บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อ Streptomyces ที่สร้างสารต่อต้านเชื้อราจากดินตัวอย่าง

จากดินตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อ Streptomyces ที่ผลิตสารต่อต้านเชื้อราได้ 6 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของเชื้อ Streptomyces ที่ผลิตสารต่อต้านเชื้อรา ซึ่งแยกได้จากดินตัวอย่าง

หมายเลข	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน	ลักษณะของเชื้อ Streptomyces ที่พบ
6	อ.โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี	โคโลนีเล็กสีครีม ค่อนข้างใส ลักษณะเปียก
7	อ.โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี	โคโลนีขนาดกลาง สีขาว ผิวหน้าด้าน สายใย เมื่อดูจากกล้องจุลทัศน์จะมีเส้นใหญ่
$21C_1$	อ.หนองจิก จ.ปัตตานี	โคโลนีขนาดกลาง สีขาวเทา ผิวหน้ายู่ เซลมีขนาดเล็กต่อกันเป็นสาย เซลค่อนข้างกลม
$21C_3$	อ. หนองจิก จ.ปัตตานี	โคโลนีขนาดกลาง ค่อนข้างเปียก มีไรซอยด์แผ่กระจาย เซลเป็นท่อนสั้นต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ประมาณ 3 - 4 เซล
112	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	โคโลนีขนาดกลาง สีขาว ผิวหน้าฟู เซลเป็นท่อนต่อเป็นสาย
279	อ.บ้านนาสาร จ.สุราษฎร์ธานี	โคโลนีขนาดกลาง สีเทาขาว ผิวหน้าฟู เซลเป็นท่อนยาวบาง ต่อเป็นสาย

เนื่องจากเชื้อ Streptomyces sp. หมายเลข 279 เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารต่อต้านเชื้อราค่อนข้างสูง จึงเลือกเชื้อหมายเลข 279 มาทำการศึกษารายละเอียดต่อไปโดยให้ชื่อสายพันธุ์นี้ว่า CU 279

รูปที่ 1 บริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของ Streptomyces sp. CU 279 เมื่อใช้ C.albicans เป็นเชื้อทดสอบ

2. ศึกษาการจัดหมวดหมู่ของ Streptomyces sp. CU 279

จากการศึกษาคุณสมบัติของ Streptomyces sp. CU 279 พบว่าสายใยอากาศ (Aerial mycelium) ของ Streptomyces sp. CU 279 มีลักษณะแตกแขนงค่อนข้างจะยาวและตรง (รูปที่ 2) ลักษณะของสายสปอร์ (spore chain) ค่อนข้างยาว มีจำนวนสปอร์มากกว่า 10 สปอร์ สปอร์มีลักษณะรูปร่างยาวทรงกระบอก (cylindrical shape) มีขนาดยาวประมาณ 1.5 ไมโครมิเตอร์ (µm) กว้างประมาณ 0.5 ไมโครมิเตอร์ ผิวสปอร์เรียบ (smooth) (รูปที่ 3) สายใยอากาศที่เจริญเต็มที่มีสีขาวอมเหลือง เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาการจัดหมวดหมู่ มีการสร้างเมลานินพิกเมนท์ในอาหารชนิดเปบโตนยีสต์เอกซ์แทรกไอร์ออน อการ์ (ภาคผนวกหมายเลข 10) สามารถใช้ดี-กลูโคส, ดี-แมนนิทอล, กาแลคโทส และแอล-อินโนซิทอลได้ดี และใช้ดี-ฟรุคโทส, ดี-ไซโลส, แอล-อราบิโนส และซูโครส ได้ปานกลางในการเจริญเติบโต สามารถย่อยแป้งและเกิดปฏิกริยาเปบโตไนเซชันของนมได้ ไม่ย่อยเจลาทิน ไม่ตกตะกอนและไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทได้ ลักษณะการเจริญ สัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของ Streptomyces sp. CU 279 แสดงในตารางที่ 2, 3 และ 4

ตารางที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) ของ *Streptomyces* sp. CU 279

ลักษณะ	รายละเอียด
1. แบบของสายใยอากาศและสายสปอร์	เรกตัสเฟลคซิบิลิส (Rectus Flexibilis
2. สัณฐานวิทยาของสปอร์และผิวสปอร์	ทรงกระบอก, ผิวเรียบ
3. สีของสายใยอากาศ (Aerial Mycelium)	ขาวอมเหลือง
4. สีของสปอร์	เทา
5. สีของสายใยซับสเตรท (Substrate Mycelium)	น้ำตาลอมเหลือง (Yellow-brown)
*ปฏิกริยาต่อการเปลี่ยนระดับความเป็นกรดด่าง	
กรด	ไม่เปลี่ยนแปลง
ด่าง	ไม่เปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ *ใช้ 0.05 N.HCl และ 0.05 N.NaOH หยดลงบนสายใยซับเสตรท แล้วดูความเปลี่ยนแปลงของสี

