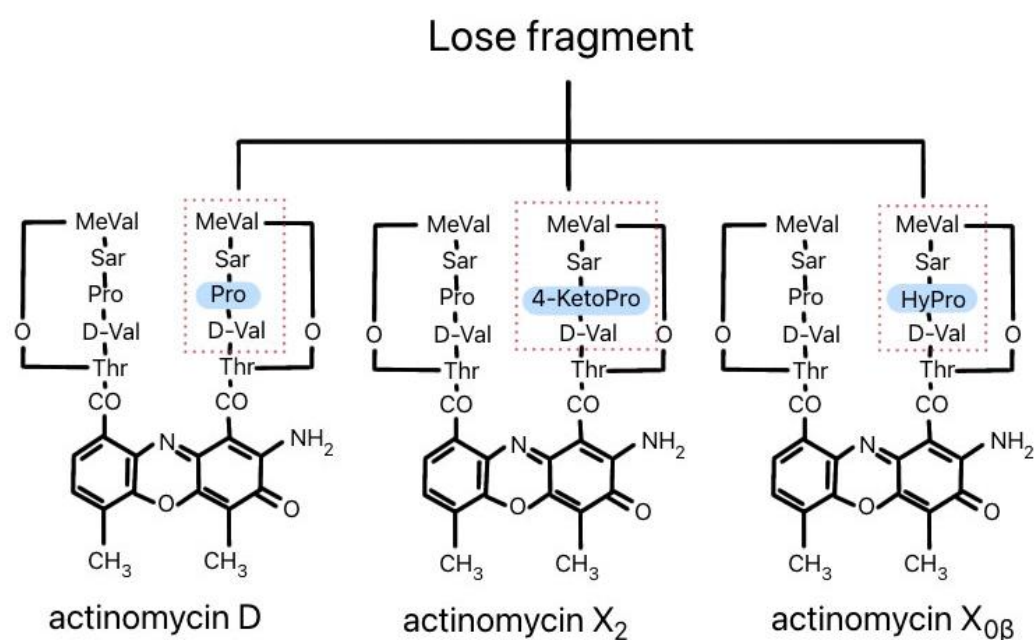
Actinorhodins เป็นรงควัตถุสีน้ำเงินที่ผลิตโดย *Streptomyces coelicolor* ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม benzoisochromanequinone มีโครงสร้างหลักเป็น hybrid aromatic polyketides และถูกใช้เป็นตัวแบบเพื่อศึกษาการผลิตยาปฏิชีวนะในระดับยีน โดยได้มีการพัฒนาให้เกิดการกลายพันธุ์ในกระบวนการสังเคราะห์สาร (Hopwood et al., 1995) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าสาร actinorhodins มีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ได้ (Taher et al., 2020)

#### 4.2.4 Actinomycins

Actinomycins เป็นยาปฏิชีวนะที่ถูกแยกได้จาก *Streptomyces antibioticus* เป็นครั้งแรก โดย Waksman และ Woodruff ในปี ค.ศ.1940 ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้กันทั่วไปในการรักษามะเร็ง เช่น childhood rhabdomyosarcoma และ Wilms' tumor (Waksman and Woodruff, 1940) Actinomycins มีโครงสร้างทางเคมีแบบ bicyclic chromopeptide lactones



ร่วมกับ chromophoric phenoxazinone dicarboxylic acid ซึ่งมี pentapeptide lactones สองตัวที่มาจาก nonribosomal (Hollstein, 1974) (ภาพ 2) จากการรายงาน พบว่า จีโนม *Streptomyces* สามารถผลิตสาร Actinomycins มากกว่า 41 อนุพันธ์ (Singh et al., 2010) เช่น actinomycin C<sub>2</sub>, D, I และ X<sub>2</sub> (Kumar et al., 2014; Sharma and Manhas, 2019) นอกจากนี้ actinomycin ยังมีคุณสมบัติเป็นสีย้อมที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เรียกว่าได้ โดยจากงานวิจัยของ Chen et al. (2021) ได้ทำการศึกษาสีย้อมจากสาร actinomycin X<sub>2</sub> ในผ้าไหมและศึกษาคุณสมบัติของสีย้อม พบว่า สาร actinomycin X<sub>2</sub> มีคุณสมบัติเป็นสีย้อมที่ดีและมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม



ภาพ 2 โครงสร้างของ actinomycin D, X<sub>2</sub> และ X<sub>0β</sub>

ที่มา: ดัดแปลงภาพจาก Mauger et al., 1981

#### 4.3 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแอคติโนแบคทีเรีย

แอคติโนแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อมนุษย์ในด้านการแพทย์และการเกษตร เนื่องจากมีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิที่หลากหลาย เช่น สารปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง สารต้านเนื้องอก สารต้านภูมิคุ้มกัน เครื่องสำอาง วิตามินสารอาหารและเอนไซม์ รวมถึงสารออกฤทธิ์ต่างๆ ที่ใช้ในการเกษตร (Valli et al., 2012; Imada, 2005; Atta et al., 2009) โดยสารปฏิชีวนะ ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์พบว่า แยกได้จากแอคติโนแบคทีเรีย (Jackson et al., 2018) นอกจากนี้

มีการรายงานว่ามีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural products) มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ พบได้จากการแยกและศึกษาโครงสร้างจากสกุล *Streptomyces* (Hassana et al., 2017) สารปฏิชีวนะที่ค้นพบในช่วงแรกของการศึกษาและเป็นที่รู้จักเป็นอย่างดีในวงการวิทยาศาสตร์ ได้แก่ streptomycin, streptothricin และ actinomycins เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้พัฒนาเป็นยาเพื่อรักษาโรคทั้งในระดับคลินิกและจำหน่ายเชิงการค้าทั่วโลก

#### 4.4 การสกัดสารและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารจากแอคติโนแบคทีเรีย

เนื่องจากแอคติโนแบคทีเรียมีคุณสมบัติในการผลิตสารทุติยภูมิที่หลากหลาย โดยสารทุติยภูมิเหล่านี้จะถูกนิยมนำมาสกัดในสารละลายอินทรีย์เพื่อระบุและหาปริมาณสารที่แอคติโนแบคทีเรียสามารถผลิตได้ (Pinu et al., 2017) โดยตัวทำละลายที่มีขั้ว (เช่น เมทานอลหรือเอทานอล) และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (เช่น เอทิลอะซิเตท เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม) ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการสกัดสารทุติยภูมิของแอคติโนแบคทีเรีย ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์มีความสามารถในการทำให้ผนังเซลล์โปรตีนและลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูพรุนทำให้สารทุติยภูมิที่อยู่ภายในเซลล์ถูกปล่อยออกมาทางรูพรุนและสกัดลงในตัวทำละลายอินทรีย์ (Villas-Boas et al., 2007; Boas et al., 2012) ซึ่งการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดจากแอคติโนแบคทีเรีย เทคนิค Bioassay-guided fractionation เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาโปรไฟล์สารและคัดกรองสารสกัดที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยขั้นตอนการแยกส่วนสามารถคัดกรองและทำให้สารสกัดมีความบริสุทธิ์มากขึ้น (Abdallah et al., 2021) และวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ได้โดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น NMR spectroscopy, thin layer chromatography (TLC) และ mass spectrometry เป็นต้น จากการศึกษาของ Liu et al. ในปี ค.ศ. 2010 ได้มีการศึกษาสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากแอคติโนแบคทีเรียด้วยวิธี high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC/QTOF MS/MS) พบสารเมแทบอลิต์ 3 ชนิดที่มีโครงสร้างสารหลักที่เหมือนกัน แต่เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วย QTOF MS/MS และเทคนิค in-source collision-induced dissociation (in-source CID) ที่แสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบเปปไทด์ที่หลงเหลือจากการแตกตัวของไอออน สามารถจำแนกสารเมแทบอลิต์ที่ได้ คือ actinomycin D, actinomycin V และ actinomycin X<sub>0β</sub>

ในการศึกษาดังที่กล่าวมาทั้งหมดนี้แล้วนั้น แสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียเป็นแหล่งรังควัตถุธรรมชาติที่มีความสามารถในการผลิตสารต้านแบคทีเรียและมีโอกาสในการพัฒนาเป็นต้นแบบรังควัตถุที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในอุตสาหกรรมสิ่งทอต่อไปในอนาคตได้

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

##### กลุ่มตัวอย่าง

ดินบริเวณรอบรากพืชดอก 5 ชนิด จากสวนพฤกษศาสตร์ บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริ จังหวัดพิษณุโลก ได้แก่

1. จวง (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn.) พิกัด 17°61'67"N100°90'66"E
2. จำปีป่า (*Magnolia baillonii* Pierre) ตำแหน่งที่ 1 พิกัด 17°61'66"N100°90'52"E และตำแหน่งที่ 2 พิกัด 17°61'65"N100°90'51"E
3. จำปีหลวง (*Magnolia rajaniana* (Craib) Figlar) พิกัด 17°60'96"N100°90'30"E
4. สนอินเดีย (*Grevillea pteridifolia* Knight) พิกัด 17°60'97"N100°90'44"E
5. สร้อยสยาม (*Phanera siamensis* (K.Larsen & S.S.Larsen) Mackinder & R. Clark) พิกัด 17°60'97"N100°90'44"E

##### จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Escherichia coli* TISTR 527
2. *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501
3. *Staphylococcus aureus* DMST 4745
4. *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518

##### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

###### เครื่องมือ

- 1) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave)
- 2) เครื่องผสมสาร (Vortex)
- 3) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 4) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision balance)
- 5) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 6) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

- 7) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 8) เครื่องกวนสารละลาย (Hot plate stirrer)
- 9) ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet)
- 10) เครื่องเขย่า (Shaker)
- 11) กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (Compound light microscope)
- 12) กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereoscopic microscope)
- 13) ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 14) ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ (Incubator)
- 15) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator, BUCHI)
- 16) ตู้ดูดควันไอสารเคมี (Fume hood)
- 17) เครื่องวัดสีแบบพกพา (Portable Colorimeter)
- 18) หม้อหุงข้าว (Rice cooker)
- 19) TLC viewing cabinet
- 20) เครื่องล้างความถี่สูง (Sonicator bath)

#### อุปกรณ์

- 1) หลวงถ่ายเชื้อ (Inoculating loop)
- 2) ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner stainless)
- 3) ไฟแช็ก (Lighter)
- 4) ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)
- 5) ถุงพลาสติก (Plastic bag)
- 6) หนังยาง (Rubber band)
- 7) ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
- 8) สำลี (Cotton wool)
- 9) กระดาษกรอง (Filter paper, Whatman™)
- 10) จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 11) หลอดทดลอง (Test tube)
- 12) แผงแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
- 13) ปิเปต (Pipette)

- 14) กระบอกตวง (Cylinder)
- 15) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 16) ปีกเกอร์ (Beaker)
- 17) แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
- 18) กรวยกรอง (Glass funnel)
- 19) ขวดทำระเหยทรงลูกแพร์ (Evaporating flask)
- 20) ขวดแก้วดูแรน (Duran bottle)
- 21) แผ่นดิสก์ (Paper disc, Whatman™)
- 22) แผ่น TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> (Thin layer chromatography, Merck KGaA®, Germany)
- 23) พีทมอส (Peat moss)
- 24) กรรไกร (Cutting)
- 25) ไม้พันสำลี (Cotton swab)
- 26) คอลัมน์ (Column)
- 27) ไชริงค์ขนาด 1 มิลลิลิตร
- 28) TLC developing tank
- 29) CA Syringe filters (13 mm, 0.2 µm, VertiClean™)
- 30) เส้นใยไหม (Silk)

#### สารเคมี

- 1) เอทิล แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (Ethyl alcohol 95%, เคมีภัณฑ์)
- 2) เมทานอล (Methanol; Commercial grade; Analytical reagent grade)
- 3) กรดไฮโดรคลอริก (HCl, QREC Chemicals)
- 4) เอทิล อะซิเตท (Ethyl acetate; Commercial, ACI Labscan®)
- 5) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH; Analytical reagent grade, Kemaus)
- 6) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane; Analytical reagent grade, ACI Labscan®)
- 7) คลอโรฟอร์ม (Chloroform; Analytical reagent grade, ACI Labscan®)
- 8) อะซิโตน (Acetone; ; Analytical reagent grade, ACI Labscan®)

- 9) ซิลิกาเจล 60 (ขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร; Merck KGaA®, Germany)
- 10) Cycloheximide
- 11) Nalidixic acid
- 12) Streptomycin
- 13) Chloramphenicol
- 14) Anisaldehyde – sulfuric acid

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) อาหาร Actinomycetes isolation agar (AIA)
- 2) อาหาร Starch casein agar (SCA)
- 3) อาหาร Peatmoss extract agar
- 4) อาหาร Oatmeal agar (OMA)
- 5) อาหาร Actinomycetes isolation agar (AIA)
- 5) อาหาร Nutrient broth (NB, Himedia®)
- 6) อาหาร Yeast extract-malt extract agar (ISP2)
- 7) ปลายข้าว (Broken rice)
- 8) รำสกัดน้ำมัน (Defatted rice bran)
- 9) เมล็ดข้าวพันธุ์เสาไห้
- 10) ผงวุ้น

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### 1. การคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชดอกความลึกประมาณ 10-20 เซนติเมตร มาผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ได้จากบริเวณรอบรากพืชอย่างละ 10 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที และเตรียมสารละลายด้วยวิธี serial dilution method

ในการคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรีย ได้ทำการคัดเลือกบนอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ 1) อาหาร peat moss extract agar 2) อาหาร starch casein agar (SCA) 3) อาหาร oatmeal agar (OMA) และ 4) actinomycetes isolation agar (AIA) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กรรมวิธี คือ กรรมวิธี

ที่ 1 เป็นกรรมวิธีที่มีส่วนประกอบของสารปฏิชีวนะ คือ 1) อาหาร peat moss extract agar ที่มีส่วนประกอบของสารปฏิชีวนะ cycloheximide (ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ nalidixic acid (ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 2) อาหาร starch casein agar (SCA) ที่มีส่วนประกอบของสารปฏิชีวนะ cycloheximide (ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 3) อาหาร oatmeal agar (OMA) และ 4) actinomycetes isolation agar (AIA) ที่มีส่วนประกอบของสารปฏิชีวนะ cycloheximide (ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ nalidixic acid (ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Lee et al., 2014; Heng, 2008; Hamaki et al., 2005; Labeda and Shearer, 1990) และกรรมวิธีที่ 2 เป็นกรรมวิธีที่ไม่มีส่วนประกอบของสารปฏิชีวนะ

จากนั้นนำสารละลายของดินตัวอย่างที่เตรียมไว้ให้ได้ความเจือจางเท่ากับ  $10^{-1}$  -  $10^{-4}$  มาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารและบ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการสังเกตลักษณะของแอกติโนแบคทีเรียที่ปรากฏและขีด (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project-2 (ISP2) medium

## 2. การผลิตตรงควัตถุจากแอกติโนแบคทีเรียในอาหารแข็ง

### 2.1 การคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตตรงควัตถุบนเมล็ดข้าวเส้าให้

นำแอกติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 194 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนเมล็ดข้าว โดยทำการซังเมล็ดข้าวที่หุงกึ่งสุกกึ่งดิบน้ำหนัก 3 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 18X150 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเจาะชั้นวันที่มีแอกติโนแบคทีเรียอายุ 7 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จำนวน 3-4 ชั้น ลงบนเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตตรงควัตถุได้จะนำไปเพิ่มปริมาณบนปลายข้าวต่อไป

### 2.2 การผลิตตรงควัตถุจากแอกติโนแบคทีเรียบนปลายข้าว

ในการทดลองนี้ได้นำแอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตตรงควัตถุบนเมล็ดข้าวจำนวน 44 ไอโซเลตมาเลี้ยงบนปลายข้าวที่ได้จากร้านขายอาหารสัตว์ โดยนำปลายข้าวมาหุงให้มีลักษณะกึ่งสุกกึ่งดิบและซังน้ำหนัก 250 กรัม ลงในขวดชมพูขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการเตรียมหัวเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย โดย

เลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นปิเปตหัวเชื้อแอกติโนแบคทีเรีย (10 เปอร์เซ็นต์ (w/v)) ลงบนปลายข้าวที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าวให้นำตัวอย่างไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและบดให้ละเอียด

### 2.3 การผลิตตรงควัตถุจากแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารรำสกัดน้ำมัน

ผลจากการคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีที่สุดในห้องข้อที่ 2.5.2 จะถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารรำสกัดน้ำมัน โดยซึ่งผงรำสกัดน้ำมันที่ฆ่าเชื้อน้ำหนัก 30 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการกรองแยกส่วนแล้วนำส่วนของของเหลวที่ได้จากการกรองไปปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร pH 7 แล้วเติมผงขุ่นในอัตราส่วน 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปิเปตหัวเชื้อแอกติโนแบคทีเรียที่ทำการเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว ISP2 เป็นเวลา 3 วัน ลงบนอาหารรำสกัดน้ำมันที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตและบันทึกผลการทดลอง

### 2.4 การผลิตตรงควัตถุจากแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารรำสกัดน้ำมันผสมปลายข้าว

ผลจากการคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีที่สุดในห้องข้อที่ 2.6 จะถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารรำสกัดน้ำมันผสมปลายข้าว โดยทำการหุงปลายข้าวให้มีลักษณะกึ่งสุกกึ่งดิบ จากนั้นนำปลายข้าวที่หุงแล้วผสมกับผงรำสกัดน้ำมันที่ผ่านการฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1:1 (w/w) ให้น้ำหนัก 200 กรัม แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดำเนินการตามหัวข้อที่ 2.2 ที่ระบุไว้ข้างต้น ทำการเติมเอทิลอะซิเตทลงในตัวอย่างในอัตราส่วน 1:2 (w/v) และทำการแช่ไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง โดยทำการกวนทุกๆ 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองสารด้วยสำลีเพื่อนำส่วนสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งพร้อมทั้งสังเกตและบันทึกผลการทดลอง

### 2.5 วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย

#### 2.5.1 การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

ทำการเติมเอทิลอะซิเตทลงในตัวอย่างปลายข้าวที่บดละเอียด (หัวข้อที่ 2.2) ในอัตราส่วน 1:2 (w/v) และทำการแช่ไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง โดยทำการกวนทุกๆ 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองสารด้วยกระดาษกรองเพื่อนำส่วนสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง บันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบและทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย



### 2.5.2 การสกัดแบบลำดับส่วน (sequential extraction)

นำแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลตที่ได้จากหัวข้อที่ 2.5.1 มาทำการแช่สกัดด้วยเทคนิคการสกัดแบบลำดับส่วน โดยใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ เอทิลอะซิเตท เมทานอล เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในอัตราส่วน 1:2 (w/v) โดยการสกัดแต่ละรอบจะทำการแช่ไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง โดยทำการกวนทุกๆ 1 ชั่วโมง ทำการกรองสารด้วยกระดาษกรองเพื่อนำส่วนสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส จากนั้น นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบที่ได้ (% yield) ตามสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัด (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของปลายข้าวที่ใช้ในการสกัด (กรัม)}}$$

### 2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิดด้วยวิธี paper disc diffusion

method

เตรียมจานอาหารเชื้อทดสอบ (bioassay plate) โดยการนำแบคทีเรียเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) วัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ให้ได้ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.1 จะทำให้ได้สารแขวนลอยของแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น ดังนี้ *Escherichia coli* TISTR 527 (จำนวนเซลล์ประมาณ  $1.74 \times 10^5$  CFU/ml), *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501 (จำนวนเซลล์ประมาณ  $2.96 \times 10^5$  CFU/ml), *Staphylococcus aureus* DMST 4745 (จำนวนเซลล์ประมาณ  $7.05 \times 10^6$  CFU/ml) และ *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518 (จำนวนเซลล์ประมาณ  $1.70 \times 10^7$  CFU/ml) จากนั้น ปิเปตเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนอาหาร NA และนำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง NA ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นทำการเตรียมแผ่นดิสก์สำหรับทดสอบ โดยปิเปตสารสกัดหยาบปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์) หยดลงบนแผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร โดยมี chloramphenicol (ความเข้มข้นเท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์) เป็นชุดควบคุม (Abebaw et al., 2018) จากนั้น ผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นดิสก์วางบนจานอาหารเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติสำเร็จรูป โดยไอโซเลตที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีที่สุด

(หัวข้อที่ 2.5.2) จะถูกนำไปเลี้ยงบนอาหารร่ำกัดน้ำมันและร่ำกัดน้ำมันผสมปลายข้าวเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารทางเลือกทดแทนสำหรับผลิตตรงควัดเพื่อเพิ่มปริมาณของแอกติโนแบคทีเรียต่อไป

### 3. การจำแนกชนิดของแอกติโนแบคทีเรีย

#### 3.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำแอกติโนแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จำนวน 8 ไอโซเลต ที่ได้จากหัวข้อที่ 2.5.2 มาซิตลากบนจานอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นสังเกตลักษณะโคโลนีโดยการส่องภายใต้กล้องสตอริโอแล้วบันทึกภาพภายใต้กล้อง

#### 3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรีย

จำแนกชนิดของแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต (หัวข้อที่ 2.5.2) ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen (ประเทศเกาหลีใต้) ในการศึกษาชิ้น เริ่มต้นจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16S rRNA ตามวิธีการของ Jumpathong et al. (2019) โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer 1 คู่ 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' และ 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' ซึ่งมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (2) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำทั้งหมดจำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) และระบุสายพันธุ์ของแอกติโนแบคทีเรียที่ศึกษา ทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 11 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor joining (NJ) จากนั้นทำการส่งตัวอย่างแอกติโนแบคทีเรียไปฝากเก็บรักษาที่ศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย (Thailand Bioresource Research Center; TBRC) และรับรหัสฝาก (รหัส TBRC)

### 4. การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแอกติโนแบคทีเรีย

#### 4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบของแอกติโนแบคทีเรีย

ทำการเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบของแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม มาละลายใน dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้น นำตัวอย่างไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อได้ผิวหนังของหนูชนิด L929 ด้วยวิธี MTT assay ที่

ความเข้มข้นเท่ากับ 0.008, 0.016, 0.032, 0.064 และ 0.128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการของ Sriwiryajan et al. (2014) โดยมีชุดควบคุมคือ Doxorubicin ที่ความเข้มข้น  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.402 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 4.2 การแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 3 เซนติเมตร ที่บรรจุซิลิกาเจล 60 สูง 33.5 เซนติเมตร เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทน้ำหนัก 3.00 กรัม มาละลายด้วยเมทานอลในปริมาตร 5 มิลลิลิตร และทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล 60 ข้างต้น โดยมีเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (0:100–100:0 v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำการเก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ โดยการเปลี่ยนหลอดเก็บสารละลายทุก 10 นาที จากนั้นนำแต่ละส่วนมาจัดแยกกลุ่มด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) สังเกตภายใต้ UV 254 และ 365 นาโนเมตร และทำการฉีดย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde – sulfuric acid จากนั้นทำการรวมกลุ่มสารที่เหมือนกันในแต่ละส่วนแยกย่อย (fractions) เปรียบเทียบแนวโน้มน้ำหนักของสารและ TLC profile เพื่อทำการแยกในคอลัมน์ที่ 2 ทำการบันทึกน้ำหนักสารและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส

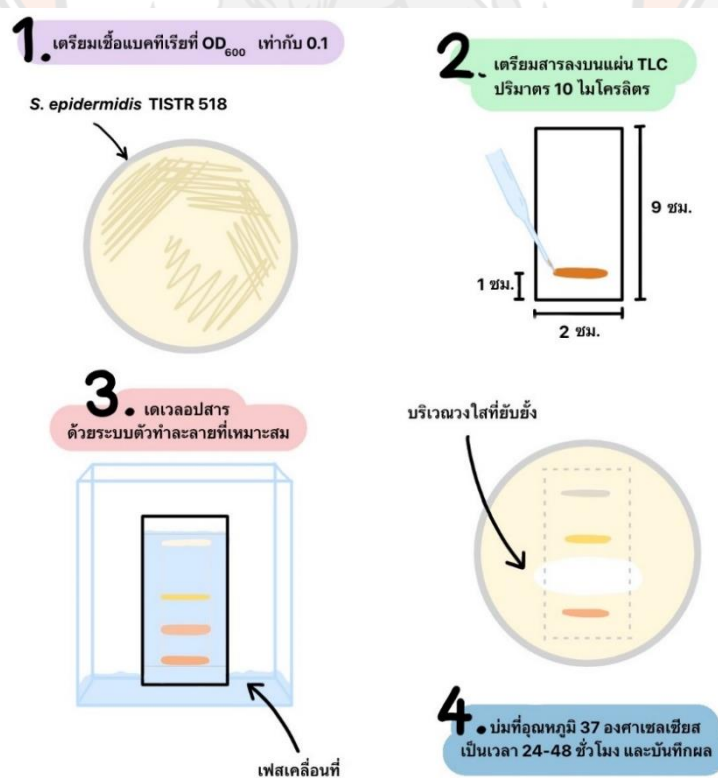
นำสารในกลุ่มที่ 8 ที่ได้จากคอลัมน์ที่ 1 มาทำการแยกสารในคอลัมน์ที่ 2 โดยใช้คอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.5 เซนติเมตร ที่บรรจุซิลิกาเจล 60 สูง 23.5 เซนติเมตร เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) จากนั้นนำสารในกลุ่มที่ 8 น้ำหนัก 500 มิลลิกรัม มาละลายด้วย เมทานอลในปริมาตร 3 มิลลิลิตร และทำการแยกสารด้วยคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล 60 ข้างต้น โดยมีคลอโรฟอร์มต่ออะซิโตน (100:0–0:100 v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำการเก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ โดยการเปลี่ยนหลอดเก็บสารละลายทุก 2 นาที จากนั้นนำแต่ละส่วนมาจัดแยกกลุ่มด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) สังเกตภายใต้ UV 254 และ 365 นาโนเมตร และทำการฉีดย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde – sulfuric acid จากนั้นทำการรวมกลุ่มสารที่เหมือนกันในแต่ละส่วนแยกย่อย (fractions) ทำการบันทึกน้ำหนักสารและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในขั้นตอนต่อไป

#### 5. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค bioautography

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบในการทดลองหัวข้อที่ 2.6 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากแอคติโนแบคทีเรียสามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก โดย

*Staphylococcus epidermidis* TISTR 518 มีความไวต่อสารสกัดหยาบได้ดีกว่า *S. aureus* DMST 4745 จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาในขั้นตอนนี้

เตรียมจานอาหารเชื้อทดสอบ (bioassay plate) โดยวัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ให้ได้ OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.1 (จำนวนเซลล์ประมาณ  $1.70 \times 10^7$  CFU/ml) ปิเปตเชื้อปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร NA และนำไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างสารที่แยกได้จากคอลัมน์ที่ 2 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเตรียมแผ่น TLC ให้มีความยาว 9 เซนติเมตร และความกว้าง 2 เซนติเมตร โดยใช้ pasteur pipette ดูดสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร (น้ำหนักสาร 20 ไมโครกรัม) ลากลงบนแผ่น TLC ให้ห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร และห่างจากขอบด้านซ้ายและขวา 0.5 เซนติเมตร จากนั้นทำการตีเวลอปด้วยเมทานอลต่อโดคลอโรมีเทนและสังเกตภายใต้ UV 254 และ 365 นาโนเมตร เพื่อดูลักษณะการปรากฏแถบสารของสารส่วนแยกย่อยเหล่านั้น จากนั้นสืบแผ่น TLC ดังกล่าววางลงบนจานอาหารที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำเครื่องหมายบนจานอาหารบริเวณตำแหน่งสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC แล้วดึงออก ทำการบ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและบันทึกผลการทดลอง ดังภาพ 3



ภาพ 3 วิธีการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค bioautography

ที่มา: ดัดแปลงภาพจาก Yamaç and Bilgili, 2006

## 6. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยวิธี paper disc diffusion method

ในการศึกษาขั้นตอนนี้ ทำเช่นเดียวกันกับการทดลองหัวข้อที่ 2.6 โดยมีรายละเอียดดังนี้

แบคทีเรีย	<i>Staphylococcus epidermidis</i> TISTR 518 (จำนวนเซลล์ประมาณ $1.70 \times 10^7$ CFU/ml)
อาหาร	nutrient agar (NA)
ชุดทดลอง	ตัวอย่างจากคอลัมน์ที่ 2 จำนวน 37 กลุ่ม (ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์)
ชุดควบคุมบวก	chloramphenicol (ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์) streptomycin (ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์)
ชุดควบคุมลบ	สารละลายคลอโรฟอร์มต่ออะซิโตน (9:1) เมทานอล

บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติสำเร็จรูป

## 7. การศึกษา chemical profile ของตัวอย่างด้วยเทคนิค Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

ในการทดลองนี้ เป็นการศึกษาค่า chemical profile ของตัวอย่างที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งที่ตีที่ 3 อันดับแรกด้วยวิธี paper disc diffusion โดยพิจารณาร่วมกันกับการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค bioautography

เตรียมตัวอย่างสารสกัดให้มีน้ำหนักสาร 10 มิลลิกรัม และละลายด้วยเมทานอล (HPLC grade) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเชิงคุณภาพเบื้องต้นด้วย Agilent 1260 infinity high performance liquid chromatography instrument (Agilent, Waldbonn, Germany) ร่วมกับ 6540 ultrahigh definition accurate mass Q-TOF (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) โดย ESI interface สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ chemical profile ของตัวอย่างมีดังนี้

สภาวะของ LC

- คอลัมน์: phenomenex Luna C-18(2) คอลัมน์ (5 ไมโครเมตร, เส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 150×4.6 มิลลิเมตร) Phenomenex Inc., Torrance, CA).

- เฟสเคลื่อนที่: 0.1 เปอร์เซ็นต์ v/v formic acid ในน้ำ (Solvent A) 0.1 เปอร์เซ็นต์ v/v formic acid ใน acetonitrile (Solvent B)
- ลำดับการชะล้าง: เริ่มจาก 5 - 95 เปอร์เซ็นต์ (Solvent B) เป็นเวลา 30 นาที และทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้น post run 5 นาที
- ปริมาตรที่ฉีด: 5 ไมโครลิตร
- อัตราการไหล: 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที  
ระยะเวลา: 30 นาที

สภาวะของ ESI-MS

- การวิเคราะห์พารามิเตอร์: โหมดไอออนบวก
- ค่า mass: m/z 100–1,700 amu.
- แรงดันไฟฟ้า: +3,500 โวลต์
- อุณหภูมิของแก๊ส: 350 องศาเซลเซียส
- อัตราการไหลของแก๊ส: 10 ลิตรต่อนาที
- แรงดัน: 30 psig
- อัตราของสเปกตรัม: 4 เฮิร์ตซ์
- ค่าพลังงาน: 10 โวลต์, 20 โวลต์ และ 40 V โวลต์
- ชนิดแก๊ส: ไนโตรเจน (UHP)

ทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน จากนั้นนำข้อมูลแมสสเปกตรัมที่ได้และรูปแบบการแตกหักของโมเลกุล (mass fragmentation) ที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลของสารและแปลผลโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานร่วมกับการใช้โปรแกรม MassHunter และข้อมูลงานวิจัยที่เคยมีการรายงานในฐานข้อมูล

## 8. การศึกษาการติดสีรังควัตถุของสารสกัดหยาบ

### 8.1 การศึกษาการติดสีรังควัตถุของสารสกัดหยาบของเส้นใยไหม

นำปลายข้าวที่บดแล้วใส่ภาชนะมาชั่งน้ำหนัก 10 กรัม เทสารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30-50 มิลลิลิตร ลงไปแล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ทำการกรองส่วนใสใส่ขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำตัวอย่างเส้นใยไหมมาต้ม

เพื่อกำจัดไขมันออกประมาณ 20 นาที ตัดเส้นใยไหมยาวเท่ากับ 12 นิ้ว (1 ฟุต) จนได้น้ำหนักเท่ากับ 0.22 กรัม แซ้ในสารละลายที่เตรียมไว้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผึ่งให้แห้ง นำไปย้อมใหม่อีกครั้ง ผึ่งให้แห้งอีกครั้งก่อนนำไปวัดสีด้วยเครื่องวัดสีแบบพกพา (Portable Colorimeter) (นฤมล เกื่อนกุล และ นฤมล หวระลึก, 2560)

## 8.2 การศึกษาการติดสีของวัสดุของสารสกัดหยาบในผ้าไหม

นำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจากไอโซเลต TN183 น้ำหนัก 1.67 กรัม มาละลายด้วยเอทิลอะซิเตทปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำผ้าไหมขนาด A4 (21x29.7 เซนติเมตร) มาต้มเพื่อกำจัดไขมันออกเป็นเวลา 20 นาที และผึ่งให้แห้ง นำผ้าไหมที่เตรียมไว้มาทำการ แซ้ในสารละลายเอทิลอะซิเตท เขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผึ่งให้แห้ง นำไปย้อมใหม่อีกครั้งและผึ่งให้แห้งก่อนนำไปวัดสีด้วยเครื่องวัดสีแบบพกพา

## 9. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative methods) ด้วยวิธี AATCC 147-2011

นำตัวอย่างสิ่งทอที่ย้อมด้วยสารสกัดหยาบจากแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงคุณภาพที่ศูนย์วิเคราะห์ทดสอบสิ่งทอ (สถาบันพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ, กรุงเทพมหานคร) ซึ่งได้มีการปรับใช้ตามวิธีของ AATCC 147-2011 (Antibacterial Activity Assessment of Textile Materials: Parallel Streak Method) (AATCC Test Method 147-2004, 2012) โดยทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) และ *Escherichia coli* (ATCC 25922) ที่เป็นแบคทีเรียมาตรฐานในการทดสอบ นำห้วงถ่ายเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่ทดสอบซิดลงบนอาหาร nutrient agar (NA) ทั้งหมด 5 ซิต โดยมีความยาวของแต่ละเส้นยาวประมาณ 60 มิลลิเมตร ระยะห่างกัน 10 มิลลิเมตร จากนั้นนำผ้าทอธรรมชาติ ขนาด 25x50 มิลลิเมตร ที่ผ่านการย้อมด้วยสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 วางทับเชื้อที่มีการซิดไว้ทั้ง 5 ซิต โดยมีผ้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแต่ไม่ผ่านการย้อมเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบันทึกผลการทดลองโดยวัดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นหน่วยมิลลิเมตร ซึ่งความกว้างเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งคำนวณได้โดยใช้สมการ

$$W = (T-D) / 2$$

โดยที่ W = ความกว้างของบริเวณยับยั้งในหน่วยมิลลิเมตร

T = เส้นผ่านศูนย์กลางรวมของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบและบริเวณยับยั้งในหน่วยมิลลิเมตร

D = เส้นผ่านศูนย์กลางของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบในหน่วยมิลลิเมตร

10. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงปริมาณ (quantitative methods) ด้วยวิธี AATCC 100-2019

นำตัวอย่างสิ่งทอที่ย้อมด้วยสารสกัดหยาดจากแอคติโนแบคทีเรียไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงปริมาณที่ศูนย์วิเคราะห์ทดสอบสิ่งทอ (สถาบันพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ, กรุงเทพมหานคร) โดยได้มีการปรับใช้ตามวิธีของ AATCC 100-2019 (AATCC Test Method 100-2019, 2012) โดยทำการเตรียมผ้าทอธรรมชาติที่ย้อมด้วยสารสกัดหยาด TN183 เปรียบเทียบกับผ้าธรรมชาติที่ผ่านการฆ่าเชื้อแต่ไม่ผ่านการย้อมสีเป็นชุดควบคุม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง  $4.8 \pm 0.1$  เซนติเมตร จากนั้นทำการเตรียมหัวเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) และ *Escherichia coli* (ATCC 25922) ที่เป็นเชื้อมาตรฐานในการทดสอบ จากนั้นนำผ้าที่ย้อมสีด้วยสารสกัดหยาด TN183 ใส่ในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทำการปิเปตเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร  $1.0 \pm 0.1$  มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรีย (% reduction) โดยใช้สูตร

$$R (\%) = (C-A)/C \times 100$$

โดยที่ R = เปอร์เซ็นต์การลดลงของแบคทีเรีย

C = จำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างผ้าที่เป็นชุดควบคุม

A = จำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ



## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 1. การคัดเลือกแอสโคสปอร์ที่เรีย

ในการศึกษาการคัดเลือกแอสโคสปอร์ที่เรียจากดินบริเวณรอบบรอกพืชดอก 5 ชนิด พบว่าสามารถคัดเลือกแอสโคสปอร์ที่เรียได้ทั้งหมด 194 ไอโซเลต โดยจากตัวอย่างดินบริเวณรอบบรอกต้นจำปีหลวงสามารถคัดเลือกแอสโคสปอร์ที่เรียมากที่สุดจำนวน 73 ไอโซเลต รองลงมาคือจากตัวอย่างดินบริเวณรอบบรอกต้นจำปีป่าตำแหน่งที่ 2 จำนวน 30 ไอโซเลต ต้นจวง จำนวน 26 ไอโซเลต ต้นจำปีป่าตำแหน่งที่ 1 จำนวน 24 ไอโซเลต ต้นสนอินเดีย จำนวน 23 ไอโซเลต และต้นสร้อยสยามจำนวน 18 ไอโซเลต ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาอาหารสำหรับคัดเลือกแอสโคสปอร์ที่เรีย พบว่า ในอาหาร starch casein agar (SCA) สามารถแยกแอสโคสปอร์ที่เรียได้มากที่สุด เท่ากับ 81 ไอโซเลต (41.75 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคืออาหาร peat moss extract จำนวน 52 ไอโซเลต (26.80 เปอร์เซ็นต์) อาหาร oatmeal agar (OMA) จำนวน 38 ไอโซเลต (19.59 เปอร์เซ็นต์) และอาหาร actinomycete isolation agar (AIA) จำนวน 23 ไอโซเลต (11.86 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตาราง 2)

ตาราง 2 จำนวนไอโซเลตที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบบรอกพืชชนิดต่างๆ

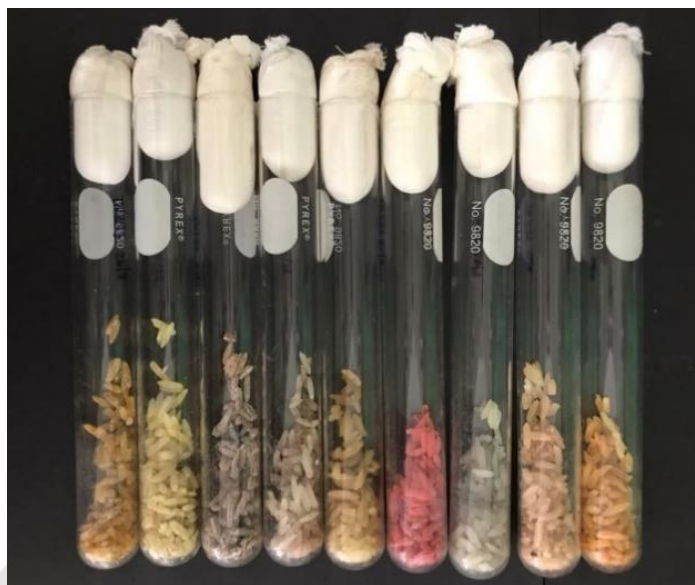
แหล่งของดิน	peat moss extract agar	starch casein agar	oatmeal agar	actinomycete isolation agar	จำนวน ไอโซเลต
จำปีป่า ต้นที่ 1	8	8	6	2	24
จำปีป่า ต้นที่ 2	10	8	10	2	30
สนอินเดีย	6	7	8	2	23
ต้นจวง	10	7	4	5	26
สร้อยสยาม	1	7	4	6	18
จำปีหลวง	17	44	6	6	73
รวม (ไอโซเลต)	52	81	38	23	194

## 2. การผลิตรวงควัตจากแอกติโนแบคทีเรียในอาหารแข็ง

2.1 การคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตรวงควัตอุบนเมล็ดข้าวเส้าให้จากการคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตรวงควัตอุบนเมล็ดข้าวเป็นเวลา 7 วัน จำนวน 194 ไอโซเลต พบว่า สามารถผลิตรวงควัตอุบนเมล็ดข้าวได้จำนวน 44 ไอโซเลต ซึ่งแอกติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากต้นจำปีหลวงสามารถผลิตรวงควัตอุบนเมล็ดข้าวได้มากที่สุดจำนวน 14 ไอโซเลต รองลงมาคือจากดินบริเวณรอบรากต้นจำปีป่าตำแหน่งที่ 1 จำนวน 11 ไอโซเลต ต้นจวงจำนวน 8 ไอโซเลต ต้นจำปีป่าตำแหน่งที่ 2 จำนวน 5 ไอโซเลต ต้นสนอินเดีย จำนวน 4 ไอโซเลต และต้นสร้อยสยาม จำนวน 2 ไอโซเลต โดยสามารถแบ่งกลุ่มสีได้จำนวน 6 กลุ่ม (ภาพ 4) ซึ่งกลุ่มที่ผลิตรวงควัตมีจำนวนไอโซเลตมากที่สุด คือ กลุ่มสีเหลืองจำนวน 15 ไอโซเลต คิดเป็นจำนวน 34.09 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา กลุ่มสีชมพูจำนวน 11 ไอโซเลต กลุ่มสีเทาจำนวน 8 ไอโซเลต กลุ่มสีน้ำตาลจำนวน 6 ไอโซเลต กลุ่มสีม่วงจำนวน 3 ไอโซเลต และกลุ่มสีดำ 1 ไอโซเลต (ตาราง 3)

ตาราง 3 การจัดกลุ่มตามลักษณะสีของแอกติโนแบคทีเรียบนเมล็ดข้าวจำนวน 44 ไอโซเลต

กลุ่มที่	รวงควัต	จำนวนไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์
1	สีเหลือง	15	34.09
2	สีชมพู	11	25
3	สีเทา	8	18.18
4	สีน้ำตาล	6	13.64
5	สีม่วง	3	6.82
6	สีดำ	1	2.27
	รวม	44	100



ภาพ 4 ตัวอย่างกลุ่มรงควัตถุที่ผลิตได้จากแอกติโนแบคทีเรีย

## 2.2 การผลิตรงควัตถุจากแอกติโนแบคทีเรียบนปลายข้าว

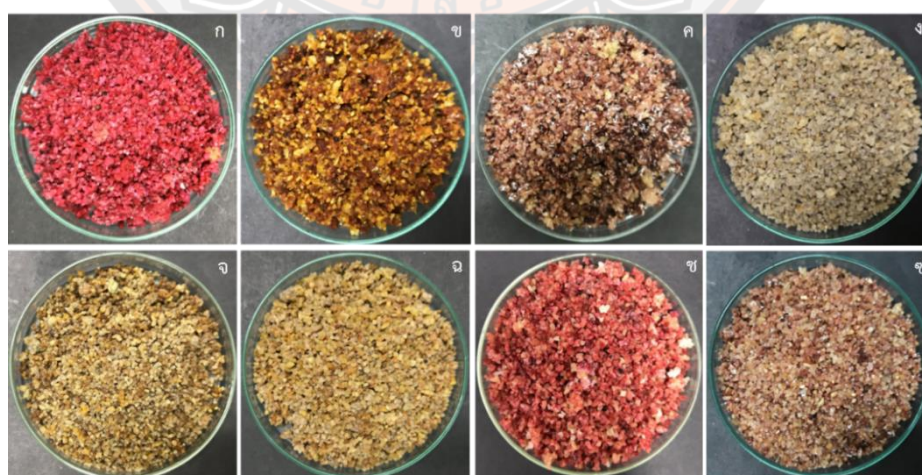
จากการคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตรงควัตถุบนเมล็ดข้าวจำนวน 44 ไอโซเลต เมื่อนำมาเลี้ยงบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน พบว่า สามารถผลิตรงควัตถุบนปลายข้าวได้ทั้งหมด จากนั้นจึงนำแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตบนปลายข้าวไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทเพื่อคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า มีจำนวน 8 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่ ไอโซเลต TN012 ไอโซเลต TN015 ไอโซเลต TN052 ไอโซเลต TN105 ไอโซเลต TN166 ไอโซเลต TN183 ไอโซเลต TN195 และ ไอโซเลต TN215 ดังภาพ 5 และตาราง 4 โดยไอโซเลต TN166 และ TN183 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. epidermidis* (TISTR 518) ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ  $19.23 \pm 0.73$  และ  $18.62 \pm 0.39$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และยังพบว่าไอโซเลต TN183 รองลงมาคือ ไอโซเลต TN183 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* (DMST 4745) ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับไอโซเลตอื่น โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ  $11.33 \pm 1.02$  มิลลิเมตร (ตาราง 4)

ตาราง 4 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ 24 ชั่วโมง ของตัวอย่างสารสกัดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์

ตัวอย่างสารสกัด	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (mm)			
	<i>S. epidermidis</i> (TISTR 518)	<i>S. aureus</i> (DMST 4745)	<i>E. coli</i> (TISTR 527)	<i>P. aeruginosa</i> (DMST 15501)
TN012	8.77±0.86 <sup>c*</sup>	-	-	-
TN015	14.00±0.40 <sup>b</sup>	9.47±0.42 <sup>c</sup>	-	-
TN052	9.05±0.54 <sup>c</sup>	-	-	-
TN105	13.60±0.60 <sup>b</sup>	7.60±0.72 <sup>d</sup>	-	-
TN166	19.23±0.73 <sup>a</sup>	9.62±0.40 <sup>c</sup>	-	-
TN183	18.62±0.39 <sup>a</sup>	11.33±1.02 <sup>b</sup>	-	-
TN195	7.00±0.36 <sup>d</sup>	-	-	-
TN215	8.27±0.37 <sup>c</sup>	-	-	-
chloramphenicol	19.67±0.81 <sup>a</sup>	13.23±1.07 <sup>a</sup>	-	-

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D., n=3) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

\*ค่าเฉลี่ยที่แสดงในแนวตั้งที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a > b > c > d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P < 0.05) ของตัวอย่างสารสกัด



ภาพ 5 รงควัตถุจากแอคติโนแบคทีเรียเป็นเวลา 7 วัน บนปลายข้าวที่อบแล้ว

ก) ไอโซเลต TN012 ข) ไอโซเลต TN015 ค) ไอโซเลต TN052 ง) ไอโซเลต TN105 จ) ไอโซเลต TN166 ฉ) ไอโซเลต TN183 ช) ไอโซเลต TN195 และ ซ) ไอโซเลต TN215

2.3 การผลิตตรงควัตถุจากแอคติโนแบคทีเรียที่มีส่วนผสมของรำสกัดน้ำมันและรำสกัดน้ำมันผสมปลายข้าว

จากการเพิ่มปริมาณไอโซเลต TN183 โดยการเลี้ยงบนอาหารรำสกัดน้ำมันและอาหารรำสกัดน้ำมันผสมปลายข้าว พบว่า แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 มีการเจริญเติบโตบนอาหารทั้ง 2 ชนิดได้ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับปลายข้าว ทั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าอาหารทั้ง 2 ชนิด ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 จึงได้พิจารณาคัดเลือกปลายข้าวมาใช้เป็นอาหารในการเพิ่มปริมาณของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 ในการทดลองต่อไป

2.4 การสกัดแบบลำดับส่วน (sequential extraction)

จากการนำแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 มาเลี้ยงบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน และทำการสกัดแบบลำดับส่วนในอัตราส่วน 1:2 (w/v) โดยเริ่มจากการเติมตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท จากนั้นทำการกรองแล้วเติมสารละลายเมทานอล เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า ปริมาณของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายเมทานอลมีปริมาณสารมากที่สุดเท่ากับ 24.26 กรัม เมื่อเทียบกับสารละลายชนิดอื่น (ตาราง 5)

ตาราง 5 ปริมาณสารสกัดหยาบของแอคติโนแบคทีเรียที่เลี้ยงบนปลายข้าวจากการสกัดแบบลำดับส่วน

สารละลาย	ลักษณะของสาร	สีของสารสกัดหยาบ	% yield
เอทิลอะซิเตท	ของแข็ง	ส้มแดง	0.2620
เมทานอล	สารเหนียว	ส้มแดง	0.9704
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	สารเหนียว	น้ำตาลเข้ม	0.3900
เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์	สารเหนียว	น้ำตาลเข้ม	0.7520

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิดด้วยวิธี paper disc diffusion method

นำตัวอย่างสารสกัดที่ได้จากข้อที่ 4.1 มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากแอคติโนแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์พบว่า สารสกัดจากไอโซเลต TN183 ที่ได้จาก ตัวทำละลายเมทานอลและเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. epidermidis* (TISTR 518) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ  $18.07 \pm 1.01$  และ  $17.63 \pm 1.48$  มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต TN183 ในสารละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ

16.20±0.35 มิลลิเมตร (ตาราง 6 และภาพ 6) อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดจากไอโซเลต TN183 ในสารละลายเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* (DMST 4745) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 11.50±0.87 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตาราง 7 และภาพ 7)



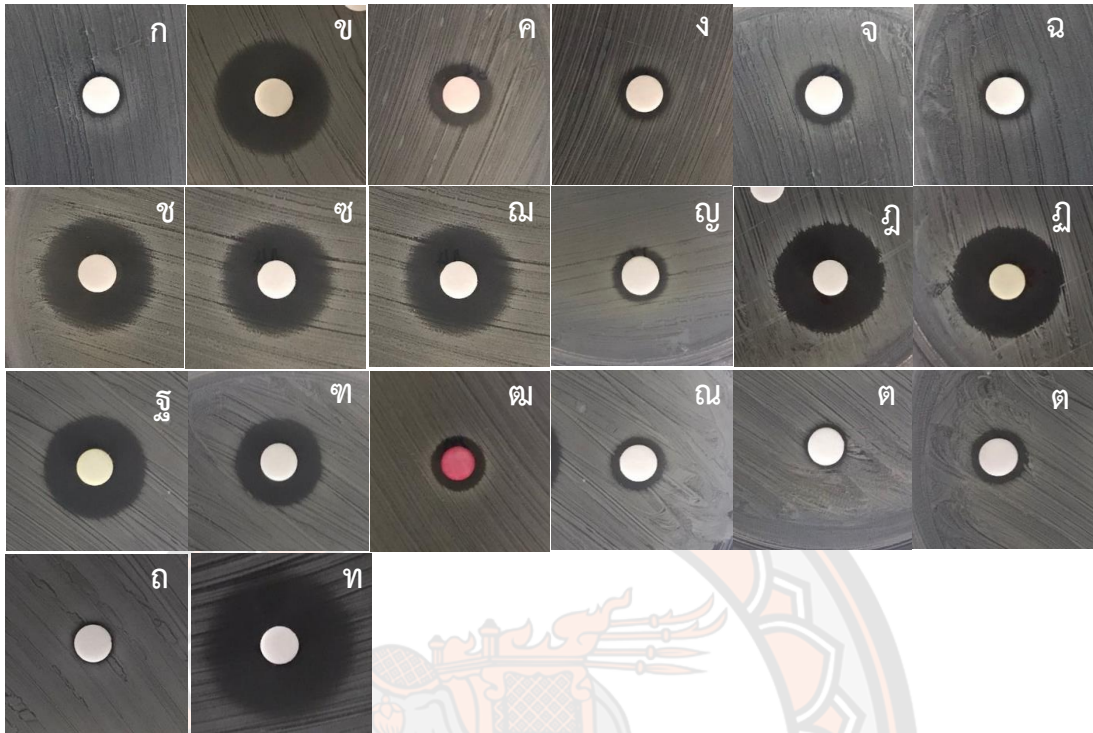
ตาราง 6 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* (TISTR 518) ที่ 24 ชั่วโมง ของตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

ตัวอย่างสารสกัด	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	เอทิลอะซิเตท	เมทานอล	95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล
TN012	0.00±0.00	0.00±0.00	5.90±0.44 <sup>d</sup>
TN015	16.50±1.45 <sup>bc</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00
TN052	9.87±0.32 <sup>deA*</sup>	7.30±0.26 <sup>dc</sup>	8.27±0.25 <sup>cb</sup>
TN105	15.77±0.21 <sup>cA</sup>	15.27±0.75 <sup>cA</sup>	0.00±0.00
TN166	10.77±0.12 <sup>d</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00
TN183	17.63±1.48 <sup>bAB</sup>	18.07±1.01 <sup>bA</sup>	16.20±0.35 <sup>bc</sup>
TN195	9.00±0.30 <sup>ef</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00
TN215	8.27±0.75 <sup>fA</sup>	6.03±0.21 <sup>dB</sup>	8.03±0.45 <sup>cA</sup>
chloramphenicol	21.27±0.58 <sup>a</sup>	21.27±0.58 <sup>a</sup>	21.27±0.58 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D., n=4) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

\*ค่าเฉลี่ยที่แสดงในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P ≤ 0.05) ของตัวอย่างสารสกัด

\*ค่าเฉลี่ยที่แสดงในแถวที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (A> B>C>D) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P ≤ 0.05) ของตัวทำละลาย



ภาพ 6 บริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบต่างๆ จากแอคติโนแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. epidermidis* (TISTR 518) ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์

ก) สารสกัดไอโซเลต TN012 จาก 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ข) สารสกัดไอโซเลต TN015 จาก เอทิลอะซิเตท ค) สารสกัดไอโซเลต TN052 จากเอทิลอะซิเตท ง) สารสกัดไอโซเลต TN052 จาก เมทานอล จ) สารสกัดไอโซเลต TN052 จาก 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ฉ) สารสกัดไอโซเลต TN052 จาก 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ช) สารสกัดไอโซเลต TN105 จากเอทิลอะซิเตท ซ) สารสกัดไอโซเลต TN105 จากเมทานอล ฌ) สารสกัดไอโซเลต TN105 จาก 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ญ) สารสกัดไอโซเลต TN166 จากเอทิลอะซิเตท ฎ) สารสกัดไอโซเลต TN183 จาก เอทิลอะซิเตท ฏ) สารสกัดไอโซเลต TN183 จากเมทานอล ฐ) สารสกัดไอโซเลต TN183 จาก 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ท) สารสกัดไอโซเลต TN183 จาก 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ฒ) สารสกัดไอโซเลต TN195 จากเอทิลอะซิเตท ณ) สารสกัดไอโซเลต TN215 จากเอทิลอะซิเตท ด) สารสกัดไอโซเลต TN215 จากเมทานอล ต) สารสกัดไอโซเลต TN215 จาก 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ถ) สารสกัดไอโซเลต TN215 จาก 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ท) chloramphenicol (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)



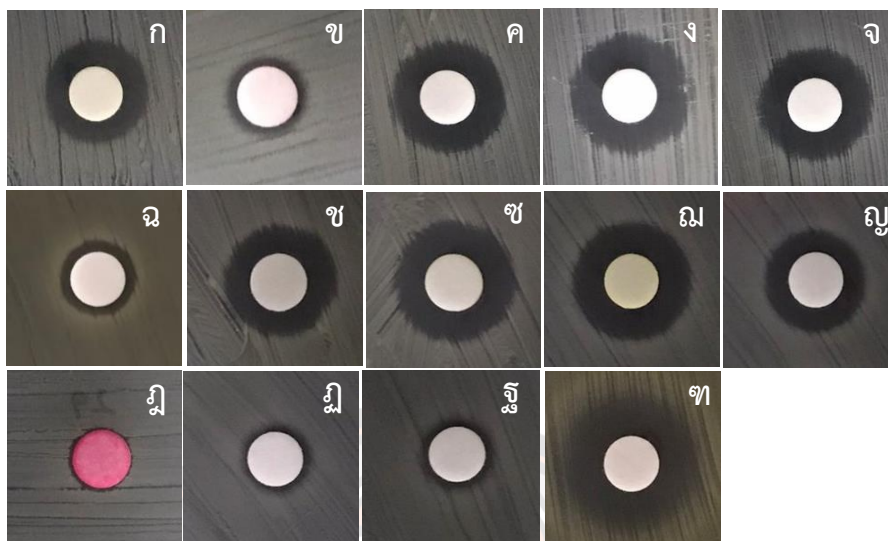
ตาราง 7 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (DMST 4745) ที่ 24 ชั่วโมง ของตัวอย่างสารสกัด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

ตัวอย่างสารสกัด	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	เอทิลอะซิเตท	เมทานอล	95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล
TN012	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
TN015	11.00±1.32 <sup>aA*</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00
TN052	6.60±0.36 <sup>cA</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00
TN105	11.73±0.59 <sup>aA</sup>	11.97±0.95 <sup>aA</sup>	11.47±0.15 <sup>aA</sup>
TN166	8.57±0.85 <sup>bA</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00
TN183	11.50±0.87 <sup>aAB</sup>	11.75±0.68 <sup>aAB</sup>	10.35±1.02 <sup>bb</sup>
TN195	6.30±0.20 <sup>cA</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00
TN215	6.50±0.46 <sup>cA</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00
chloramphenicol	12.27±0.81 <sup>a</sup>	12.27±0.81 <sup>a</sup>	12.27±0.81 <sup>a</sup>

**หมายเหตุ:** ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D., n=4) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

\*ค่าเฉลี่ยที่แสดงในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (a>b>c>d) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P ≤ 0.05) ของตัวอย่างสารสกัด

\*ค่าเฉลี่ยที่แสดงในแถวที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน (A>B>C>D) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P ≤ 0.05) ของตัวทำละลาย



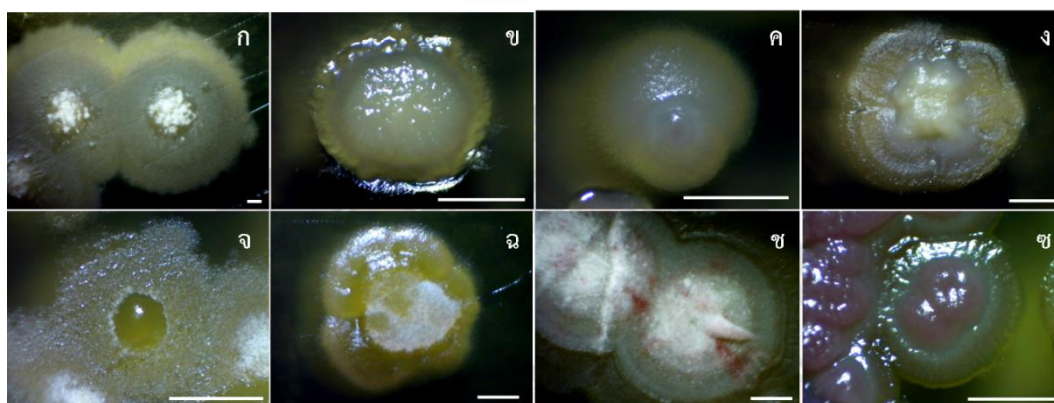
ภาพ 7 บริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบต่างๆ จากแอสติโนแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. aureus* (DMST 4745) ที่ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์

- ก) สารสกัดไอโซเลต TN015 จากเอทิลอะซิเตท ข) สารสกัดไอโซเลต TN052 จากเอทิลอะซิเตท  
 ค) สารสกัดไอโซเลต TN105 จากเอทิลอะซิเตท ง) สารสกัดไอโซเลต TN105 จากเมทานอล จ)  
 สารสกัดไอโซเลต TN105 จาก 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ฉ) สารสกัดไอโซเลต TN166 จาก  
 เอทิลอะซิเตท ช) สารสกัดไอโซเลต TN183 จากเอทิลอะซิเตท ซ) สารสกัดไอโซเลต TN183 จาก  
 เมทานอล ฅ) สารสกัดไอโซเลต TN183 จาก 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ญ) สารสกัดไอโซเลต  
 TN183 จาก 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ฎ) สารสกัดไอโซเลต TN195 จากเอทิลอะซิเตท ฏ) สาร  
 สกัดไอโซเลต TN215 จากเอทิลอะซิเตท ฐ) สารสกัดไอโซเลต TN215 จาก 95 เปอร์เซ็นต์ เอ  
 ทานอล ท) chloramphenicol (30 ไมโครกรัมต่อดิสก์)

### 3. การจัดจำแนกชนิดของแอกติโนแบคทีเรีย

#### 3.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการนำแอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตรงควัตถุบนปลายข้าวและมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมาทำการเลี้ยงบนอาหาร ISP2 medium บ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 วัน เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบผิวหน้าโคโลนีที่แตกต่างกันดังภาพ 8



ภาพ 8 ลักษณะโคโลนีของแอกติโนแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส

ก) ไอโซเลต TN012 อายุเชื้อ 14 วัน, ข) ไอโซเลต TN015 อายุเชื้อ 14 วัน, ค) ไอโซเลต TN052 อายุเชื้อ 14 วัน, ง) ไอโซเลต TN105 อายุเชื้อ 16 วัน, จ) ไอโซเลต TN166 อายุเชื้อ 14 วัน, ฉ) ไอโซเลต TN183 อายุเชื้อ 16 วัน, ช) ไอโซเลต TN195 อายุเชื้อ 16 วัน และ ซ) ไอโซเลต TN215 อายุเชื้อ 14 วัน, บาร์ เท่ากับ 1 มิลลิเมตร

#### 3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรีย

เมื่อจำแนกชนิดของแอกติโนแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* ทั้งหมด 8 ไอโซเลต และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของเชื้อ แอกติโนแบคทีเรียในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่า ไอโซเลต TN012 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces cinnamoneus* (99.72 เปอร์เซ็นต์) ไอโซเลต TN015 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces shenzhenensis* (99.72 เปอร์เซ็นต์) ไอโซเลต TN052 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces aquilus* (99.64 เปอร์เซ็นต์) ไอโซเลต TN105 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces adustus* (99.93 เปอร์เซ็นต์) ไอโซเลต TN166 และไอโซเลต TN183 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces gramineus* (100 เปอร์เซ็นต์) ไอโซเลต TN195 มีความคล้ายคลึงกับ

*Streptomyces netropsis* (99.19 เปอร์เซ็นต์) และไอโซเลต TN215 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces aquilus* (99.64 เปอร์เซ็นต์) (ตาราง 8) นอกจากนี้ พบว่าการสร้างแผนภาพ phylogenetic tree ของไอโซเลต TN183 มีความสัมพันธ์กับ *Streptomyces gramineus* JR-43<sup>T</sup> ดังภาพ 9



ตาราง 8 การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับฐานข้อมูล EzBioCloud

ไอซีเลต	การเพิ่มปริมาณ ยีน 16S rRNA (bps)	เลขทะเบียน TBRC	ชนิดของแอสคิตินแบบคทีเรียที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)*
TN012	1,434	TBRC 15924	<i>Streptomyces cinnamonus</i> strain NBRC 12852 <sup>T</sup>	99.72
TN015	1,459	TBRC 15925	<i>Streptomyces shenzhenensis</i> strain 172115 <sup>T</sup>	99.72
TN052	1,447	TBRC 15926	<i>Streptomyces aquilus</i> strain GGCR-6 <sup>T</sup>	99.64
TN105	1,451	TBRC 15929	<i>Streptomyces adustus</i> strain WH-9 <sup>T</sup>	99.93
TN166	1,471	TBRC 15931	<i>Streptomyces gramineus</i> strain JR-43 <sup>T</sup>	100
TN183	1,433	TBRC 15927	<i>Streptomyces gramineus</i> strain JR-43 <sup>T</sup>	100
TN195	1,366	TBRC 15928	<i>Streptomyces netropsis</i> strain NBRC 3723 <sup>T</sup>	99.19
TN215	1,436	TBRC 15930	<i>Streptomyces aquilus</i> strain GGCR-6 <sup>T</sup>	99.64

หมายเหตุ: \*คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในการเปรียบเทียบกันโดยใช้ BLASTN



ภาพ 9 Phylogenetic tree บริเวณยีน 16S rRNA ของไอโซเลต TN183 วิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor joining (NJ)

โดยกำหนดค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 รอบ, บาร์ เท่ากับ 0.01 แสดงการแทนที่ต่อตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์

#### 4. การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแอกติโนแบคทีเรีย

##### 4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบของแอกติโนแบคทีเรีย

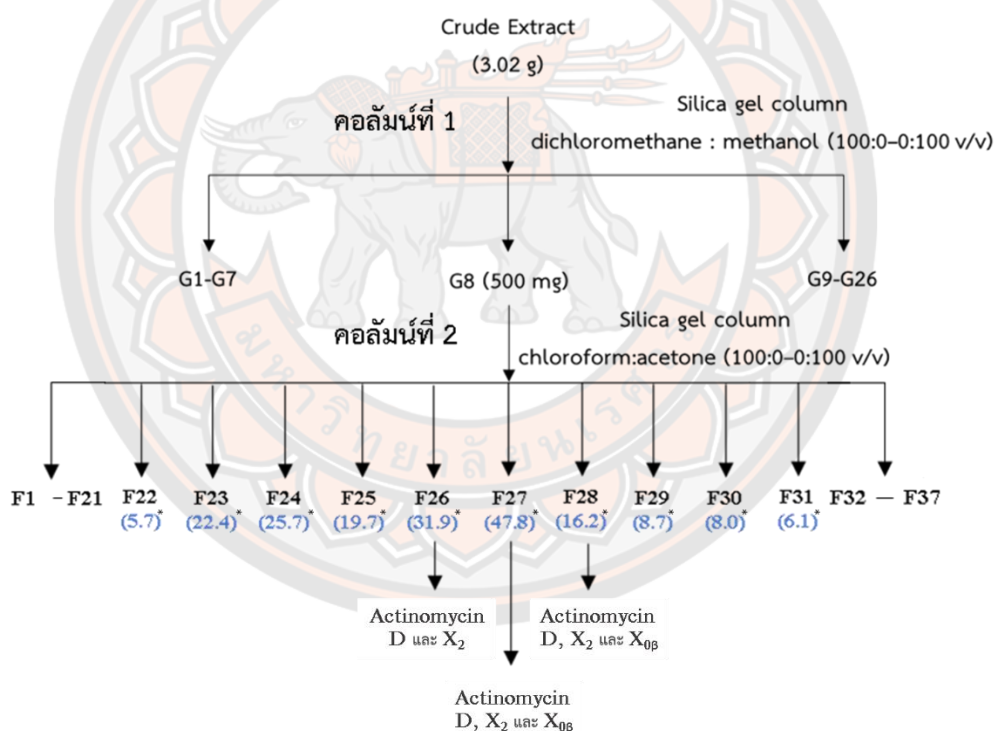
จากการทดสอบสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.008, 0.016, 0.032, 0.064 และ 0.128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์เนื้อเยื่อไตผิวหนังของหนูชนิด L929 พบว่า สารสกัดหยาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อ L929 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.029 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

##### 4.2 การแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

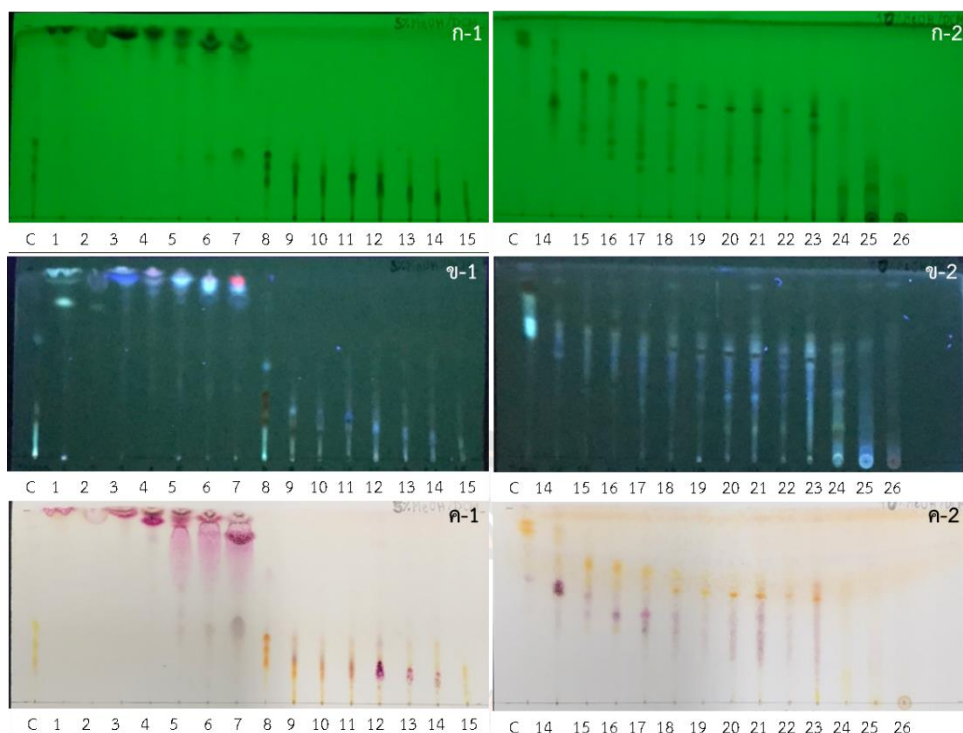
จากผลการศึกษาการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่และตัวทำละลายเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (0:100-100:0 v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่า สามารถแยกสารตัวอย่างได้ทั้งหมด 136 ส่วนแยกย่อย จากนั้นนำมาศึกษา TLC profile ด้วยเทคนิค Thin-layer

chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 1-10 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน พบว่า สามารถรวมแต่ละกลุ่มที่มี TLC profile ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งได้ทั้งหมดจำนวน 26 กลุ่ม

จากนั้นทำการพิจารณากลุ่มสารที่มีน้ำหนักมากที่สุด ได้แก่กลุ่มที่ 8 ปริมาณ 500 มิลลิกรัม มาทำการแยกคอลัมน์ที่ 2 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่และสารละลาย คลอโรฟอร์มต่ออะซิโตน (100:0-0:100 v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ พบว่า สามารถเก็บสารตัวอย่างได้ ทั้งหมด 438 fractions และนำแต่ละกลุ่มมาศึกษา TLC profile ด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 3 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน, 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน, 10 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และ คลอโรฟอร์มต่ออะซิโตน (9:1) สามารถรวมแต่ละกลุ่มที่มี TLC profile ที่คล้ายคลึงกันได้ทั้งหมด จำนวน 37 กลุ่ม โดยมีแผนผังการแยกสารดังภาพ 10



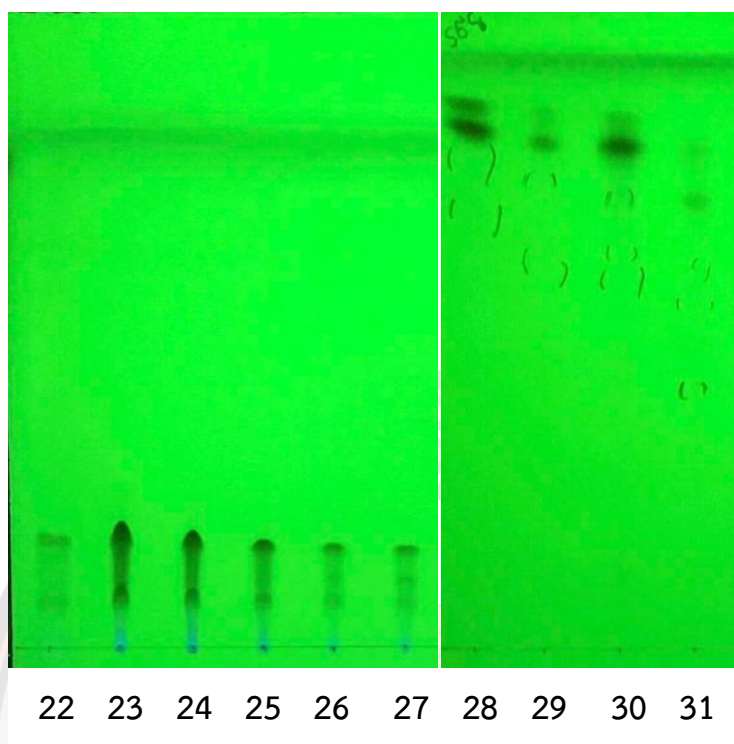
ภาพ 10 แผนผังการแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี  
หมายเหตุ: \* คือน้ำหนักของส่วนแยกย่อยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย



ภาพ 11 TLC profile ของสารสกัด TN183 จากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ทั้งหมด 26 กลุ่ม โดยใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน และ 10 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลต่อไดคลอโรมีเทนเป็นเฟสเคลื่อนที่; (ก-1-ก-2) TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร, (ข-1-ข-2) TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร และ (ค-1-ค-2) TLC profile ภายใต้การฉีดพ่นด้วย สารละลาย anisaldehyde – sulfuric acid

เนื่องจากสารส่วนแยกย่อยที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหรือ active fraction (G8) ที่แยกได้จากคอลัมน์ที่ 1 มีการปรากฏของสารที่หลากหลายและเป็นกลุ่มสารที่คาดว่าเป็นกลุ่ม active fraction จึงเตรียมสารส่วนแยกย่อยในการแยกผ่านคอลัมน์ที่ 2 และทำการตีเวลอปด้วยระบบตัวทำละลาย 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน สามารถจัดกลุ่มสารที่แสดง TLC profile ของสารที่คล้ายกันได้ทั้งหมด 37 กลุ่ม โดยได้มีการพิจารณาสารในส่วนแยกย่อยที่ G8.SG22-G8.SG31 ดังภาพ 12 สำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. epidermidis* TISTR 518 ด้วยเทคนิค bioautography

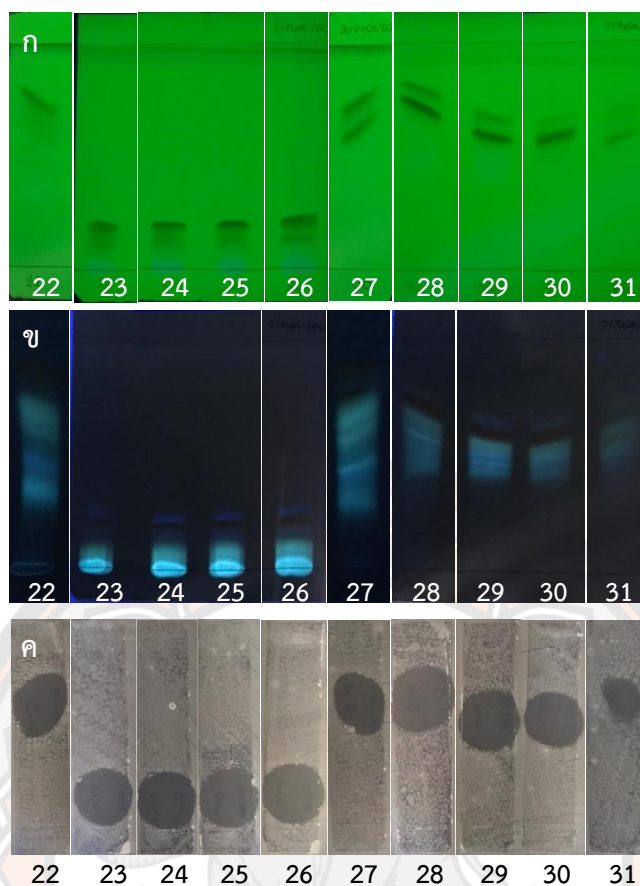




ภาพ 12 TLC profile จากส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 8 ส่วน sub-fraction ที่ G8.SG22-G8.SG31 สำหรับทดสอบการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยเทคนิค bioautography ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร

##### 5. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค bioautography

เตรียมสารส่วนแยกย่อยที่ได้จากการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสาร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น TLC และทำการตีเวลอปด้วยระบบตัวทำละลาย 3, 5, 7 เปอร์เซนต์ เมทานอลต่อไดคลอโรมีเทนต่อเนื่องกัน แสดงให้เห็นว่าสารส่วนแยกย่อยมี TLC profile ดังภาพ 13 (ก) และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยเทคนิค bioautography พบว่า หลังจากทำการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีสารในส่วนแยกย่อยดังภาพ 13 (ค) สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้



ภาพ 13 การแยกสารเมแทบอลิต์จากไอโซเลต TN183 จากส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 8 sub-fraction ที่ G8.SG23-G8.SG26 developed ใน 3 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน จำนวน 3 รอบ, sub-fraction ที่ G8.SG22 และ G8.SG26 developed โดยใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทนจำนวน 1 รอบ, sub-fraction ที่ G8.SG28-G8.SG31 developed ใน 7 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน จำนวน 1 รอบ, (ก) แสดง TLC profile โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ 254 นาโนเมตร, (ข) แสดง TLC profile โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร, (ค) การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวภาพด้วยเทคนิค bioautography จำนวน 10 กลุ่ม ที่แสดงบริเวณยับยั้งที่สามารถยับยั้งได้ (20 ไมโครกรัมต่อจุด)

#### 6. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบด้วยวิธี paper disc diffusion method

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดไอโซเลต TN183 จากส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 8 ที่แยกได้ผ่านคอลัมน์ที่ 2 โดยใช้วิธี paper disc diffusion method พบว่า หลังจากทำการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง sub-fraction กลุ่มที่ 28 (G8.SG28) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* (TISTR 518) มากที่สุดเท่ากับ  $20.03 \pm 0.60$  มิลลิเมตร รองลงมาคือ sub-fraction

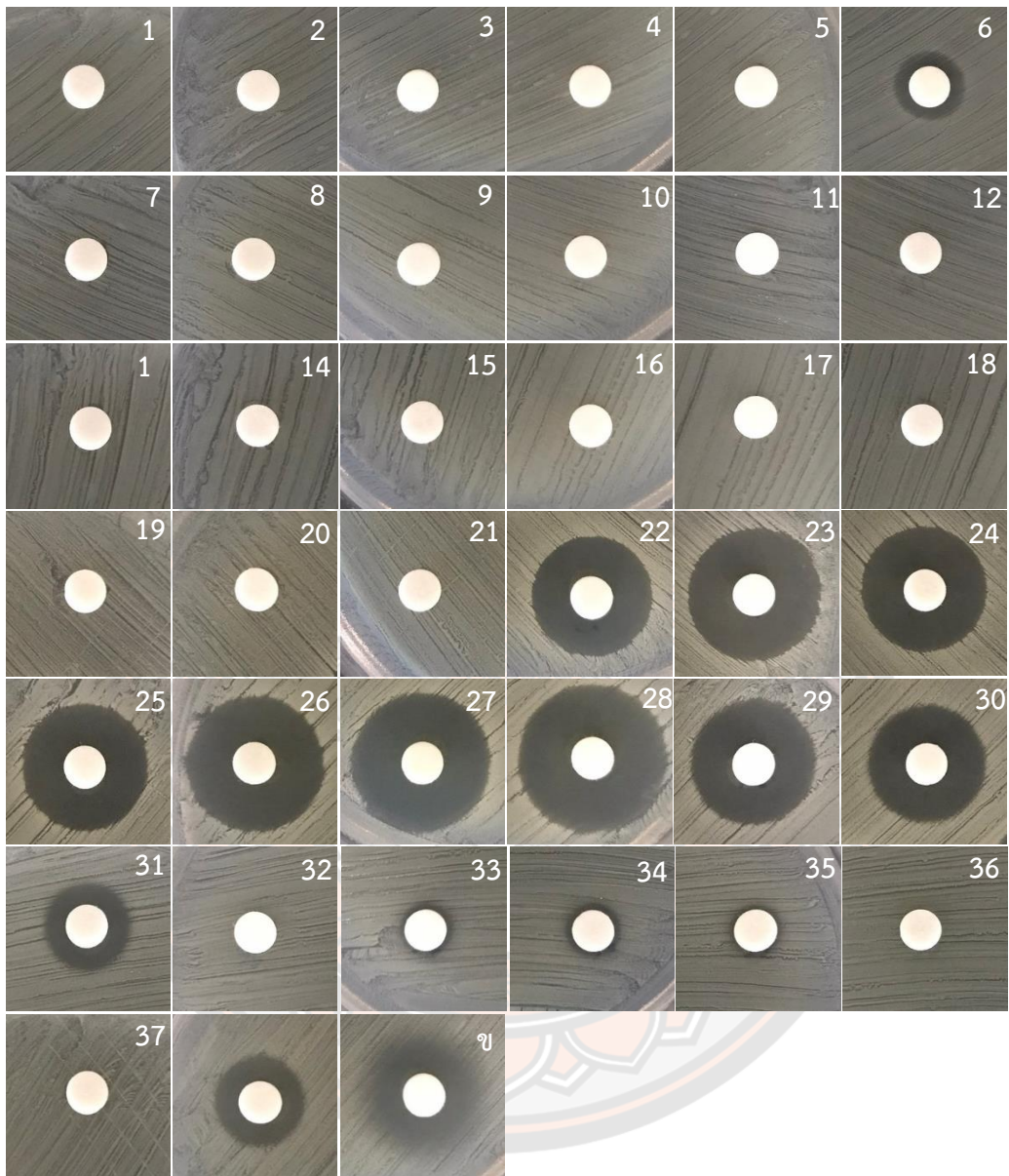
กลุ่มที่ 26 (G8.SG 26) และ 27 (G8.SG27) เท่ากับ  $18.33 \pm 0.22$  มิลลิเมตร และ  $18.90 \pm 0.50$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's multiple range test,  $p > 0.05$ ) (ภาพ 14 และตาราง 9) และเมื่อหลังจากทำการทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า sub-fraction กลุ่มที่ 28 ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* มากที่สุดเท่ากับ  $20.38 \pm 0.73$  มิลลิเมตร รองลงมาคือ sub-fraction กลุ่มที่ 26 (G8.SG26) และ 27 (G8.SG27) เท่ากับ  $18.40 \pm 0.18$  มิลลิเมตร และ  $19.10 \pm 0.62$  มิลลิเมตร ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's multiple range test,  $p > 0.05$ ) ดังภาพ 15 และตาราง 9

ตาราง 9 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. epidermidis* (TISTR 518) ด้วยวิธี paper disc diffusion method ของส่วนแยกย่อยที่ได้ในกลุ่มที่ 8 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์

sub-fraction	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
G8.SG22	$15.68 \pm 0.73^{fg*}$	$15.95 \pm 0.25^{fg}$
G8.SG23	$17.60 \pm 0.55^{cd}$	$17.88 \pm 0.51^{cd}$
G8.SG24	$16.90 \pm 0.16^{de}$	$17.00 \pm 0.16^e$
G8.SG25	$16.55 \pm 0.31^e$	$17.25 \pm 1.08^{de}$
G8.SG26	$18.33 \pm 0.22^{bc}$	$18.40 \pm 0.18^{bc}$
G8.SG27	$18.90 \pm 0.50^b$	$19.10 \pm 0.62^b$
G8.SG28	$20.03 \pm 0.60^a$	$20.38 \pm 0.73^a$
G8.SG29	$16.23 \pm 0.48^{ef}$	$16.18 \pm 0.46^f$
G8.SG30	$15.38 \pm 0.38^g$	$15.28 \pm 0.21^g$
G8.SG31	$10.65 \pm 0.44^i$	$9.03 \pm 0.42^i$
Chloramphenicol	$10.13 \pm 0.77^p$	$0.00 \pm 0.00$
Streptomycin	$11.65 \pm 0.56^h$	$10.65 \pm 0.31^h$

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  S.D.,  $n=4$ ) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย one way ANOVA และ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

\*ค่าเฉลี่ยที่แสดงในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน ( $a>b>c>d$ ) แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P \leq 0.05$ )



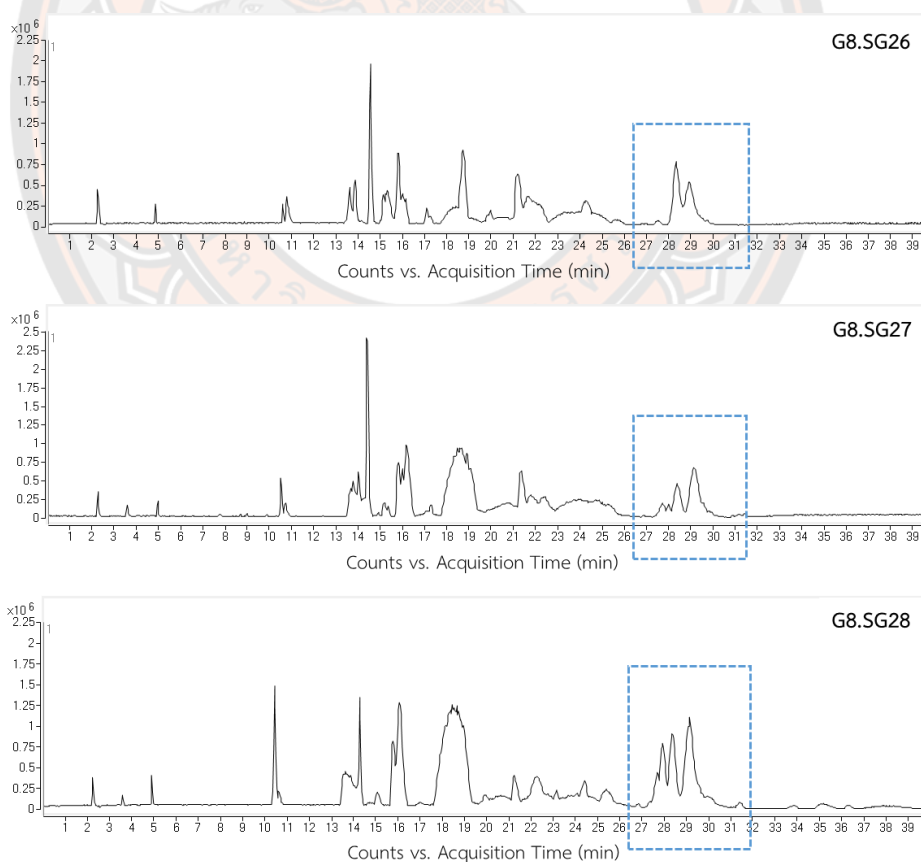
ภาพ 14 บริเวณยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (TISTR 518) ที่ 24 ชั่วโมง ของส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 8 จำนวน 37 ตัวอย่างที่แยกได้จากคอลัมน์ที่ 2 ของการแยกสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์  
 ก) streptomycin ข) chloramphenicol



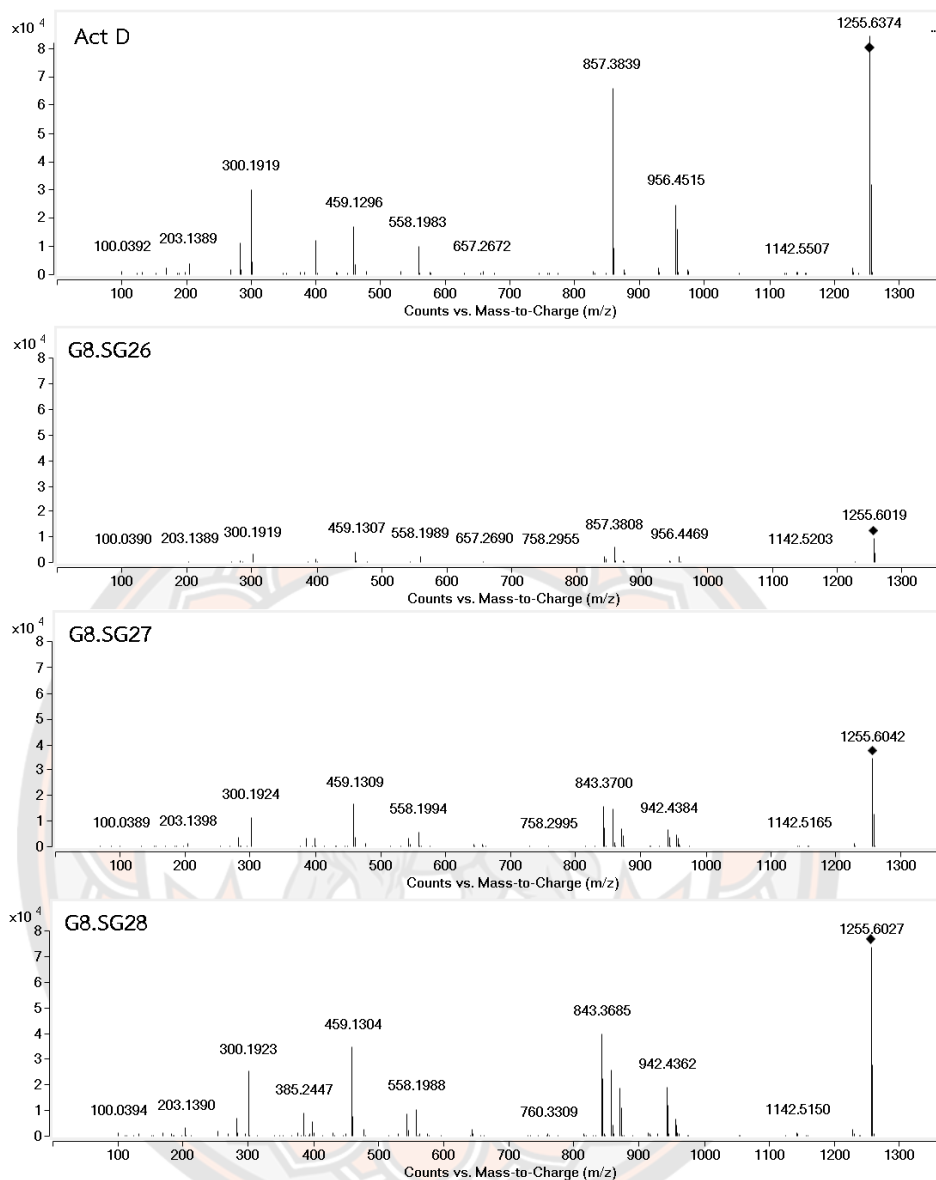
ภาพ 15 บริเวณยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (TISTR 518) ที่ 48 ชั่วโมง ของส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 8 จำนวน 37 ตัวอย่างที่แยกได้จากคอสม์ที่ 2 ของการแยกสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์  
 ความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อดิสก์  
 streptomycin ข) chloramphenicol

## 7. การศึกษา chemical profile ของตัวอย่างด้วยเทคนิค Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเชิงคุณภาพเบื้องต้นด้วยเทคนิค Liquid Chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ได้มีการตรวจสอบ mass spectra ของสารตัวอย่าง G8.SG26, G8.SG27 และ G8.SG28 ในโหมดไอออนบวก (positive mode) และไอออนลบ (negative mode) พบว่าข้อมูลแมสสเปกตรัมของตัวอย่างเมื่อวิเคราะห์ด้วย โหมดไอออนบวกแสดงให้เห็นถึงความเข้มของสัญญาณ (intensity) ที่ชัดเจนมากกว่า ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง G8.SG26-G8.SG28 พบว่าข้อมูล Base Peak Chromatogram (BPC) ของสารใน positive mode นั้นแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมีสารที่เป็นองค์ประกอบเป็นของผสมอยู่ด้วยกันหลายชนิด พีคที่ปรากฏส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกันแต่มีความเข้มของสัญญาณที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งอนุมานถึงความเข้มข้นของสารที่ต่างกัน โดยมีช่วงเวลาที่ปรากฏของสารที่ต้องการศึกษาอยู่ที่ retention time ( $t_R$ ) 27-30 นาที ดังภาพ 16



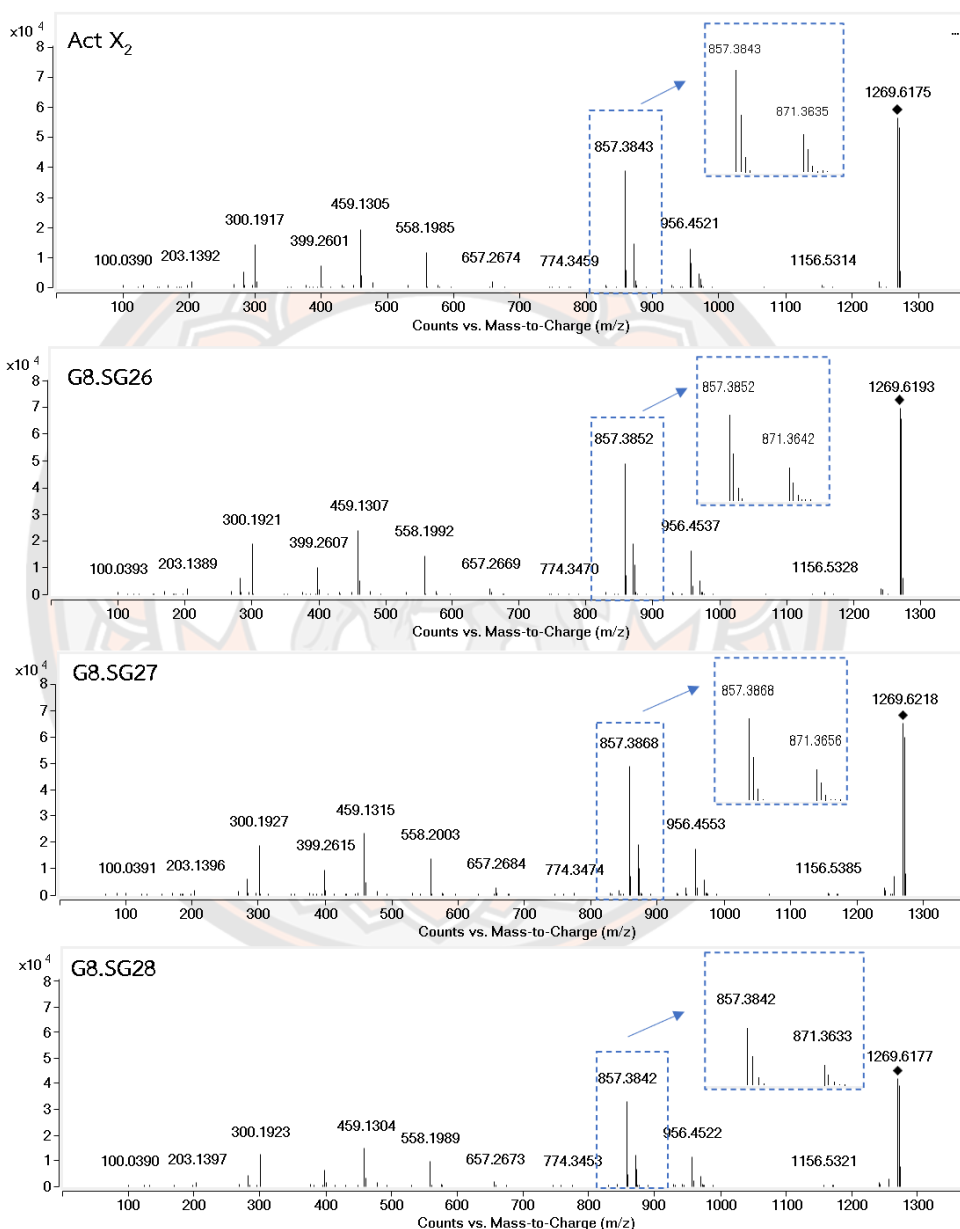
ภาพ 16 Base Peak Chromatogram (BPC) ของส่วนแยกย่อย G8.SG26-G8.SG28 ใน positive mode



ภาพ 17 MS/MS spectra ของ G8.SG26-28 และสารมาตรฐาน actinomycin D ที่แสดงรูปแบบการแตกหักของโมเลกุล (fragmentation) ที่ระดับค่าพลังงาน 40V

จากภาพ 17 ได้ทำการเก็บข้อมูลของรูปแบบการแตกหักของโมเลกุล (fragmentation) ที่ปรากฏไว้ โดยมีรายละเอียดของ mass per charge ratio ( $m/z$ ) ในแต่ละ  $t_R$  เมื่อพิจารณา fragmentation ของตัวอย่าง G8.SG26 ( $t_R$  27.649 นาที), G8.SG27 ( $t_R$  27.774 นาที) และ G8.SG28 ( $t_R$  28.673 นาที) มี  $m/z$  ที่กำหนดเป็น target mass ( $m/z$ )  $[M+H]^+$  คือ 1255.6019, 1255.6042 และ 1255.6027 ตามลำดับ โดยไอออนที่  $m/z$  956.4469 และ 857.3804 มี fragmentation เป็น product ions ที่  $m/z$  657.2690 และ 558.1989 นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็น

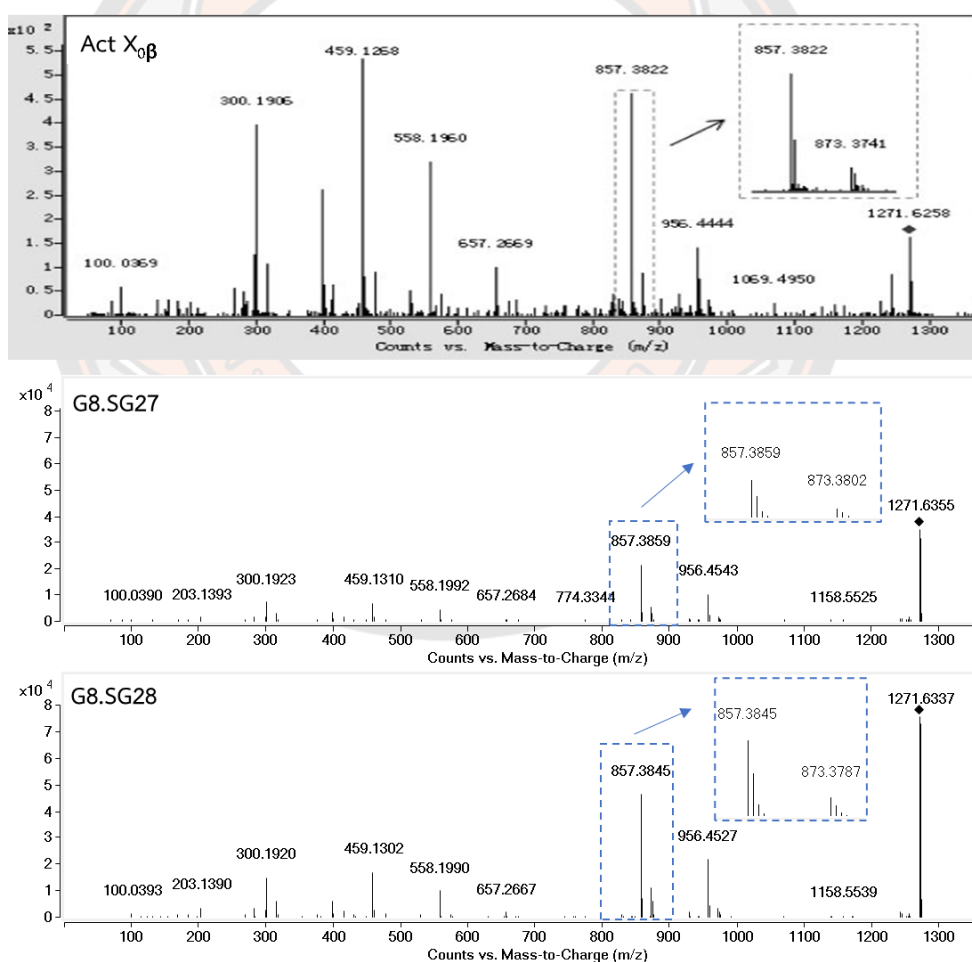
ว่าไอออนที่  $m/z$  857.3845 เกิดจากการสูญเสียสายโซ่ Val-Pro-Sar-MeVal (398 Da) (ภาพ 20) ซึ่งมี product ion ที่  $m/z$  459.1300 อยู่ในโครงสร้างนิวเคลียสหลักและมี fragmentation สอดคล้องกับสารมาตรฐาน actinomycin D ( $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ ;  $t_R$  28.659 นาที) ที่กำหนดเป็น target mass ( $m/z$ )  $[M+H]^+$  คือ 1255.6374 ดังภาพ 17



ภาพ 18 MS/MS spectra ของ G8.SG26-28 และสารมาตรฐาน actinomycin X<sub>2</sub> ที่แสดงรูปแบบการแตกหักของโมเลกุล (fragmentation) ที่ระดับค่าพลังงาน 40V

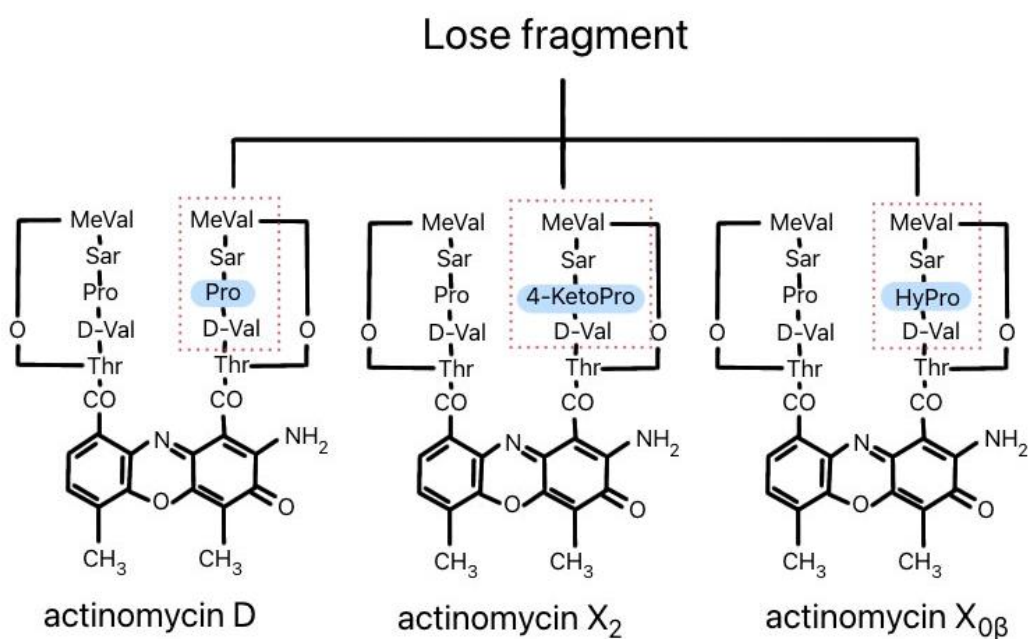


จากภาพ 18 ได้ทำการเก็บข้อมูลของรูปแบบการแตกหักของโมเลกุลของสารประกอบที่สองที่ปรากฏไว้ โดยมีรายละเอียดของ mass per charge ratio ( $m/z$ ) ในแต่ละ  $t_R$  เมื่อพิจารณา fragmentation ของตัวอย่าง G8.SG26 ( $t_R$  28.590 นาที), G8.SG27 ( $t_R$  28.306 นาที) และ G8.SG28 ( $t_R$  28.357 นาที) มี  $m/z$  ที่กำหนดเป็น target mass ( $m/z$ )  $[M+H]^+$  คือ 1269.6193, 1269.6218 และ 1269.6177 ตามลำดับ และสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล  $C_{62}H_{84}N_{12}O_{17}$  ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของสารสูงกว่าสารประกอบแรก (actinomycin D) 14 Da โดยไอออนที่  $m/z$  459.1307 แสดงให้เห็นว่าสารประกอบที่สองมีส่วนเหมือนกับสารประกอบแรก นอกจากนี้ยังตรวจพบไอออนที่  $m/z$  871.3642 ในสเปกตรัมของสารประกอบที่สอง แต่ไม่พบในสเปกตรัมในสารประกอบแรก โดยสารประกอบนี้ถูกระบุว่าเป็น actinomycin  $X_2$  จากการเปรียบเทียบเวลาและข้อมูล MS/MS กับสารมาตรฐาน ดังภาพ 18



ภาพ 19 MS/MS spectra ของ G8.SG27, G8.SG28 และสารมาตรฐาน actinomycin  $X_{0\beta}$  ที่แสดงรูปแบบการแตกหักของโมเลกุล (fragmentation) ที่ระดับค่าพลังงาน 40V  
ที่มา: Liu et al., 2010 (actinomycin  $X_{0\beta}$ )

จากภาพ 19 เมื่อพิจารณา fragmentation พบสารประกอบที่สามอยู่สองตัวอย่าง คือ G8.SG27 ( $t_R$  27.955 นาที) และ G8.SG28 ( $t_R$  27.731 นาที) โดยมี  $m/z$  ที่กำหนดเป็น target mass ( $m/z$ )  $[M+H]^+$  คือ 1271.6355 และ 1271.6337 ตามลำดับ ซึ่งมีสูตรโมเลกุลของสารประกอบคือ  $C_{62}H_{86}N_{12}O_{17}$  และมี product ions ที่คล้ายกันที่  $m/z$  956.4543, 857.9859, 657.2684, 399.2610, 300.1923 และ 459.1310 ที่ระบุว่าเป็นสาร actinomycin  $X_{0\beta}$  สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lui et al. (2010) โดยมีไอออนที่  $m/z$  873.3802 (สารประกอบที่สาม) และ  $m/z$  857.3845 (สารประกอบที่หนึ่ง) แตกต่างกันเพียง 16 Da ภายใต้งานไฮสภาวะเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของสายโซ่กรดอะมิโนที่หลงเหลืออยู่จากการแตกหักของโมเลกุล ดังภาพ 19



ภาพ 20 บริเวณที่พบการสูญเสียของกรดอะมิโนเพื่อระบุชนิดของสาร actinomycin D,  $X_2$  และ  $X_{0\beta}$

จากค่าแมสที่ปรากฏในสาร actinomycin D แสดงให้เห็นว่ามีการสูญเสียอย่างต่อเนื่องที่ 97 และ 99 Da โดยมี  $m/z$   $[M+H]^+$  คือ 956.4469 และ 857.3808 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิดห่วงโซ่ Val-Pro-Sar-MeVal (398 Da) เนื่องจากการสูญเสียของกรดอะมิโน Sar-MeVal อย่างต่อเนื่อง กรดอะมิโน Pro และ Val จากสารตั้งต้นไอออนที่  $m/z$  657.2690 และ 558.1989 (ภาพ 17 (G8.SG26)) แสดงให้เห็นถึงการเกิดขึ้นของสารตกค้าง Pro-Sar-MeVal อีกตัว ซึ่งแยกส่วนจากไอออนที่  $m/z$  956.4469 และ 857.3808 (ภาพ 17 (G8.SG26)) ตามลำดับ โดยการสูญเสียสายโซ่ Val-Pro-

Sar-MeVal อีกสายหนึ่ง (398 Da) จากไอออนที่  $m/z$  857.3808 ทำให้เกิด product ion ที่  $m/z$  459.1307 (ภาพ 17 (G8.SG26)) ซึ่งเป็นตัวแทนของโครงสร้างนิวเคลียสแม่ นอกจากนี้ยังตรวจพบไอออนอื่นๆ ที่  $m/z$  399.2607, 300.1921 และ 203.1389 ซึ่งสอดคล้องกับไอออนของสายโซ่กรดอะมิโนของ [(H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH)+H]<sup>+</sup>, [(H-Pro-Sar-MeVal-OH)+H]<sup>+</sup> และ [(H-MeVal-Sar-OH)+H]<sup>+</sup> ตามลำดับ เมื่อพิจารณาสาร actinomycin X<sub>2</sub> มีความคล้ายคลึงกับสาร actinomycin D โดยสังเกตว่าไอออนที่  $m/z$  871.3642 (ภาพ 18 (G8.SG26)) ถูกตรวจพบจากสาร actinomycin X<sub>2</sub> แต่ไม่พบในสเปกตรัมของสาร actinomycin D โดยการสูญเสีย 398 Da ทำให้เกิดไอออนที่  $m/z$  871.3642 ซึ่งสูงกว่าไอออนที่  $m/z$  857.3808 (ภาพ 17 (G8.SG26)) 14 Da ของสาร actinomycin D แสดงให้เห็นว่าสายโซ่กรดอะมิโนที่สองบนโครงสร้างของสาร actinomycin X<sub>2</sub> มีองค์ประกอบอื่นนอกเหนือจากสายโซ่ Val-Pro-Sar-MeVal (ภาพ 20)

เพื่อระบุลักษณะของสายโซ่กรดอะมิโนที่แตกต่างกัน จึงได้วิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยค่าการแตกตัวตามค่าพลังงานที่ 40V และ QTOF MS/MS ที่  $m/z$  871.3656 (ภาพ 18 (G8.SG27)) และ 873.3802 (ภาพ 19 (G8.SG27)) ในสาร actinomycin X<sub>2</sub> และสาร actinomycin X<sub>0β</sub> ไอออนที่  $m/z$  871.3656 Da จะถูกพิจารณาเป็นไอออนตั้งต้น และแสดงถึงการสูญเสียอย่างต่อเนื่องของสายโซ่กรดอะมิโน MeVal, Sar, 4-ketoproline และ Val จากไอออนที่  $m/z$  871.3656 ตามลำดับ ดังนั้น สายกรดอะมิโนจึงถูกกำหนดให้เป็น Val-4-ketoproline-Sar-MeVal และถูกระบุว่าเป็นสาร actinomycin X<sub>2</sub> และเมื่อวิเคราะห์ค่าการแตกตัว MS/MS สเปกตรัมของไอออนที่  $m/z$  873.3802 (ภาพ 19 (G8.SG27)) ของสาร actinomycin X<sub>0β</sub> พบค่าการแตกตัวไอออนที่มีการสูญเสีย 113, 89, 111 และ 99 Da ซึ่งเป็นสายโซ่กรดอะมิโน Val-Hyp-Sar-MeVal (ภาพ 20)

## 8. การศึกษาการติดสีรงควัตถุของสารสกัดหยาบ

### 8.1 การศึกษาการติดสีรงควัตถุของสารสกัดหยาบของเส้นใยไหม

จากการศึกษาการติดสีของรงควัตถุจากแอคติโนแบคทีเรียที่เลี้ยงบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาละลายด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เพื่อเป็นสีย้อมเส้นใยไหม พบว่า สามารถย้อมติดเส้นใยไหมจำนวน 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสีชมพู (ไอโซเลต TN012 และ TN195) กลุ่มสีโอรส (ไอโซเลต TN052 และ TN215) และกลุ่มสีเหลือง (ไอโซเลต TN015, TN166 และ TN183) (ภาพ 21) และพบว่าแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต สามารถย้อมติดเส้นใยไหมโดยให้สีเข้มที่สุดในแต่ละกลุ่ม

เฉดสี คือ กลุ่มสีเหลือง ไอโซเลต TN183 กลุ่มสีชมพู ไอโซเลต TN195 และกลุ่มสีโอรส ไอโซเลต TN215 (ตาราง 10) ในขณะเดียวกัน พบว่า ไอโซเลต TN105 ไม่สามารถย้อมติดสีเส้นใยไหมได้

ตาราง 10 ค่าสีของเส้นใยไหมที่วัดได้ในระบบ CIELAB

สารสกัดหยาบ	ค่าสีของเส้นใยไหม		
	L*	a*	b*
TN012	57.94±0.29	12.09±0.16	2.98±0.03
TN015	76.40±0.29	-0.71±0.08	10.72±0.18
TN052	56.98±0.46	4.96±0.03	2.94±0.07
TN105	70.86±0.26	0.16±0.05	4.44±0.09
TN166	64.78±1.78	-1.01±0.19	10.66±0.05
TN183	67.56±0.92	-1.25±0.11	11.86±0.27
TN195	60.55±0.96	16.88±0.17	1.69±0.02
TN215	58.73±0.20	5.44±0.16	3.47±0.03
70 เปอร์เซ็น เอทานอล	63.93±0.11	-0.32±0.09	3.40±0.05

หมายเหตุ: ค่าสีจากเครื่อง Color meter โดย

L\* หมายถึง ค่าแสดงความสว่างของสี อยู่ในช่วง 0-100 (0 หมายถึง มืด ถ้า 100 หมายถึง สว่าง)

a\* หมายถึง ค่าแสดงสีแดงและสีเขียว (ถ้า a เป็นบวก หมายถึง สีแดง และถ้า a เป็นลบ หมายถึง สีเขียว)

b\* หมายถึง ค่าแสดงสีเหลืองและสีน้ำเงิน (ถ้า b เป็นบวก หมายถึง สีเหลือง และถ้า b เป็นลบ หมายถึง สีน้ำเงิน)



ภาพ 21 การติดสีของแอกติโนแบคทีเรียในเส้นใยไหมที่ผ่านการย้อมเป็นจำนวน 2 ครั้ง

## 8.2 การศึกษาการติดสีของสสารสกัดของสารสกัดหยาบในผ้าไหม

จากการศึกษาการติดสีของสสารสกัดของสารสกัดหยาบในผ้าไหมที่ย้อมด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทจำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำไปทดสอบคุณภาพของสิ่งทอ พบว่า ผ้าไหมที่ย้อมด้วยสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 สามารถย้อมติดเส้นใยไหมได้เป็นกลุ่มสีเหลือง โดยมีค่าสีของผ้าไหมที่วัดได้ดังตาราง 11

ตาราง 11 ค่าสีของผ้าไหมที่วัดได้ในระบบ CIELAB

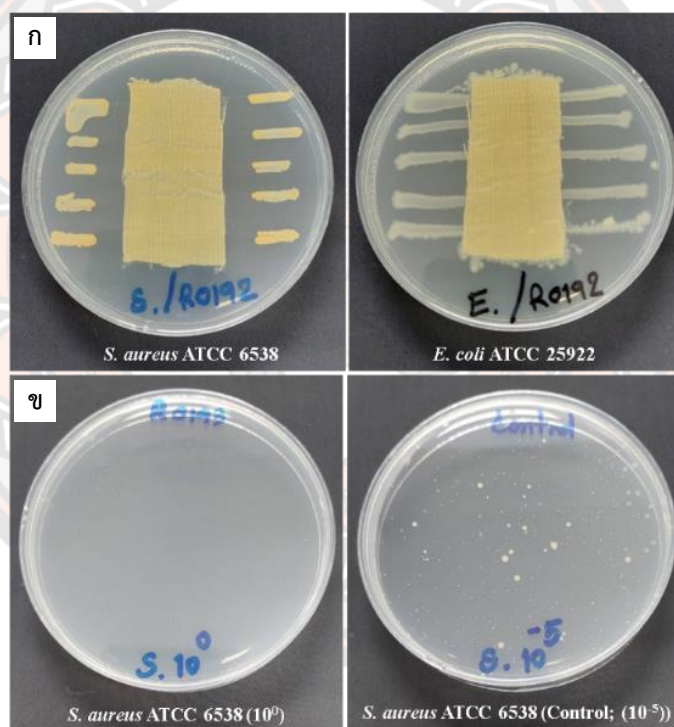
สารสกัดหยาบ	ค่าสีของผ้าไหม		
	L*	a*	b*
TN183	73.47	-1.31	31.46

## 9. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative methods)

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของผ้าไหมที่ย้อมด้วยสารสกัดไอโซเลต TN183 ด้วยวิธีมาตรฐาน AATCC Test Method 147-2011 ที่ 24 ชั่วโมง ตัวอย่างผ้าไหมที่ย้อมด้วยสารสกัดไอโซเลต TN183 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยที่บริเวณยับยั้งที่ 7.4 มิลลิเมตร ในขณะที่เชื้อ *E. coli* ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ (ภาพ 22)

## 10. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงปริมาณ (quantitative methods)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามมาตรฐาน AATCC Test Method 100-2019 เมื่อสังเกตลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงให้เห็นว่า เมื่อเวลาผ่านไปจะพบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ลดลง และสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน เมื่อเวลาทดสอบเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อคำนวณอัตราการลดลงของแบคทีเรียหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง ดังภาพ 22 พบว่า ผ้าไหมที่ผ่านการย้อมด้วยสารสกัดไอโซเลต TN183 มีสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ 47.90 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้สูงถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพ 22 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอโดยการทดสอบตามวิธีมาตรฐานที่ 24 ชั่วโมง  
 ก) การทดสอบเชิงคุณภาพด้วยวิธี AATCC 147-2011 ข) การทดสอบเชิงปริมาณด้วยวิธี AATCC 100-2019

## บทที่ 5

### บทสรุป

#### สรุปผลการวิจัย

1. จากผลการแยกเชื้อแอกติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพืชดอก 5 ชนิด พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 194 ไอโซเลต โดยตัวอย่างดินบริเวณรอบรากต้นจำปีหลวงสามารถคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียมากที่สุดจำนวน 73 ไอโซเลต ในขณะที่ดินบริเวณรอบรากต้นสร้อยสยามพบเพียงจำนวน 18 ไอโซเลต และเมื่อพิจารณาอาหารสำหรับคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรีย พบว่า ในอาหาร starch casein agar (SCA) สามารถแยกแอกติโนแบคทีเรียได้มากที่สุดจำนวน 81 ไอโซเลต หรือคิดเป็นร้อยละ 41.75 ของเชื้อทั้งหมดที่แยกได้ จากนั้นจึงนำแอกติโนแบคทีเรียที่ได้ทั้งหมดไปคัดกรองการผลิตรงควัตถุบนเมล็ดข้าว พบว่า สามารถผลิตรงควัตถุบนเมล็ดข้าวได้ทั้งหมด 44 ไอโซเลต และสามารถแบ่งกลุ่มสีได้จำนวน 6 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มที่ผลิตรงควัตถุบนเมล็ดข้าวมากที่สุด คือ กลุ่มสีเหลืองจำนวน 15 ไอโซเลต ในขณะที่รงควัตถุกลุ่มสีดำพบเพียง 1 ไอโซเลต จากนั้นจึงนำแอกติโนแบคทีเรียทั้งหมด 44 ไอโซเลตไปเลี้ยงบนปลายข้าว ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแอกติโนแบคทีเรียมากที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารรำสกัดน้ำมันและรำสกัดน้ำมันผสมปลายข้าว

2. เมื่อทำการคัดกรองฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นโดยการสกัดแบบลำดับส่วนด้วยวิธี paper disc diffusion method จากแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 44 ไอโซเลต พบว่า มีจำนวน 8 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* (TISTR 518) และ *S. aureus* (DMST 4745) ได้ โดยสารสกัดจากไอโซเลต TN183 ในสารละลายเมทานอลและเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. epidermidis* (TISTR 518) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ  $18.07 \pm 1.01$  และ  $17.63 \pm 1.48$  มิลลิเมตร ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดจากไอโซเลต TN183 ในสารละลายเอทิลอะซิเตท เมทานอล และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* (DMST 4745) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ  $11.50 \pm 0.87$ ,  $11.75 \pm 0.68$ ,  $12.17 \pm 0.76$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 ไปเพิ่มปริมาณสารสกัดในปลายข้าว

จากการเพิ่มปริมาณของแอกติโนแบคทีเรียบนปลายข้าวปริมาณ 2.5 กิโลกรัม และนำไปสกัดแบบลำดับส่วน พบว่า ปริมาณของสารสกัดหยาบจากสารละลายเอทิลอะซิเตทให้ปริมาณสารสกัดเท่ากับ 6.5513 กรัม จากนั้นจึงนำสารสกัดแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก นำสารสกัดหยาบไป

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อไตผิวหนังของหนูชนิด L929 โดยผลการทดลอง พบว่า สารสกัดหยาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.029 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนที่สองนำไปแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งผลจากการแยกสารผ่านคอลัมน์แรกสามารถแยกสารได้ทั้งหมด 26 กลุ่ม โดยสารกลุ่มที่ 8 มีน้ำหนักสารมากที่สุดเท่ากับ 1178.6 มิลลิกรัม และเมื่อแยกสารกลุ่มที่ 8 ผ่านคอลัมน์ที่ 2 พบว่า สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 37 กลุ่ม จากนั้นจึงนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค bioautography จำนวน 12 กลุ่ม พบว่า สาร 10 กลุ่ม คือ ส่วนแยกย่อยกลุ่มที่ 22-31 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (TISTR 518) ได้ โดยมีค่า  $R_f$  อยู่ในช่วง 0.09-0.67 และเมื่อนำสารที่แยกได้จากคอลัมน์ที่ 2 จำนวน 37 กลุ่ม ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. epidermidis* (TISTR 518) ด้วยวิธี paper disc diffusion method พบว่า sub-fraction กลุ่มที่ 28 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากที่สุดเท่ากับ  $20.03 \pm 0.60$  มิลลิเมตร รองลงมาคือ sub-fraction กลุ่มที่ 26 และ 27 เท่ากับ  $18.33 \pm 0.22$  และ  $18.90 \pm 0.50$  มิลลิเมตร ตามลำดับ จากผลดังกล่าว จึงได้คัดเลือกตัวอย่าง sub-fraction กลุ่มที่ 26-28 ไปศึกษา chemical profile ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบสาร actinomycin ใน sub-fraction กลุ่มที่ 26 จำนวน 2 ชนิด คือ สาร actinomycin D และสาร actinomycin X<sub>2</sub> และใน sub-fraction กลุ่มที่ 27 และ 28 พบสาร actinomycin จำนวน 3 ชนิด คือ สาร actinomycin D สาร actinomycin X<sub>2</sub> และสาร actinomycin X<sub>0β</sub>

3. จากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตรงควัตถุและมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่า เชื้อแอกติโนแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลต มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Streptomyces* คือ ไอโซเลต TN012 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces cinnamoneus* สายพันธุ์ NBRC 12852 (99.72 เปอร์เซ็นต์), ไอโซเลต TN015 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces shenzhenensis* สายพันธุ์ 172115 (99.72 เปอร์เซ็นต์), ไอโซเลต TN052 และ ไอโซเลต TN215 *Streptomyces aquilus* สายพันธุ์ GGCR-6 (99.64 เปอร์เซ็นต์), ไอโซเลต TN105 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces adustus* สายพันธุ์ WH-9 (99.93 เปอร์เซ็นต์), ไอโซเลต TN166 และไอโซเลต TN183 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces gramineus* สายพันธุ์ JR-43 (100 เปอร์เซ็นต์) และไอโซเลต TN195 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces netropsis* สายพันธุ์ NBRC 3723 (99.19 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ



4. ผลจากการศึกษาการติดสีในเส้นใยไหมของรวงควัดจากแอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตรวงควัดและมียูทรียับยั้งแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต สามารถย้อมติดเส้นใยไหมจำนวน 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสีชมพู (ไอโซเลต TN012 และ TN195) กลุ่มสีโอรส (ไอโซเลต TN052 และ TN215) และ กลุ่มสีเหลือง (ไอโซเลต TN015, TN166 และ TN183) โดยไอโซเลต TN183, TN195 และ TN215 สามารถย้อมติดเส้นใยไหมได้เข้มที่สุดในแต่ละกลุ่มเฉดสี ในขณะที่ไอโซเลต TN105 ไม่สามารถย้อมติดสีเส้นใยไหมได้ และจากผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบนสิ่งทอด้วยการทดสอบเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณของสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 พบว่า ในการทดสอบเชิงคุณภาพสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยที่บริเวณยับยั้งที่ 7.4 มิลลิเมตร และการทดสอบเชิงปริมาณ พบว่า ไอโซเลต TN183 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้สูงถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ และ *E. coli* ได้ 47.90 เปอร์เซ็นต์

#### อภิปรายผล

จากการแยกแอกติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพืชดอก เพื่อคัดกรองแอกติโนแบคทีเรียที่สามารถผลิตรวงควัดในอาหารแข็งและมียูทรีต้านแบคทีเรียบางชนิด สำหรับใช้เป็นสีย้อมธรรมชาติในเส้นใยไหม สามารถอภิปรายผลการวิจัยได้ดังนี้

1. ในการศึกษาการคัดเลือกแอกติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพืชดอก 5 ชนิด จากอาหารที่แตกต่างกัน สามารถแยกแอกติโนแบคทีเรียได้ทั้งหมด 194 ไอโซเลต โดยพบว่า ในอาหาร starch casein agar สามารถแยกเชื้อแอกติโนแบคทีเรียได้มากที่สุดจำนวน 81 ไอโซเลต (41.75 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zothanpuia และคณะในปี 2015 พบว่าสามารถคัดแยกแอกติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างทางทะเลในอาหาร SCA ได้มากที่สุด 94.6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Geetanjali and Jain ในปี 2016 สามารถแยกแอกติโนแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบรากพืชและจาก Geetanjali and Jain แปลงเกษตร ประเทศเอธิโอเปีย ได้มากถึง 33 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร starch casein agar และ actinomyctes isolation agar โดยในอาหาร SCA มีส่วนประกอบของแป้งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนและเคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งอาหารดังกล่าวทำให้เกิดแหล่งไอออนิกเชิงซ้อนที่เหมาะสมสำหรับการตรวจจับแบคทีเรียหายากที่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและการคัดแยกแอกติโนแบคทีเรีย (Pratiwi, R. H., 2018) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Heng (2008) ได้ทำการแยกและจำแนกแอกติโนแบคทีเรียจากศูนย์วิจัยการเกษตร ประเทศมาเลเซีย พบว่าสามารถแยกแอกติโนแบคทีเรียได้ทั้งหมด 62 ไอโซเลต โดยมีความหนาแน่น

ของแอกติโนแบคทีเรียมากที่สุดถึง  $8 \times 10^7$  CFU/g อีกทั้งยังพบว่า แอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้นั้นสามารถผลิตตรงควัตถุ โดยแยกตามกลุ่มสี คือ สีเทาดำ เทา น้ำตาลเข้ม น้ำตาล ขาว และสีขาวยเหลือง เป็นต้น

เมื่อนำแอกติโนแบคทีเรียจำนวน 194 ไอโซเลตมาคัดกรองการผลิตตรงควัตถุบนเมล็ดข้าว พบว่าสามารถผลิตตรงควัตถุในเมล็ดข้าวได้จำนวน 44 ไอโซเลต แสดงให้เห็นว่าแอกติโนแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนเมล็ดข้าว ซึ่งมีการรายงานที่ข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และธาตุอาหารหลักที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Singh et al., 2018) นอกจากนี้ การเลี้ยงจุลินทรีย์บน solid state เป็นกระบวนการหมักที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับสิ่งมีชีวิตที่เป็นเส้นใย เช่น แอกติโนแบคทีเรีย และกระบวนการหมักบนอาหารแข็งยังถูกนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการผลิตสารทุติยภูมิจากแอกติโนแบคทีเรีย (Robinson et al., 2001)

ผลการจัดจำแนกชนิดของแอกติโนแบคทีเรียโดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตตรงควัตถุและมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต พบว่า แอกติโนแบคทีเรียทั้ง 8 ไอโซเลตจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* ซึ่งมีการรายงานที่ *Streptomyces* เป็นจีนัสที่สำคัญในการผลิตสารทุติยภูมิที่หลากหลายเนื่องจากมีศักยภาพทางเทคโนโลยีชีวภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Valdés et al., 2017) และจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ EzBioCloud พบว่า มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces gramineus* สายพันธุ์ JR-43<sup>T</sup> (100 เปอร์เซ็นต์) ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นไผ่ (*Sasa borealis*) (Lee et al., 2012) โดยในงานวิจัย Lee et al. (2012) ได้มีการรายงานที่ *Streptomyces gramineus* สายพันธุ์ JR-43<sup>T</sup> เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากดินไรโซสเฟียร์จากต้นไผ่ (*Sasa borealis*) ประเทศเกาหลีใต้

2. จากผลการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนแบคทีเรียที่ผลิตตรงควัตถุบนปลายข้าว ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ คือ แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* TISTR 527 และ *P. aeruginosa* DMST 15501 และแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* DMST 4745 และ *S. epidermidis* TISTR 518 ด้วยวิธี paper disc diffusion method พบว่า มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต โดยทั้ง 8 ไอโซเลตสามารถยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก สอดคล้องกับการศึกษา Wang et al. (2017) ได้คัดเลือก *Streptomyces heliomycini* ที่สามารถผลิต actinomycin D, X<sub>2</sub> และ X<sub>0b</sub> ได้ โดยมีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ได้สูงที่สุด และ พบว่าสามารถผลิตสารได้  $458.0 \pm 76.3$ ,  $283.4 \pm 75.3$  และ  $107.6 \pm 4.2$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

นอกจากนี้ Qureshi et al. (2021) ได้มีการรายงานว่ามี *Streptomyces smyrnaeus* UKAQ\_23 เชื้อมีฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อแบคทีเรียแกรมบวก รวมถึงสายพันธุ์ MRSA ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราไม่พบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

จากงานวิจัยต่างๆ ที่มีการศึกษาการแยกสาร actinomycins มากกว่า 30 ชนิด จากสายพันธุ์ *Streptomyces* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการศึกษาจำนวนมาก โดยเฉพาะสาร actinomycin D ที่ได้มีการศึกษามากที่สุด เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย (Kurosawa et al., 2006) โดยผลจากการแยกสารสกัดหยาบไอโซเลต TN183 ที่เลี้ยงบนปลายข้าวด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและนำไปวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค LC/MS/MS พบว่า สามารถระบุสารที่เป็นองค์ประกอบที่ถูกแยกให้เป็นสารกึ่งบริสุทธิ์ได้ 3 ชนิด คือ actinomycin D, actinomycin X<sub>0β</sub> และ actinomycin X<sub>2</sub> ซึ่งมีการรายงานว่ามี *Streptomyces* สามารถผลิตสาร actinomycin ทั้ง 3 ชนิดได้ เช่น *Streptomyces smyrnaeus* UKAQ\_23 (Qureshi et al., 2021), *Streptomyces* sp. Av-R5 (Chandrakar and Gupta, 2019), *Streptomyces heliomycini* (Wang et al., 2017), *Streptomyces globisporus* (Chen et al., 2020), *Streptomyces antibioticus* KRG-1 (Charousová et al., 2019), *Streptomyces flavogriseus* NJ-4 (Wei et al., 2017) และ *Streptomyces cyaneofuscatus* (Chen et al., 2021) จากการศึกษาของ Wang et al. (2017) พบว่า สารปฏิชีวนะ actinomycin D, actinomycin X<sub>2</sub> และ actinomycin X<sub>0β</sub> ซึ่งได้จากเชื้อ *Streptomyces heliomycini* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Qureshi et al. (2021) พบว่า actinomycin D และ actinomycin X<sub>2</sub> จากเชื้อ *Streptomyces smyrnaeus* UKAQ\_23 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกจำพวกเชื้อดื้อยาได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราได้ ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อแอกติโนแบคทีเรียที่แยกได้นั้นมีสารกลุ่มเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านมา เมื่อพิจารณา product ion [M+H]<sup>+</sup> จากการศึกษาของ Lui et al. (2010) ในการวิเคราะห์ข้อมูล QTOF LC/MS/MS พบว่า actinomycin D, X<sub>2</sub> และ X<sub>0β</sub> มี mother nucleus เดียวกัน แต่ต่างกันที่ค่าการแตกตัวเท่านั้น นอกจากนี้ เมื่อพิจารณากลุ่มสารออกฤทธิ์ของ actinomycins ในงานวิจัยนี้ พบว่าเป็นสารกลุ่ม bactericide ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* เนื่องจากในการทดสอบ paper disc diffusion method ที่เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง บริเวณยับยั้งมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 24 ชั่วโมง

3. ในการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยการทดสอบเชิงคุณภาพ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ และการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยการทดสอบเชิงปริมาณ พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538 ได้มากถึง 99.99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2021) พบว่า ผ้าไหมที่ผ่านการย้อมด้วยสาร actinomycin X<sub>2</sub> สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังมีการรายงานว่ ผ้าไหมที่ย้อมด้วยสาร actinomycin X<sub>2</sub> เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเสื้อผ้าและสิ่งทอทางการแพทย์สำหรับการป้องกันเชื้อแบคทีเรีย (Chen et al., 2021) ซึ่งผลที่ได้บ่งชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหายาจาก *Streptomyces gramineus* TBRC 15927 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อไตฉิวหนิงของหนูชนิด L929 อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.029±0.008 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0.029 ppm) ตามรายงานของ Ramirez -Rodriguez et al. (2018) ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อไตฉิวหนิงของหนูชนิด L929 โดยมี Doxorubicin (1-25 ppm) เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบ พบว่า สารสกัดหายาที่ค่า IC<sub>50</sub> ต่ำกว่า 50 ppm ไม่เป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืชดอกสามารถผลิตรงควัตถุในวัสดุหลงเหลือทางการเกษตรและมีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์ในสิ่งทอ และสามารถย้อมติดสีในเส้นใยไหมได้ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้เป็นแนวทางการใช้แอคติโนแบคทีเรียเพื่อพัฒนาไปเป็นสีย้อมผ้าที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และแนวทางเลือกสำหรับสีย้อมธรรมชาติจากจุลินทรีย์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมได้ในอนาคต

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการเพาะเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียบนอาหารแข็ง เช่น ชนิดของอาหาร องค์ประกอบของอาหาร และระดับความชื้น
2. ควรศึกษาปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการย้อม เช่น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดก่อนนำไปพัฒนาเป็นสีย้อมผ้า คุณสมบัติบางประการของสารสกัด (การทนต่อความร้อน สภาวะความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของสารและตัวทำละลาย เป็นต้น) และการใช้มอร์แดนต์ร่วมกับสารสกัดเพื่อให้เส้นใยมีการติดสีที่ชัดเจนขึ้น
3. ควรศึกษาความคงทนของสีหลังการย้อม

# บรรณานุกรม





บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

- กรุงเทพธุรกิจ. (27 มิถุนายน 2565). *สถานการณ์การส่งออกผลิตภัณฑ์สิ่งทอไทย*. สืบค้นเมื่อ 13 พฤศจิกายน 2565 จาก <https://www.bangkokbiznews.com/business/1012293>
- ณรงค์ศิลป์ ฐูปพนม. (2531). เคมีของสีย้อมกับผลิตภัณฑ์หัตถกรรมไทย. *วารสาร สสวท.*, 16(4), 9-12.
- นฤมล เกื่อนกุล และ นฤมล หวลระลึก. (2560). การคัดแยกแอคติโนไมซ์ชิตจากดินรังปลวก อำเภอศรีสัชนาลัย จังหวัดสุโขทัย เพื่อใช้ในการย้อมสีเส้นใยไหม. *PSRU Journal of Science and Technology*, 2, 3.
- นวลแข ปาลินนิช. (2542). *ความรู้เรื่องผ้าและเส้นใย ฉบับปรับปรุงใหม่*. กรุงเทพฯ: ซีเอ็ดดูเคชั่น.
- วรรณัฐ สดากการ. (2535). *หนังสือประกอบวีดิโอฝึกอบรมทางเทคนิค ความรู้พื้นฐานการฟอกย้อมพิมพ์ ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ*. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: บริษัท ที ที ไอ เอส จำกัด.
- วิชาญ วันโพนทอง. (2548). การย้อมสีด้วยสีธรรมชาติ. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ*, 53(168), 35-37.
- ศุภวิน วัชรมูล. (2552). การฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมโดยชีววิธีเพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนสีย้อมผ้า. *Colour Way*, 14(81), 21-13.
- สถาบันพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอ. (17 กันยายน 2565). *สถานการณ์อุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่มไทย*. สืบค้นเมื่อ 13 พฤศจิกายน 2565 จาก <https://www.thaitextile.org/th/insign/detail.1570.1.0.html>
- สำนักพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ กรมศิลปากร (ผู้บรรยาย). (28-30 มิถุนายน 2553). *การอนุรักษ์โบราณวัตถุ ศิลปวัตถุ: ผ้าโบราณ*. กรุงเทพมหานคร: พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ พระนคร.
- สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2560). *ประมวลสารสนเทศพร้อมใช้การย้อมสิ่งทอด้วยสีธรรมชาติ (Textile Dyeing with Natural Dyes)*. กรม วิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- Abdallah, M.S.; Mustafa, M.; Nallappan, M.A.; Choi, S.; Paik, J.H.; Rusea, G. (2021). Determination of phenolics and flavonoids of some useful medicinal plants and bioassay-guided fractionation substances of *Sclerocarya birrea* (A. Rich)

- Hochst Stem (Bark) Extract and Their Efficacy Against *Salmonella typhi*. *Frontiers in Chemistry*, 9, 670530.
- Abebaw, A., Tesera, H., Belachew, T., & Mihiretie, G. D. (2018). The bacterial profile and antibiotic susceptibility pattern among patients with suspected bloodstream infections, Gondar, north-west Ethiopia. *Pathology and Laboratory Medicine International*, 10, 1-7.
- Ali, A., Junda, M., Rante, H. and Nuramelia, R. (2018). Characterization of actinomycetes antagonist *Fusarium oxysporum* f.sp.*passiflora* isolated from rhizosphere soil of purple passion fruit plants, South Sulawesi, Indonesia. *Journal of Physics Conference Series*, 70(10), 1287-1300.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., Manogaran, G. P. (2016) An introduction to actinobacteria. *InTech Publisher*, 3–37.
- Atta, H. M., Dabour, S. M. and Desoukey, S. G. (2009). Sparsomycin antibiotic production by *Streptomyces* Sp. AZ-NIOFD1: Taxonomy, Fermentation, Purification and Biological Activities. *American Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 5, 368-77.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Vaillant, N. G., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y. and Wezeld, G. P. V. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 1.
- Barnes, M. J., Constable, B. J., Morton, L. F., & Kodicek, E. (1971). Hydroxylysine in the N-terminal regions of the  $\alpha 1$ - and  $\alpha 2$ -chains of various collagens. *Biochemical Journal*, 125(2), 433-437.
- Callewaert, C., De Maeseneire, E., Kerckhof, F. M., Verliefde, A. R. D., Van De Wiele, T. and Boon, N. (2014). Bacterial and odor profile of polyester and cotton clothes after a fitness session. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 135-140.



- Canosa, P. and Rodríguez, I. E. and Rubí, R. (2007). Determination of parabens and triclosan in indoor dust using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79(4), 1675-1681.
- Chandrakar, S., & Gupta, A. K. 2019. Actinomycin-producing endophytic *Streptomyces parvulus* associated with root of aloe vera and optimization of conditions for antibiotic production. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(3), 1055-1069.
- Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R. and Shrivastava, S. (2013). Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3, 83–94.
- Chen, S., Cheng, L., Huang, H., Zou, F., & Zhao, H. P. (2017). Fabrication and properties of poly (butylene succinate) biocomposites reinforced by waste silkworm silk fabric. *Composites part A: Applied Science and Manufacturing*, 95, 125-131.
- Chen, W., Ye, K., Zhu, X., Zhang, H., Si, R., Chen, J., ... & Han, B. 2021. Actinomycin X<sub>2</sub>, an antimicrobial depsipeptide from marine-derived *Streptomyces cyaneofuscatus* applied as a good natural dye for silk fabric. *Marine drugs*, 20(1), 16.
- Crnovčić, I., Rückert, C., Semsary, S., Lang, M., Kalinowski, J., & Keller, U. (2017). Genetic interrelations in the actinomycin biosynthetic gene clusters of *Streptomyces antibioticus* IMRU 3720 and *Streptomyces chrysomallus* ATCC11523, producers of actinomycin X and actinomycin C. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry: AABC*, 10, 29.
- Dastager, S., Li, W. J., Dayanand, A., Tang, S. K., Tian, X. P., Zhi, X. Y., Xu, L. H. and Jiang, C. L. (2006). Separation identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1131–1134.
- Devi, S. (2018). Antimicrobials for Textile Finishes. In *Advances in Microbial Biotechnology* (pp. 211-230). Apple Academic Press.

- Dhananjeyan, V., Selvan, N. and Dhanapal, K. (2010). Isolation, characterization, screening and antibiotic sensitivity of Actinomycetes from Locally (Near MCAS) collected soil samples. *Journal of Biological Sciences*, 10(6), 514-519.
- Dorny, B., Csiszár, E. and Somlai, P. (2008). Improving quality of linen cotton fabrics with liquid ammonia treatment. *Journal of Natural Fibers*, 4(4), 41-57.
- Duportet, X.; Aggio, R.B.M.; Carneiro, S.; Villas-Boas, S.G. (2012). The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics*, 8, 410–421.
- El-Tarabily K.A., Nassar, A.H., Sivasithamparam, K. (2008). Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Appl Soil Ecol* 39(2):161–171
- El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem.*;38(7):1505–1520.
- Faruk, O., Bledzki, A. K., Fink, H. P. and Sain, M. (2012). Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. *Progress in Polymer Science*, 37(11), 1552–1596.
- Gao, Y. and Cranston, R. (2008). Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Textile Research Journal*, 78, 60–72.
- Gawish, S. M., Mashaly, H. M., Helmy, H. M., Ramadan, A. M. and Farouk, R. (2017). Effect of mordant on UV protection and antimicrobial activity of cotton, Wool, silk and nylon fabrics dyed with some natural dyes. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 8, 2.
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H. and Rai, M. (2015). Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 267–289.

- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K. I., Ludwig, W. and Whitman, W. E. (2012). *The Actinobacteria. In G.M. Garrity (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition*. Springer-Verlag, New York.
- Guaratini, C. C. I. and Zanomi, M. V. B. (2000). Textile dyes. *Química Nova*, 23(1), 71-78.
- Gutarowska, B., Machnowski, W. and Kowzowicz, U. (2013). Antimicrobial activity of textiles with selected dyes and finishing agents used in the textile industry. *Fibers and Polymers*, 14(3), 415-422.
- Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T., Tabuchi, A., Sen, K. and Shibai, H. (2005). Isolation of Novel Bacteria and Actinomycetes Using Soil-Extract Agar Medium. *J. Biosci. Bioeng.* 5, 485-492.
- Han, S. B., Kim, H. M., Kim, Y. H., Lee, C. W., Jang, E. S., Son, K. H., Kim, S. U. and Kim, Y. K. (1998). T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *International Journal of Immunopharmacology*, 20, 1-13.
- Harashima, K., Tsuchida, N., Tanaka, T., & Nagatsu, J. (1967). Prodigiosin-25 C: isolation and the chemical structure. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(4), 481-489.
- Hassana, S. S. U. and Shaikhb, A. L. (2017). Marine actinobacteria as a drug treasure house. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87, 46-57.
- Heng, J. L. S. (2008). Isolation, characterization and Identification of actinomycetes from agriculture soils at semongok, sarawak. *African Journal of Biotechnology*, 7(20), 3700-3705.
- Höfer, D. and Hammer, T. R. (2011). Antimicrobial active clothes display no adverse effects on the ecological balance of the healthy human skin microflora. *International Scholarly Research Notices*, 8.
- Hollstein, U. (1974). Actinomycin. Chemistry and mechanism of action. *Chemical Reviews*, 74(6), 625-652.

- Hopwood, D. A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology*, 145(9), 2183-2202.
- Hopwood, D. A., K. F. Chater, and M. J. Bibb. (1995). Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model *streptomycete*. *Bio/Technology* 28:65-102.
- Imada, C. (2005). Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87, 59-63.
- Jackson, N., Czaplewski, L. and Piddock, L. J. V. (2018). Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(6), 1452-1459.
- Jeffrey, L. S. H. (2008). Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology*. 35 (7), 3697-3702.
- Jog, R., Nareshkumar, G., Rajkumar, S. (2016). Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. *Springer*, pp 33–45.
- Joshi, M., Ali, S. W. And Purwar, R. (2009). Ecofriendly antimicrobial finishing of textiles using bioactive agents based on natural products. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 34(3), 295-304.
- Jumpathong, J., Nuengchamnonng, N., Masin, K., Nakaew, N., & Suphrom, N. (2019). Thin layer chromatography-bioautography assay for antibacterial compounds from *Streptomyces* sp. TBRC 8912, a newly isolated actinomycin D producer. *Chiang Mai Journal of Science*, 46, 839-849.
- Kalia, S., Dufresne, A., Cherian, B. M., Kaith, B. S., Avérus, L., Njuguna, J. And Nassiopoulos, E. (2011). Cellulose-based bio-and nanocomposites: a review. *International Journal of Polymer Science*, 1–35.
- Keshavjee, S. And Farmer, P. (2012). Tuberculosis, drug, resistance, and the history of modern medicine. *The New England Journal of Medicine*, 367(10), 931-936.

- Khan, S.T. (2011). *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environ Microbiol Black Sci Pub.* 13:391–403.
- Kloos, W. E. and Musselwhite, M. S. (1975). Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Journal of Applied Microbiology*, 30, 381–385.
- Klunk, C., Domingues, E. and Wiss, K. (2014). Review An update on diaper dermatitis. *Clinics in Dermatology*, 32(4), 477-87.
- Kunz, A., Peralta-Zamora, P., Moraes, S. G. D. and Durán, N. (2002). Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, 25 (1), 78–82.
- Kurosawa K., Bui V.P., van Essendelft J.L., Willis L.B., Lessard P.A., Ghiviriga I., Sambandan T.G., Rha C.K. and Sinskey A.J. (2006). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(1): 145- 154.
- Lambert, D. H., & Loria, R. (1989). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 393-396.
- Lambert, J. B. (1998). Traces of the past: Unraveling the secrets of archaeology through chemistry. *Journal of Chemical Education*, 75(7), 808.
- Latch, D. E., Packer, J. L., Arnold, W. A. and McNeill, K. (2003). Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: cimetidine and ranitidine. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 158, 63.
- Lechevalier, H. A. and Pine, L. (1974). *The Actinomycetes*. Handbook of Microbiology: Cleveland, 194-211.
- Lee, C. L., Wang, J. J., Kuo, S. L. and Pan, T. M. (2006). Advances in food and nutrition research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 1254–1262.
- Lee, H. J., Han, S. I., & Whang, K. S. (2012). *Streptomyces gramineus* sp. nov., an antibiotic-producing actinobacterium isolated from bamboo (*Sasa borealis*) rhizosphere soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62 (Pt\_4), 856-859.

- Leyden, J. J., Mcginley, K. J., Holzle, E., Labows, J. N. and Kligman, A. M. (1981). The microbiology of the human axilla and its relationship to axillary odor. *Journal of Investigative Dermatology*, 77, 413–416.
- Liu, C. W., Lu, Y. Y., Yang, Z. Z., Xing, Y. Y., & Xi, T. (2010). Rapid screening and characterization of metabolites from a marine-derived actinomycete by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(23), 3413-3418.
- Low, A.L.M., Mohamad, S.A.S. and Abdullah, M.F.F. (2015). Taxonomic Diversity and Antimicrobial Activities of Actinomycetes from Manure Composts. *Research Journal of Microbiology*. 10: 513-522.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P. and Whitman, W. B. (2012). *Road map of the phylum Actinobacteria*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer, 1–28.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., Kim, S. (2013a). Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 263–274.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Se-Kwon Kim. (2013). Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 29, 1737–1750.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S. (2013b). Actinobacterial melanins: current status and perspective for the future. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 1737–1750.
- Mao, J. and Murphy, L. (2001). Durable freshness for textile. *AATCC Review*, 1(9), 28–31.
- Mauger, A. B., & Thomas, W. A. (1981). NMR studies of actinomycins varying at the proline sites. *Organic Magnetic Resonance*, 17(3), 186-190.

- Mavrodi, D. V., Blankenfeldt, W., and Thomashow, L. S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu Rev Phytopathol*, 44, 417–445.
- Montefiori, D. C. and Zhou, J. (1991). Selective antiviral activity of synthetic soluble L-Tyrosine and L-DOPA melanins against human immunodeficiency virus *in vitro*. *Antiviral Research*, 15, 11–25.
- Naikpatil, S. V., and Rathod J. L. (2011). Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*, 3(10), 48-53.
- Natsch, A., Gfeller, H., Gygax, P., Schmid, J. and Acuna, G. (2003). A specific bacterial aminoacylase cleaves odorant precursors secreted in the human axilla. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5718-27.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., ... & Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12215-12220.
- Patzer, S.I., Volkmar, B. (2010). Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. *J Bacteriol.* 192:426–35.
- Pinu, F. R., Villas-Boas, S. G., & Aggio, R. (2017). Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: quenching and extraction protocols. *Metabolites*, 7(4), 53.
- Pook-In, G., Seangsupa, K., and Upakut, S. (2019). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the cotton fabrics treated with the crude finish produced from *Streptomyces* sp. strain AC4. *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, 12(1), 44-53.
- Poongodi, S., Karuppiah, V., Sivakumar, K. and Kannan, L. (2012). Marine actinobacteria of the coral reef environment of the Gulf of Mannar Biosphere Reserve, India:

- A search for antioxidant property. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(5), 975-1491.
- Pratiwi, R. H. (2018). UICC B-92. *Proceedings Book*.
- Purwar, R., and Joshi, M. (2004). Recent developments in antimicrobial finishing of textiles a review. *AATCC Review*, 4, 22–26.
- Qureshi, K. A., Bholay, A. D., Rai, P. K., Mohammed, H. A., Khan, R. A., Azam, F., ... & Prajapati, D. K. (2021). Isolation, characterization, anti-MRSA evaluation, and in-silico multi-target anti-microbial validations of actinomycin X<sub>2</sub> and actinomycin D produced by novel *Streptomyces smyrnaeus* UKAQ\_23. *Scientific reports*, 11(1), 1-21.
- Raisainen, R., Nousiainen, P. and Hynninen, P. H. (2002). Dermorubin and 5-chlorodermorubin natural anthraquinone carboxylic acids as dyes for wool. *Textile Research Journal*, 72, 973-976.
- Ramirez-Rodriguez, L., Stepanian-Martinez, B., Morales-Gonzalez, M., & Diaz, L. (2018). Optimization of the cytotoxic activity of three *Streptomyces* strains isolated from guaviare river sediments (Colombia, South America). *BioMed Research International*, 2018.
- Riaz, B. Dilshad, H. Muhammad, N. U. H., Rajput, A. W. and Rana, A. (2019). Eco-friendly route for dyeing of cotton fabric using three organic mordants in reactive dyes. *Industria Textila*, 70(1), 25-29.
- Robinson, T., Singh, D., Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production, *Appl Microbiol Biotechnol*, 55, 284-289.
- Roche, J. (1994). *The International Cotton Trade*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd, 5.
- Rodgers, G. L., Mortensen, J., Fisher, M. C., Lo, A., Cresswell, A. and Long, S. S. (2000). Predictors of infectious complications after burn injuries in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 19(10), 990-5.



- Rudd BAM (1978) Genetics of pigmented secondary metabolites in *Streptomyces coelicolor*. PhD thesis. University of East Anglia, Norwich.
- Samanta, A. K. and Konar, A. (2011). *Dyeing of textiles with natural dyes*. In: *Kumbasar EPA (ed) Natural dyes*. InTech: Rijeka, 29–56.
- Saravana Kumar, P., Al-Dhabi, N. A., Duraipandiyan, V., Balachandran, C., Praveen Kumar, P., & Ignacimuthu, S. (2014). In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. *BMC microbiology*, 14(1), 1-12.
- Sevevtekin, N. and Ucarci, O. (1993). The damage caused by microorganisms to cotton fabrics. *Journal of the Textile Institute*, 84, 304-312.
- Sharma, M., & Manhas, R. K. (2019). Purification and characterization of actinomycins from *Streptomyces* strain M7 active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant *Enterococcus*. *BMC microbiology*, 19(1), 1-14.
- Shirling, E. T., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Singh, M., Adedeji, A., & Santra, D. (2018). Physico-chemical and functional properties of nine proso millet cultivars. *Transactions of the ASABE*, 61(3), 1165-1174.
- Singh, R., Jainb, A., Panwarb, S., Guptab, D. and Khare, S. K. (2005). Antimicrobial activity of some natural dyes. *Dyes Pigm*, 66, 99–102.
- Sivaperumal, P., Kamala, K., Rajaram, R. and Mishra, S. S. (2014). Melanin from marine *Streptomyces* sp. (MVCS13) with potential effect against ornamental fish pathogens of *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) Biocatal. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 3, 134-141.
- Sriwiriyan, S., Ninpesh, T., Sukpondma, Y., Nasomyon, T., & Graidist, P. (2014). Cytotoxicity screening of plants of genus *Piper* in breast cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(6), 921-928.

- Strohl, W. R. (2004). Antimicrobials. *Microbial Diversity and Bioprospecting*. Washington D. C., ASM Press, 336-355.
- Subramanian, M. (2005). Natural Dyes, a glimpse. *Textile Asia*, 3, 32.
- Taher, N. A., Husen, A. S., Mahmood, Z. S., & Shanior, G. J. (2020). A study on actinorhodin like substance production by *Streptomyces* IQ 45. *Al-Mustansiriyah J Sci*, 31, 6-13.
- Thiry, M. C. (2001). Textile solutions for the soldier. *AATCC REV*, 1(9), 12-13.
- Ticoalu, A., Aravinthan, T. and Cardona, F. (2010). *A review of current development in natural fiber composites for structural and infrastructure applications*. Southern Region Engineering Conference, November 2010.
- Valdés, R., Castillo, F., and Cabello, J. (2017). Review of antibacterial activity of plant extracts and growth-promoting microorganism (Gpm) against phytopathogenic. *Eur. J.* 4, 11–36.
- Valli, S., Suvathi, S. S., Aysha, O. (2012). Antimicrobial potential of *Actinomycetes* species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 469-73.
- Venil, C. K. and Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, 5(3), 49-61.
- Vigo, T. L. and Benjaminson, M. A. (1981). Antibacterial fiber treatment and disinfection. *Textile Research Journal*, 51(7), 454.
- Villas-Boas, S.G.; Roeseener, U.; Hansen, M.A.E.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. *Metabolomics Analysis: An Introduction*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2007.
- Waksman, S. A., and Woodruff, H. B. (1940). Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil Actinomyces. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*, 45(2), 609-614.

- Wang, D., Wang, C., Gui, P., Liu, H., Khalaf, S. M., Elsayed, E. A., ... & Zhu, W. 2017. Identification, bioactivity, and productivity of actinomycins from the marine-derived *Streptomyces heliomycini*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1147.
- Wang, D., Wang, C., Gui, P., Liu, H., Khalaf, S. M., Elsayed, E. A., ... & Zhu, W. (2017). Identification, bioactivity, and productivity of actinomycins from the marine-derived *Streptomyces heliomycini*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1147.
- Wang, F., Yan, B., Li, Z., Wang, P., Zhou, M., Yu, Y., ... & Wang, Q. (2021). Rapid antibacterial effects of silk fabric constructed through enzymatic grafting of modified PEI and AgNP deposition. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(28), 33505-33515.
- Wasif, A. I. and Laga, S. K. (2009). Use of nano silver as an antimicrobial agent for cotton. *Autex Research Journal*, 9, 5-13.
- Wei, Z., Xu, C., Wang, J., Lu, F., Bie, X., & Lu, Z. 2017. Identification and characterization of *Streptomyces flavogriseus* NJ-4 as a novel producer of actinomycin D and holomycin. *PeerJ*, 5, e3601.
- Weycker, D., Strutton, D., Edelsberg, J., Sato, R. and Jackson, L. A. (2010). Clinical and economic burden of pneumococcal disease in older US adults. *Vaccine*, 28, 4955–60.
- Wollina, U., Abdel-Naser, M. B. and Verma, S. B. (2006). Skins physiology and textiles-consideration of basic interactions, biofunctional textiles and the skin. *Current Problems in Dermatology*, 33, 1-16.
- Yamaç, M., & Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical biology*, 44(9), 660-667.
- Zothanpuia, P., Passari, A., & Singh, B. P. (2015). Molecular characterization of actinomycetes isolated from Tuichang river and their biosynthetic potential. *Science Vision*, 15, 136-144.



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนครพนม

### ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. อาหาร Peat moss extract (Hamaki et al., 2005)

Peat moss	200	กรัม
Sodium hydroxide	2	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH	5	

1. เตรียมสารละลาย sodium hydroxide ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่ง sodium hydroxide น้ำหนัก 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. ชั่ง peat moss น้ำหนัก 200 กรัม ใส่ในสารละลาย sodium hydroxide ที่เตรียมไว้
3. นำไป sonicate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. กรอง peat moss ด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร และนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5
5. เติมผงวุ้น โดยคิดเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)
6. นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 2. อาหาร Starch casein agar (SCA) (Jeffrey, 2008)

Soluble starch	10	กรัม
Casein hydrolysate	0.3	กรัม
KNO <sub>3</sub>	2.0	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	กรัม

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01	กรัม
Agar	15	กรัม
pH	7	

### 3. อาหาร Oatmeal agar (OMA) (Low et al, 2015)

Oatmeal	30	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH	7.2	

1. ชั่ง oatmeal น้ำหนัก 30 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดดูแรงแนวนขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. นำไป sonicate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร และนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.2
4. เติมผงวุ้น โดยคิดเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)
5. นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

### 4. อาหาร International Streptomyces Project Medium 2 (ISP2) (Shirling and Gottlieb, 1966)

Malt extract	10	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Dextrose Anhydrous (AR)	4	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH	7	

1. ชั่ง malt extract น้ำหนัก 10 กรัม yeast extract น้ำหนัก 4 กรัม และ dextrose anhydrous น้ำหนัก 4 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 750 มิลลิลิตร ที่อยู่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. นำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 และปรับปริมาตรอาหารด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร
3. นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 5. อาหารร่ำสกัดน้ำมัน

ร่ำสกัดน้ำมัน	30	กรัม
Agar	10	กรัม
pH	7	

1. ชั่งร่ำสกัดน้ำมันน้ำหนัก 30 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดดูแรงแนขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. นำไป sonicate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร และนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7
4. เติมผงวุ้น โดยคิดเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)
5. นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข ผลการผลิตรงควัตถุจากแอคติโนแบคทีเรียในอาหารแห้ง

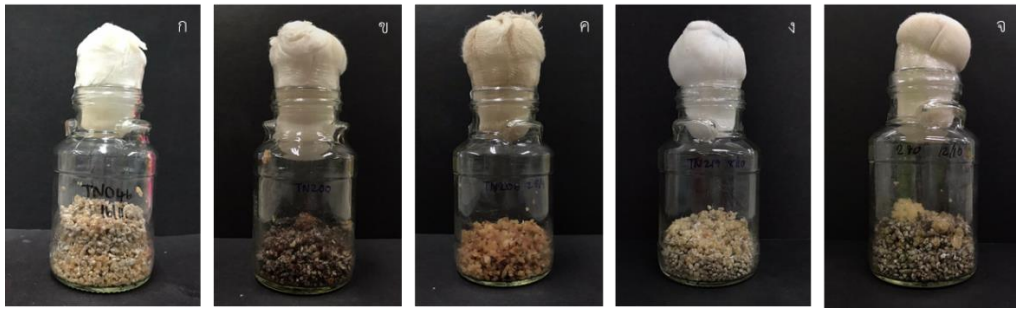


ภาพ 23 ลักษณะแอคติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีชมพู  
 ก) ไอโซเลต TN005 ข) ไอโซเลต TN012 ค) ไอโซเลต TN019 ง) ไอโซเลต TN041 จ) ไอโซเลต  
 TN102 ฉ) ไอโซเลต TN136 ล) ไอโซเลต TN173 ล) ไอโซเลต TN195 ล) ไอโซเลต TN254 ล) ไอโซเลต  
 TN257 และ ฉ) ไอโซเลต TN189



ภาพ 24 ลักษณะแอคติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีเหลือง  
 ก) ไอโซเลต TN015 ข) ไอโซเลต TN021 ค) ไอโซเลต TN068 ง) ไอโซเลต TN072 จ) ไอโซเลต  
 TN165 ฉ) ไอโซเลต TN076 ล) ไอโซเลต TN310 ล) ไอโซเลต TN183 ล) ไอโซเลต TN196 ล) ไอโซเลต  
 TN213 ล) ไอโซเลต TN281 ล) ไอโซเลต TN293 และ ล) ไอโซเลต TN301





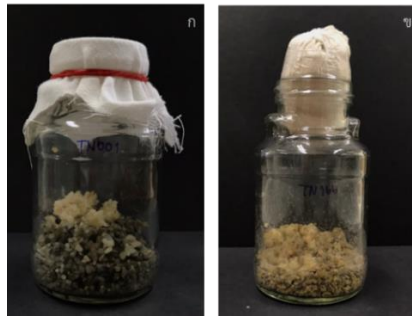
ภาพ 25 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีน้ำตาล  
 ก) ไอโซเลต TN046 ข) ไอโซเลต TN200 ค) ไอโซเลต TN206 ง) ไอโซเลต TN219 และ จ) ไอโซเลต TN280



ภาพ 26 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีเทา  
 ก) ไอโซเลต TN105 ข) ไอโซเลต TN167 ค) ไอโซเลต TN170 ง) ไอโซเลต TN235 จ) ไอโซเลต TN262 และ ฉ) ไอโซเลต TN263

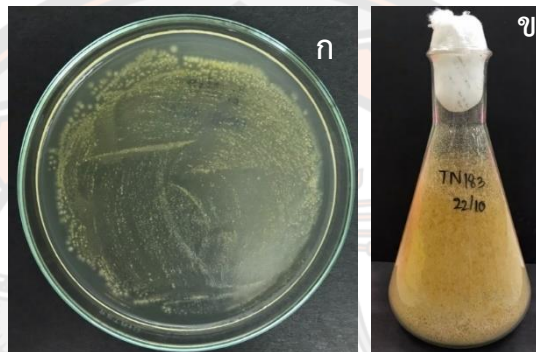


ภาพ 27 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีม่วง  
 ก) ไอโซเลต TN215



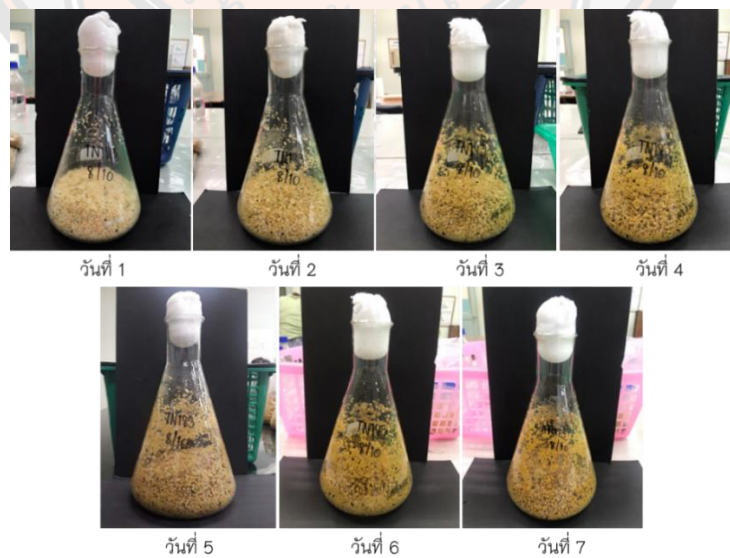
ภาพ 28 ลักษณะแอกติโนแบคทีเรียที่เจริญบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน ในกลุ่มสีเขียวซีม่า

ก) ไอโซเลต TN001 และ ข) ไอโซเลต TN166



ภาพ 29 รังควัตถุสีจากแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 ที่เลี้ยงบนวัสดุหลงเหลือทางการเกษตรเป็นเวลา 7 วัน

ก) อาหารร่ำกัदन้ำมัน และ ข) อาหารร่ำกัदन้ำมันผสมปลายข้าว



ภาพ 30 รังควัตถุสีจากแอกติโนแบคทีเรียไอโซเลต TN183 ที่เลี้ยงบนปลายข้าวเป็นเวลา 7 วัน

ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมน้ำยาฟ่น Anisaldehyde-sulfuric acid

Methanol (AR)	85	มิลลิลิตร
Acetic acid	10	มิลลิลิตร
Sulphuric acid	5	มิลลิลิตร
Anisaldehyde	1	มิลลิลิตร

1. เตรียมสารละลาย methanol ปริมาตร 85 มิลลิลิตร
2. ค่อยๆ เติมสาร acetic acid ลงในสารละลาย methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
3. ค่อยๆ เติมสาร sulphuric acid ลงในสารละลาย methanol ที่ผสมสาร acetic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
4. เติมสาร anisaldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ เก็บสารละลายไว้ให้พ้นแสงที่อุณหภูมิเท่ากับ 4-8 องศาเซลเซียส

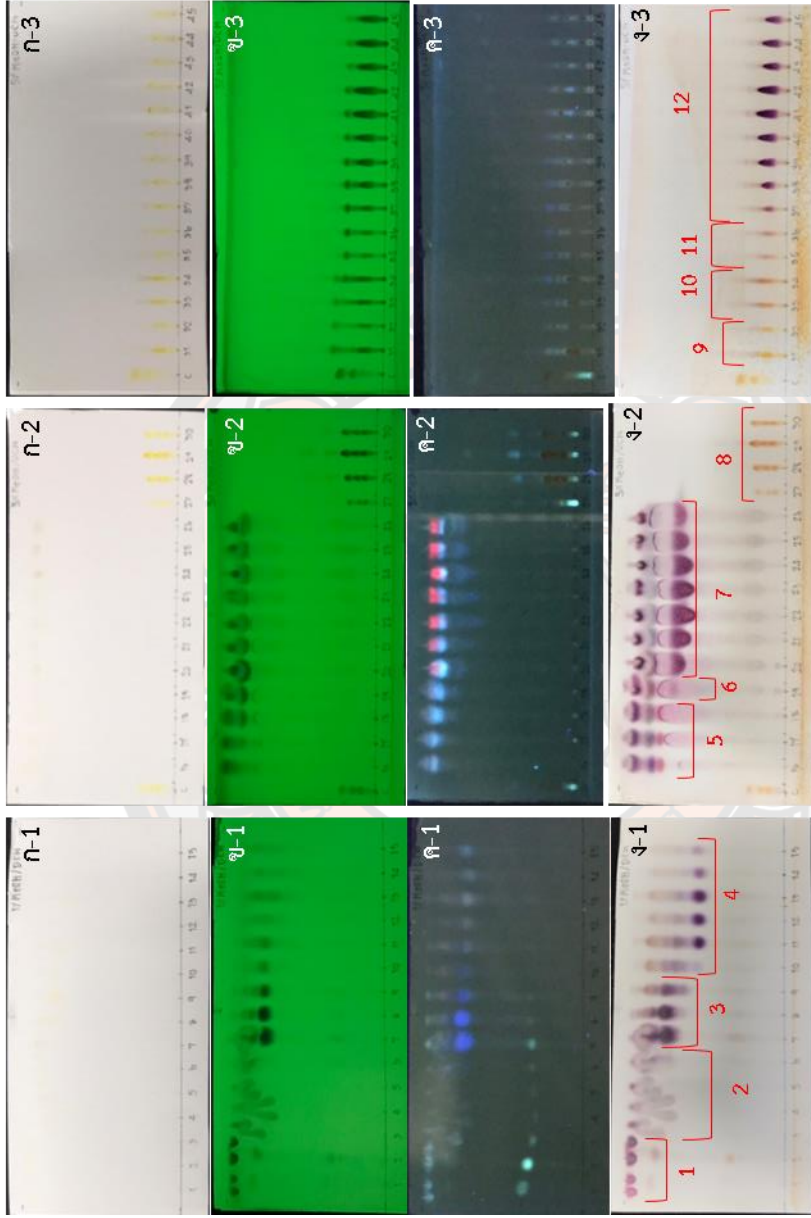
## ภาคผนวก ง ผลการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดแอคติโนแบคทีเรีย

ตาราง 12 การแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดไอโซเลต TN183 (3.02 กรัม)

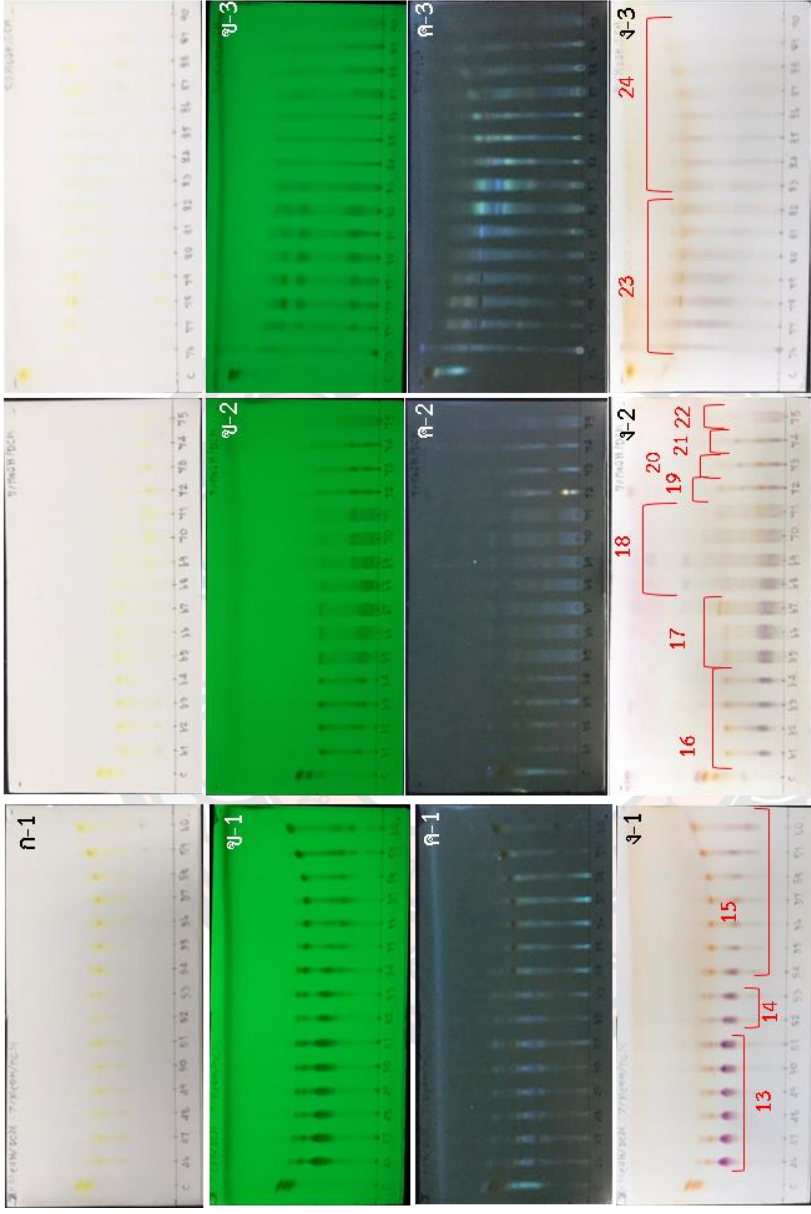
ลำดับที่	ส่วนแยกย่อย	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1	G.1	40	Dichloromethane	68.1
2	G.2	80	Dichloromethane	804.7
3	G.3	60	Dichloromethane	20.4
4	G.4	120	Dichloromethane	13.8
5	G.5	60	Dichloromethane	16
6	G.6	20	Dichloromethane	13.9
7	G.7	140	Dichloromethane	100.1
8	G.8	80	5% Methanol ใน Dichloromethane	1178.6
9	G.9	40	5% Methanol ใน Dichloromethane	13.4
10	G.10	40	5% Methanol ใน Dichloromethane	6.5
11	G.11	40	5% Methanol ใน Dichloromethane	6.6
12	G.12	180	5% Methanol ใน Dichloromethane	36.8
13	G.13	120	5% Methanol ใน Dichloromethane	8.2
14	G.14	40	7% Methanol ใน Dichloromethane	1.8
15	G.15	140	7% Methanol ใน Dichloromethane	25.5
16	G.16	80	10% Methanol ใน Dichloromethane	30.7
17	G.17	60	10% Methanol ใน Dichloromethane	7.8
18	G.18	20	10% Methanol ใน Dichloromethane	7.3
19	G.19	20	10% Methanol ใน Dichloromethane	4.8
20	G.20	20	10% Methanol ใน Dichloromethane	3.9
21	G.21	20	10% Methanol ใน Dichloromethane	6.6
22	G.22	20	10% Methanol ใน Dichloromethane	1.8
23	G.23	140	20% Methanol ใน Dichloromethane	62.5

ลำดับที่	ส่วนแยก ย่อย	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
24	G.24	160	30% Methanol ใน Dichloromethane	125.2
25	G.25	300	40-70% Methanol ใน Dichloromethane	77.5
26	G.26	620	80% Methanol ใน Dichloromethane	72.2
รวม				2714.7

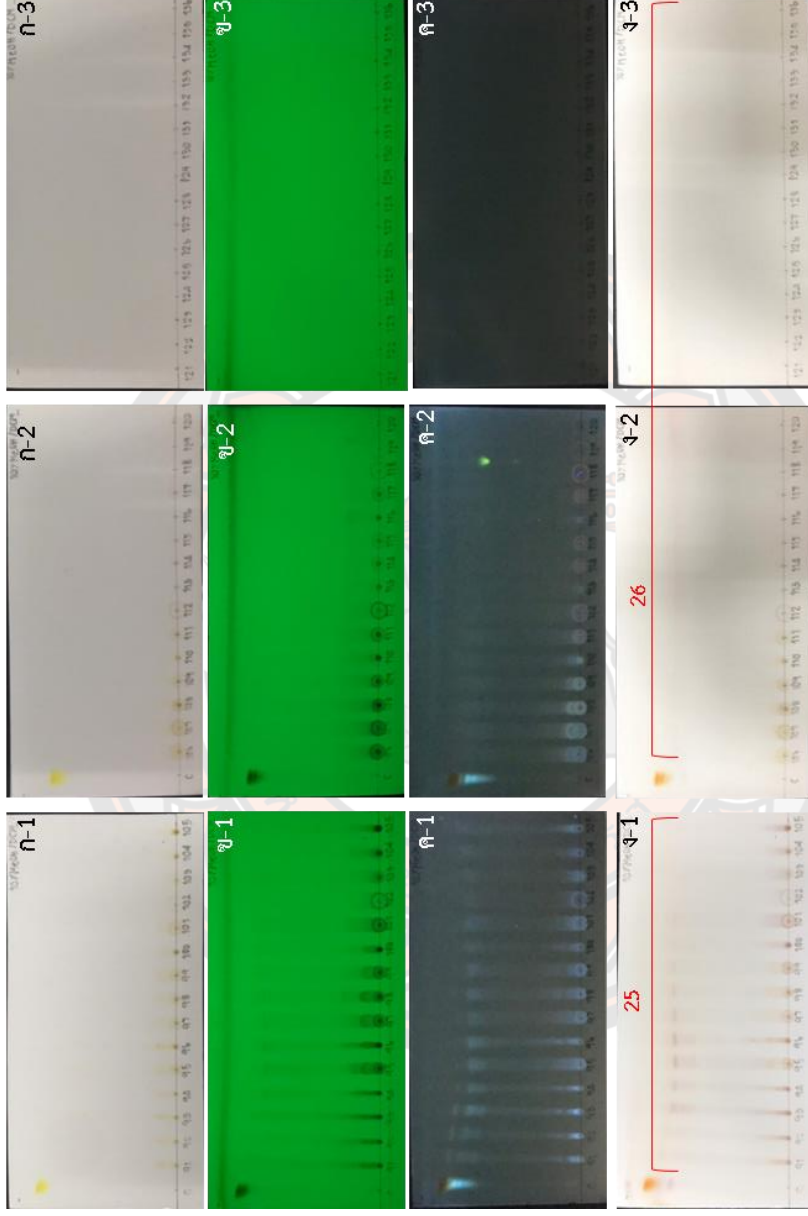




ภาพ 31 TLC profile สารสกัด TN183 จากเอทิลอะซิเตท ของแต่ละหลอดที่ทำการบั่นทึกลง หลอดที่ 1-45 โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรฟอร์ม และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรฟอร์มเคลื่อนที่; TLC profile (ก-1-ก-2-ก-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ค-1-ค-2-ค-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีกพันด้วย สารละลาย anisaldehyde - sulfuric acid (ง-1-ง-2-ง-3)



ภาพ 32 TLC profile สารสกัด TN183 จากเอทิลอะซิเตท ของแต่ละหลอดที่ทำการปั่นที่กลม หลอดที่ 46-90 โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นเฟสเคลื่อนที่; TLC profile (น-1-น-2-น-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ค-1-ค-2-ค-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีดพ่นด้วย สารละลาย anisaldehyde - sulfuric acid (จ-1-จ-2-จ-3)



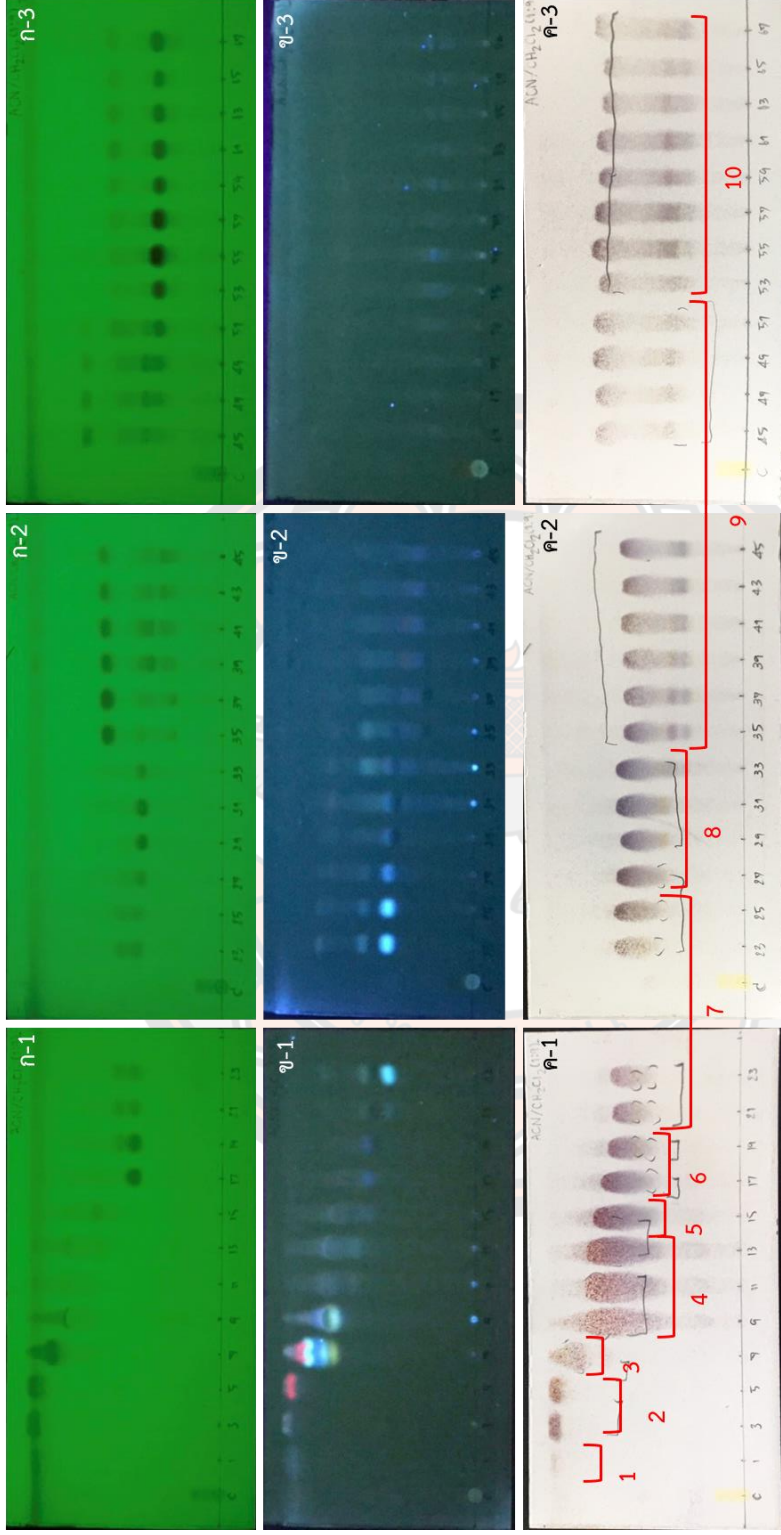
ภาพ 33 TLC profile สารสกัด TN183 จากเอทิลอะซิเตท ของแต่ละหลอดที่ทำการบ่มที่ผล หลอดที่ 91-136 โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นเฟสเคลื่อนที่; TLC profile (n-1-n-2-n-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ค-1-ค-2-ค-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีกพันด้วย สารละลาย anisaldehyde – sulfuric acid (ง-1-ง-2-ง-3)



ตาราง 13 การแยกสารสกัดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของกลุ่มที่ 8 ที่แยกได้จากคอลัมน์ที่ 1 (500 มิลลิกรัม)

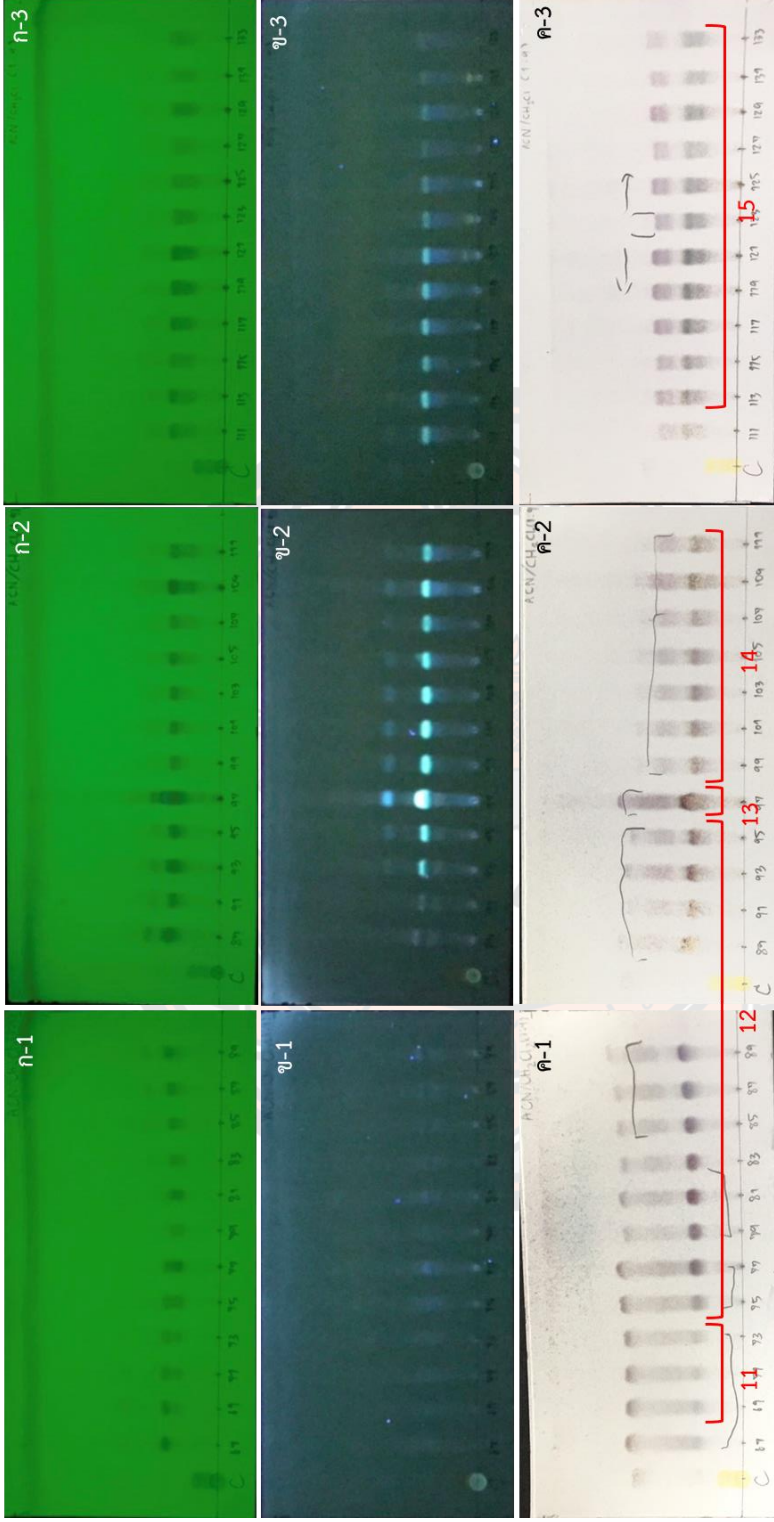
ลำดับที่	Fraction	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1	SG.1	12	Chloroform	0.8
2	SG.2	18	Chloroform	2.2
3	SG.3	12	Chloroform	9.6
4	SG.4	22	Chloroform	49.7
5	SG.5	5	Chloroform	16.7
6	SG.6	10	Chloroform	15.9
7	SG.7	18	Chloroform	13.5
8	SG.8	18	Chloroform	10.4
9	SG.9	48	Chloroform	18.7
10	SG.10	40	Chloroform	8
11	SG.11	15	Chloroform	1.8
12	SG.12	55	Chloroform	10.6
13	SG.13	5	Chloroform	0.6
14	SG.14	35	Chloroform	2.6
15	SG.15	25	Chloroform	1.1
16	SG.16	23	Chloroform	21.4
17	SG.17	45	Chloroform	2.3
18	SG.18	18	Chloroform	0.8
19	SG.19	108	Chloroform	2.2
20	SG.20	50	Chloroform	7.5
21	SG.21	30	0.5% Acetone ใน Chloroform	1.4
22	SG.22	35	0.5% Acetone ใน Chloroform	5.7
23	SG.23	50	0.5% Acetone ใน Chloroform	22.4
24	SG.24	58	0.5% Acetone ใน Chloroform	25.7

ลำดับที่	Fraction	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
25	SG.25	55	1% Acetone ใน Chloroform	19.7
26	SG.26	130	1% Acetone ใน Chloroform	31.9
27	SG.27	220	2% Acetone ใน Chloroform	47.8
28	SG.28	24	10% Acetone ใน Chloroform	16.2
29	SG.29	90	10% Acetone ใน Chloroform	8.7
30	SG.30	6	50% Acetone ใน Chloroform	8
31	SG.31	67	50% Acetone ใน Chloroform	6.1
32	SG.32	38	50% Acetone ใน Chloroform	3.1
33	SG.33	25	100% Acetone	1.5
34	SG.34	100	100% Acetone	3.9
35	SG.35	100	100% Acetone	2.6
36	SG.36	150	100% Methanol	11.7
37	SG.37	100	100% Methanol	2.9
รวม				415.7



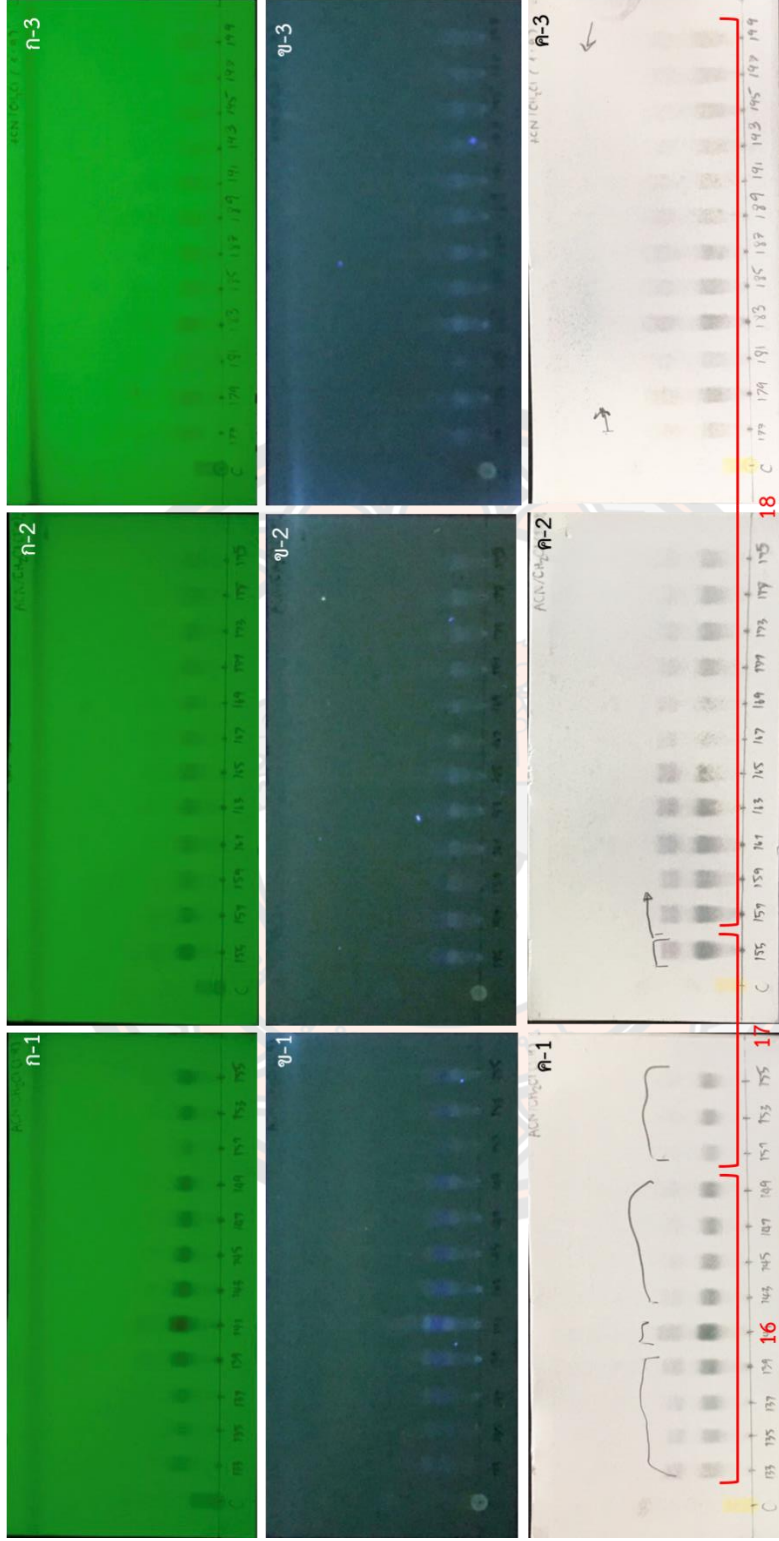
ภาพ 34 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 1-67

โดยใช้อะซิโตนในคลอโรฟอร์มเป็นเฟสเคลื่อนที่; TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (ก-1-ก-2-ก-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีดพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid (ค-1-ค-2-ค-3)



ภาพ 35 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 67-133

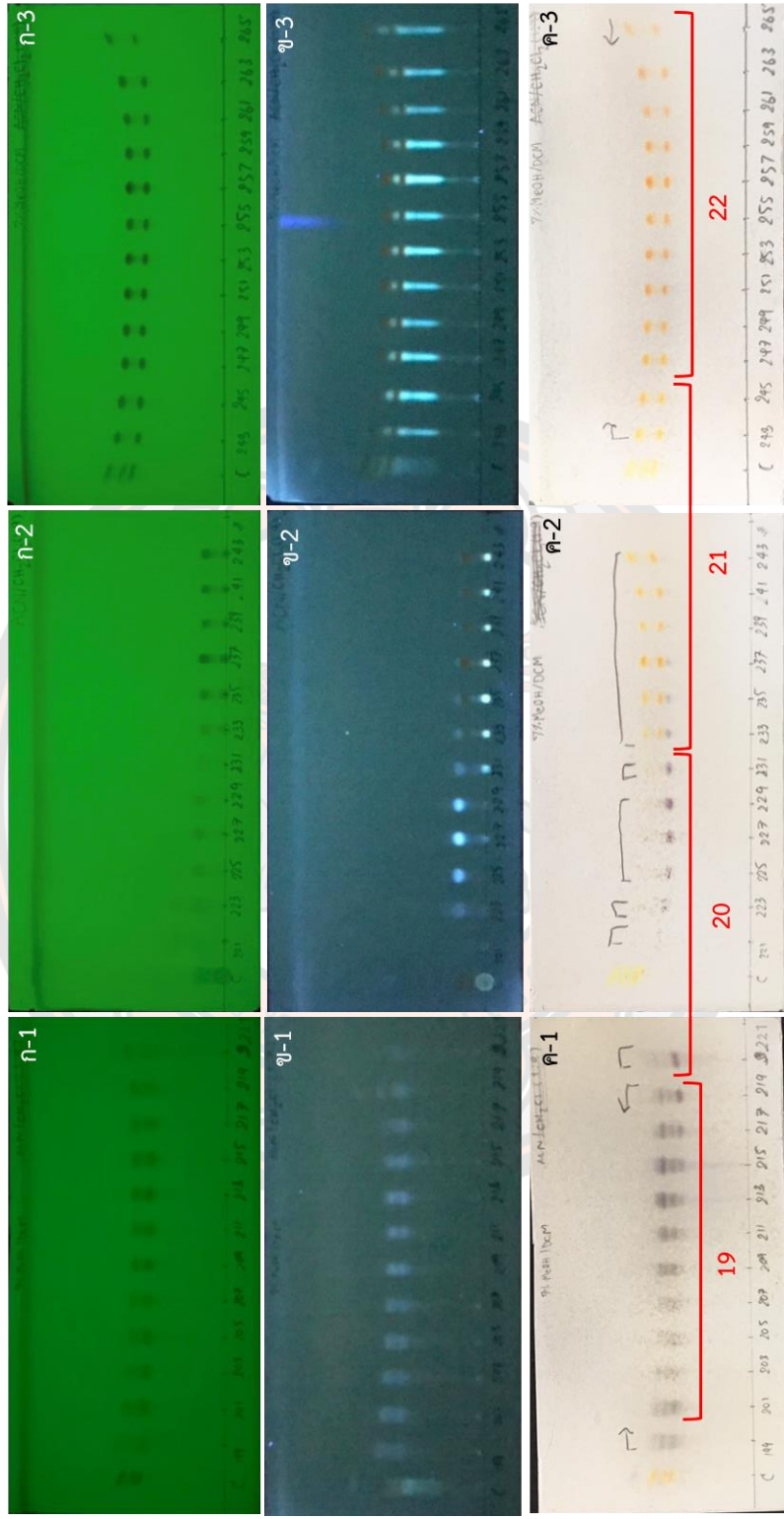
โดยใช้อะซิโตนในคลอโรฟอร์มเป็น เฟสเคลื่อนที่; TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (n-1-n-2-n-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีดพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid (ค-1-ค-2-ค-3)



ภาพ 36 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 133-199

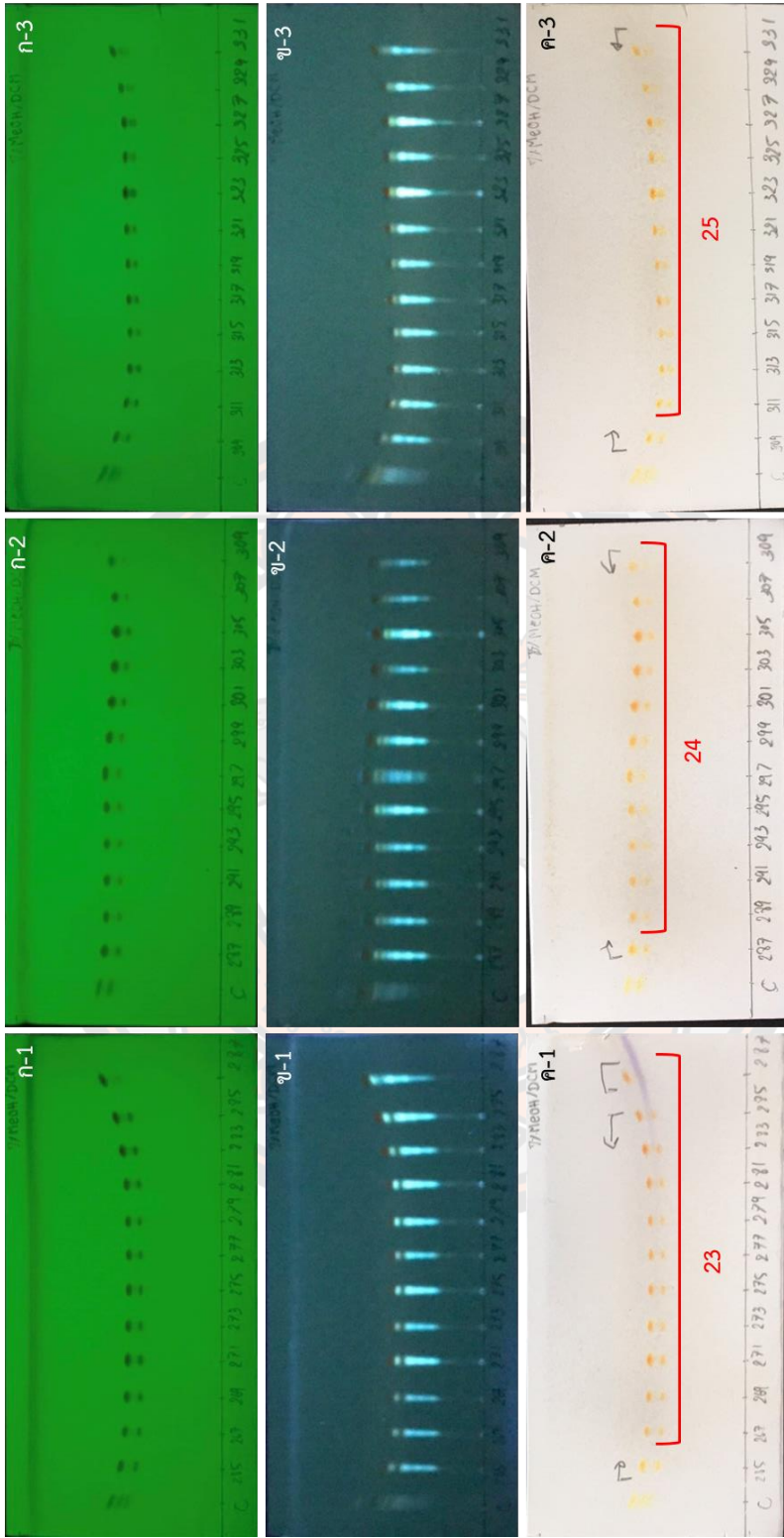
โดยใช้อะซิโตนในคลอโรฟอร์มเป็นเฟสเคลื่อนที่; TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (n-1-n-2-n-3), TLC profile

ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีกแผ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid (ค-1-ค-2-ค-3)



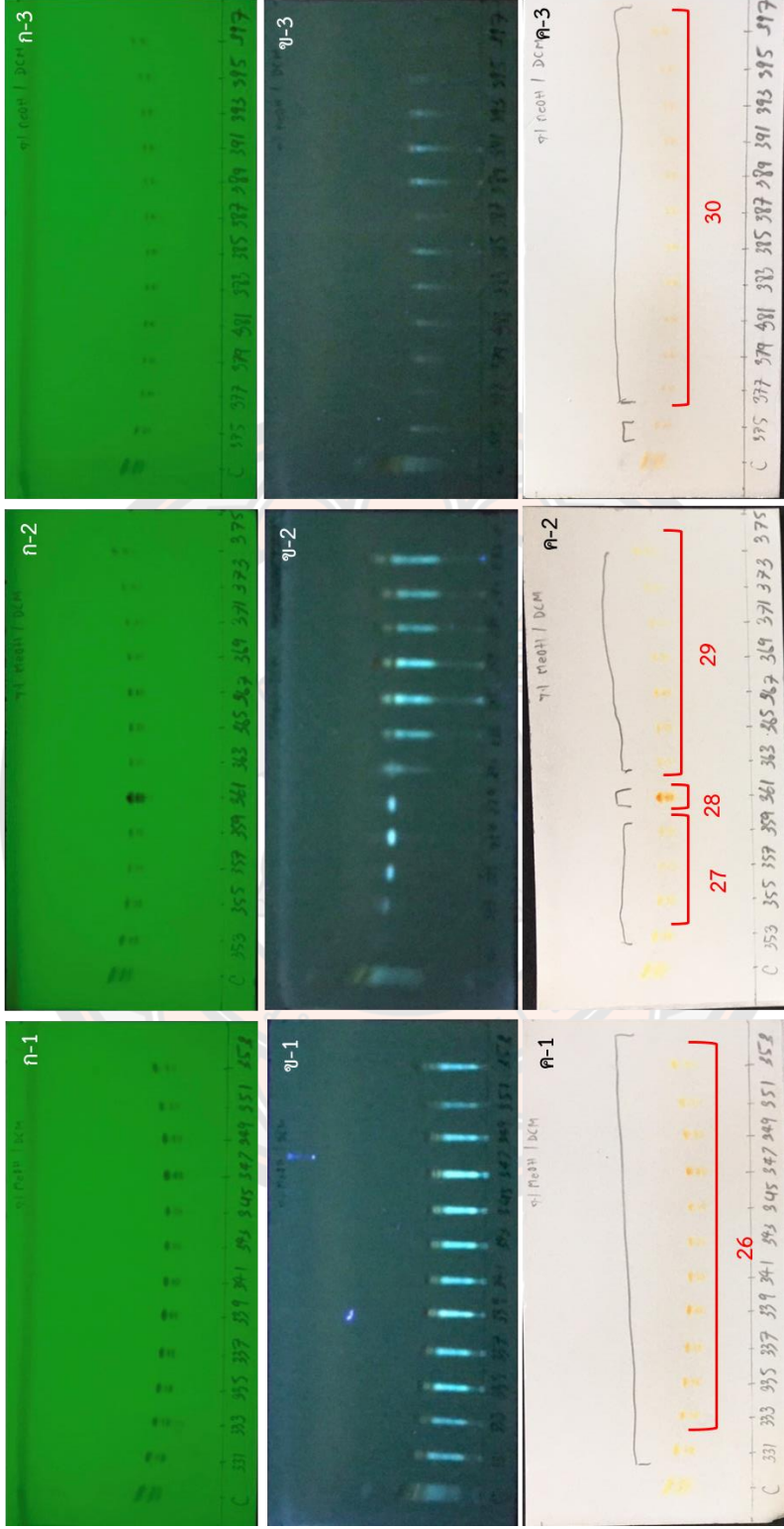
ภาพ 37 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 199-265

โดยใช้ 7 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในเฟสเคลื่อนที่; TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (ก-1-ก-2-ก-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีดพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid (ค-1-ค-2-ค-3)



ภาพ 38 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 265-331

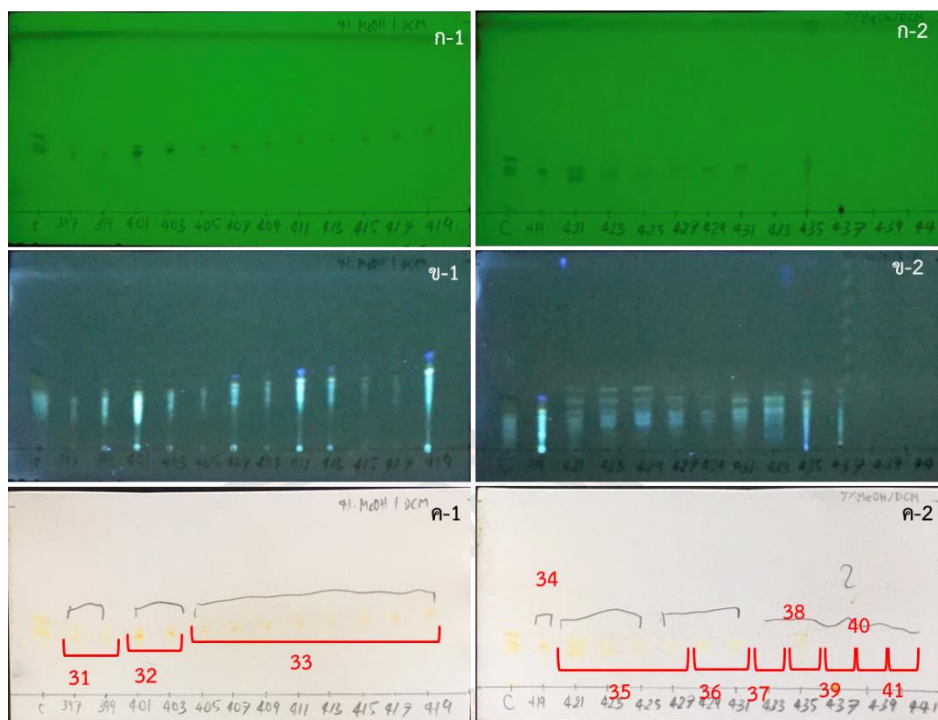
โดยใช้ 7 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นเฟสเคลื่อนที่; TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (n-1-n-2-n-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีกพันด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid (ค-1-ค-2-ค-3)



ภาพ 39 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 331-397

โดยใช้ 7 เปอร์เซ็นต์เมทานอลในเฮกเซนเป็นเฟสเคลื่อนที่; TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (น-1-น-2-น-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีกพันด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulfuric acid (ค-1-ค-2-ค-3)





ภาพ 40 TLC profile จากสารสกัดจากกลุ่มที่ 8 ที่ทำการเก็บผล หลอดที่ 397-441 โดยใช้ 7 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นเฟสเคลื่อนที่; TLC profile ภายใต้ UV ที่ 254 นาโนเมตร (ก-1-ก-2-ก-3), TLC profile ภายใต้ UV ที่ 365 นาโนเมตร (ข-1-ข-2-ข-3) และ TLC profile ภายใต้การฉีดย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde - sulfuric acid (ค-1-ค-2-ค-3)

ตาราง 14 ข้อมูลของสารกลุ่มแยกย่อยที่ทดสอบด้วยเทคนิค bioautography

ตัวอย่าง	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)		ระยะทางที่ตัว ทำละลาย เคลื่อนที่ (เซนติเมตร)	R <sub>f</sub> values		ตำแหน่งที่ สารออก ฤทธิ์
	ตำแหน่งที่	ตำแหน่งที่		ตำแหน่งที่	ตำแหน่งที่	
	1	2		1	2	
G8.SG 22	3.60	4.70	7	0.51	0.67	2
G8.SG 23	0.70	1.30	7	0.1	0.19	2
G8.SG 24	0.70	1.30	7	0.1	0.19	2
G8.SG 25	0.70	1.20	7	0.1	0.17	2
G8.SG 26	0.60	1.20	7	0.09	0.17	2
G8.SG 27	3.80	4.70	7	0.54	0.67	2
G8.SG 28	4.60	5.20	7	0.66	0.74	2
G8.SG 29	3.90	4.50	7	0.56	0.64	2
G8.SG 30	3.90	4.50	7	0.56	0.64	2
G8.SG 31	4.50	-	7	0.64	-	1

ตาราง 15 ข้อมูล ESI-QTOF-MS/MS ของสาร actinomycin D และรูปแบบการแตกหักโมเลกุลที่ตรวจพบ

ตัวอย่าง	t <sub>R</sub> (นาที)	Measurement (m/z, [M+H <sup>+</sup> ])	MS/MS	Molecular formula	Calculated (m/z, [M+H <sup>+</sup> ])	Error* (ppm)
G8.SG26	28.43	1255.6372		C <sub>62</sub> H <sub>87</sub> N <sub>12</sub> O <sub>16</sub>	1255.6358	-1.15
			1227.6386			
			1053.5019			
			956.4521			
			928.4580			
			857.3845			
			829.3893			
			657.2666			
			629.2713			
			558.1992			
			459.1300			
			399.2605			
			381.2490			

ตัวอย่าง	$t_R$ (นาที)	Measurement ( $m/z$ , [M+H <sup>+</sup> ])	MS/MS	Molecular formula	Calculated ( $m/z$ , [M+H <sup>+</sup> ])	Error* (ppm)
			354.2398			
			300.1922			
			282.1814			
			268.1661			
			203.1319			
			197.1287			
			169.0964			
			132.1015			
			100.0390			
G8.SG 27	28.294	1255.6385		C <sub>62</sub> H <sub>87</sub> N <sub>12</sub> O <sub>16</sub>	1255.6358	-2.19
			1227.6347			
			1053.5054			
			956.4550			
			928.4605			
			857.3864			
			829.3897			
			657.2686			
			629.2741			
			558.2004			
			459.1313			
			399.2613			
			381.2503			
			354.2402			
			300.1928			
			282.1822			
			268.1665			
			203.1397			
			197.1291			
			169.0975			
			132.1021			
			100.0390			
G8.SG 28	28.249	1255.6379		C <sub>62</sub> H <sub>87</sub> N <sub>12</sub> O <sub>16</sub>	1255.6358	-1.71
			1227.6402			

ตัวอย่าง	$t_R$ (นาที)	Measurement ( $m/z$ , $[M+H]^+$ )	MS/MS	Molecular formula	Calculated ( $m/z$ , $[M+H]^+$ )	Error* (ppm)
			1053.5023			
			956.4530			
			928.4576			
			857.3848			
			829.3877			
			657.2671			
			629.2718			
			558.1990			
			459.1305			
			399.2604			
			381.2499			
			354.2386			
			300.1924			
			282.1814			
			268.1654			
			203.1395			
			197.1286			
			169.0972			
			132.1018			
			100.0394			
สาร	28.411	1255.6368		$C_{62}H_{87}N_{12}O_{16}$	1255.6358	-0.84
มาตรฐาน			1227.6394			
actino-			1053.5029			
mycin D			956.4523			
			928.4563			
			857.3834			
			829.3862			
			657.2667			
			629.2739			
			558.1948			
			459.1300			
			399.2600			
			381.2491			

ตัวอย่าง	$t_R$ (นาที)	Measurement ( $m/z$ , [M+H <sup>+</sup> ])	MS/MS	Molecular formula	Calculated ( $m/z$ , [M+H <sup>+</sup> ])	Error* (ppm)
			354.2387			
			300.1920			
			282.1812			
			268.1652			
			203.1388			
			197.1283			
			169.0969			
			132.1015			
			100.0391			

หมายเหตุ \*ค่า Mass error (ppm) มีค่า <25 ppm เป็นค่าที่ยอมรับได้

ตาราง 16 ข้อมูล ESI-QTOF-MS/MS ของสาร actinomycin X<sub>2</sub> และรูปแบบการแตกหักโมเลกุลที่ตรวจพบ

ตัวอย่าง	$t_R$ (นาที)	Measurement ( $m/z$ , [M+H <sup>+</sup> ])	MS/MS	Molecular formula	Calculated ( $m/z$ , [M+H <sup>+</sup> ])	Error* (ppm)
G8.SG26	28.59	1269.6193		C <sub>62</sub> H <sub>85</sub> N <sub>12</sub> O <sub>17</sub>	1269.6150	-3.37
			1241.6224			
			970.4329			
			956.4537			
			871.3642			
			857.3852			
			829.3890			
			744.2966			
			657.2669			
			558.1992			
			459.1307			
			431.1355			
			399.2607			
			300.1921			
			282.1820			
			268.1656			
			203.1389			

ตัวอย่าง	$t_R$ (นาที)	Measurement ( $m/z$ , $[M+H]^+$ )	MS/MS	Molecular formula	Calculated ( $m/z$ , $[M+H]^+$ )	Error* (ppm)
			197.1281			
G8.SG27	28.306	1269.6218		$C_{62}H_{85}N_{12}O_{17}$	1269.6150	-5.34
			1241.6251			
			970.4346			
			956.4553			
			871.3868			
			857.3868			
			829.3905			
			744.3023			
			657.2684			
			558.2003			
			459.1315			
			431.1362			
			399.2615			
			300.1927			
			282.1817			
			268.1662			
			203.1396			
			197.1293			
G8.SG28	28.357	1269.6177		$C_{62}H_{85}N_{12}O_{17}$	1269.6150	-2.11
			1241.6202			
			970.4305			
			956.4522			
			871.3633			
			857.3842			
			829.3885			
			744.2988			
			657.2673			
			558.1989			
			459.1304			
			431.1357			
			399.2604			
			300.1923			

ตัวอย่าง	$t_R$ (นาที)	Measurement ( $m/z$ , $[M+H^+]$ )	MS/MS	Molecular formula	Calculated ( $m/z$ , $[M+H^+]$ )	Error* (ppm)
			282.1813			
			268.1664			
			203.1397			
			197.1281			
สาร	28.383	1269.6173		$C_{62}H_{85}N_{12}O_{17}$	1269.6150	-1.8
มาตรฐาน			1241.6203			
actino-			970.4309			
mycin X <sub>2</sub>			956.4525			
			871.3634			
			857.3843			
			829.3873			
			744.2990			
			657.2665			
			558.1987			
			459.1303			
			431.1346			
			399.2603			
			300.1919			
			282.1812			
			268.1660			
			203.1390			
			197.1286			

หมายเหตุ \*ค่า Mass error (ppm) มีค่า <25 ppm เป็นค่าที่ยอมรับได้

ตาราง 17 ข้อมูล ESI-QTOF-MS/MS ของสาร actinomycin X<sub>0β</sub> และรูปแบบการแตกหักโมเลกุลที่ตรวจพบ

ตัวอย่าง	$t_R$ (นาที)	Measurement ( $m/z$ , $[M+H^+]$ )	MS/MS	Molecular formula	Calculated ( $m/z$ , $[M+H^+]$ )	Error* (ppm)
G8.SG27	28.129	1271.6326		$C_{62}H_{87}N_{12}O_{17}$	1271.6307	-1.52
			972.4458			
			956.4533			
			873.3802			

ตัวอย่าง	$t_R$ (นาที)	Measurement ( $m/z$ , $[M+H]^+$ )	MS/MS	Molecular formula	Calculated ( $m/z$ , $[M+H]^+$ )	Error* (ppm)
			857.3833			
			657.2692			
			558.1977			
			530.2014			
			459.1311			
			399.2607			
			316.1853			
			300.1921			
			203.1386			
G8.SG28	28.167	1271.6332		$C_{62}H_{87}N_{12}O_{17}$	1271.6307	-1.99
			972.4464			
			956.4521			
			873.3788			
			857.3846			
			657.2687			
			558.1992			
			530.2044			
			459.1303			
			399.2604			
			316.1868			
			300.1919			
			203.1390			
สาร	4.87	1271.6258		$C_{62}H_{87}N_{12}O_{17}$	1271.6307	3.83
มาตรฐาน			972.4409			
actino-			956.4474			
mycin I			873.3741			
(Lui et			857.3822			
al., 2010)			657.2669			
			558.1960			
			530.2002			
			459.1268			
			399.2583			
			316.1854			



ตัวอย่าง	$t_R$ (นาที)	Measurement ( $m/z$ , $[M+H]^+$ )	MS/MS	Molecular formula	Calculated ( $m/z$ , $[M+H]^+$ )	Error* (ppm)
			300.1906			
			203.1400			

หมายเหตุ \*ค่า Mass error (ppm) มีค่า <25 ppm เป็นค่าที่ยอมรับได้