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญ (Cultural characteristic) ของ Streptomyces sp. CU 279

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะด้านการเจริญ
โอทมิลล์ อการ์	G : น้อยมาก
	M : เหลือง
	SP : ไม่มี
กลีเซอรอล แอสพาราจีน อการ์	G : ปานกลาง
	M : ขาวอมเหลือง
	SP : ไม่มี
ยีสต์เอกซแทรก-มอลท์เอกซแทรก อการ์	G : ปานกลาง
	M : ขาวอมเหลือง
	SP : ไม่มี
อินออร์แกนนิก ซอลท์สตาร์ช อการ์	G : ดี
	M : ขาวอมเทา
	SP : ไม่มี
สตาร์ช อการ์	G : ไม่มี
ซาเพค อการ์	G : ไม่ดี (น้อย)
	M : ขาวอมเหลือง (บางมาก)
	SP : ไม่มี
ไทโรซีน อการ์	G : ดี
	M : ขาวอมเหลือง
	SP : ไม่มี
เปบโตน ยีสต์เอกซแทรก ไอร์ออน อการ์	G : ดี
	M : ขาวอมเหลือง

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะด้านการเจริญ
	SP : น้ำตาลเข้ม

หมายเหตุ G : การเจริญ (growth)

M : สีของสายใยอากาศ (color of aerial mycelium)

SP : สีละลายน้ำ (soluble pigment)

<u>ตารางที่</u> 4 ลักษณะสรีระวิทยา (Physiological characteristic) ของ Streptomyces sp. CU 279

ลักษณะที่ศึกษา	ลักษณะสรีระวิทยา
1. อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ	28 - 30°C
2. ระดับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเจริญ	7 - 8 (pH 7 - 8)
3. การสร้างเมลานินพิคเมนท์	สร้างในอาหารชนิดเปบโตนยีสต์เอกซ-แทรก ไอรอน อการ์
4. การเจริญบนซาเพค อการ์	น้อยมาก
5. การทนเกลือ (NaCl tolerance)	มากกว่า 4% แต่น้อยกว่า 7%
6. การสร้างสีละลายน้ำ (soluble pigment)	-
7. การรีดิวซ์ไนเตรท	-
8. การย่อยแป้ง	+
9. การย่อยเจลาทิน	- (ที่ 30 องศาเซลเซียส)
10. เปบโตไนเซชันของนม	+
11. การตกตะกอนนม	-
12. การใช้สารแหล่งคาร์บอน	

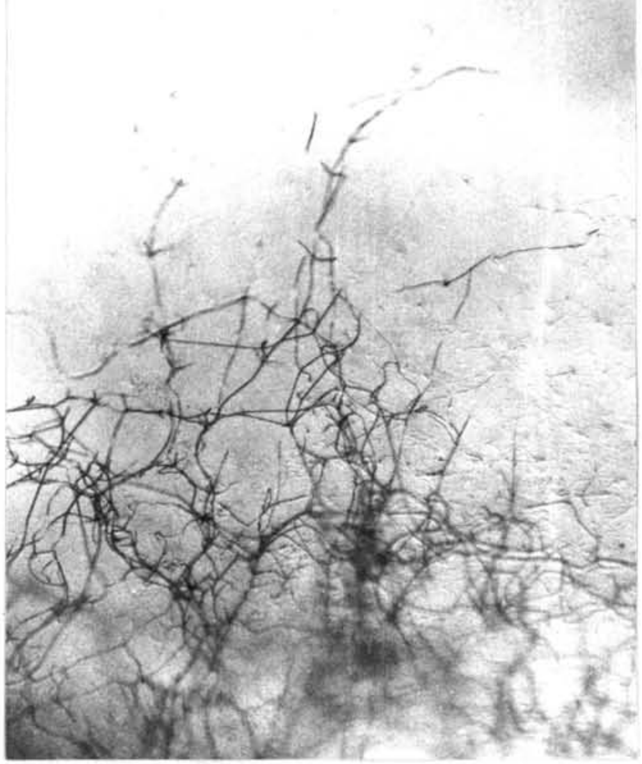
ดี-กลูโคส	+	ดี-ฟรุคโทส	±	แรมโนส	-
ดี-แมนนิทอล	+	ดี-ไซโลส	±	แรฟฟิโนส	-
กาแลคโทส	+	แอล-อราบิโนส	±	ซัลลิซิน	-
แอล-อินโนซิทอล	+	ซูโครส	±		

จากผลการศึกษาที่เสนอมาข้างต้นทำให้พิจารณาได้ว่า Streptomyces sp. CU 279 มีลักษณะใกล้เคียงกับ S.achromogenes, S.antibioticus และ S.violaceorectus (Buchanan, 1974) แต่มีข้อแตกต่างบางประการดังแสดงในตารางที่ 5

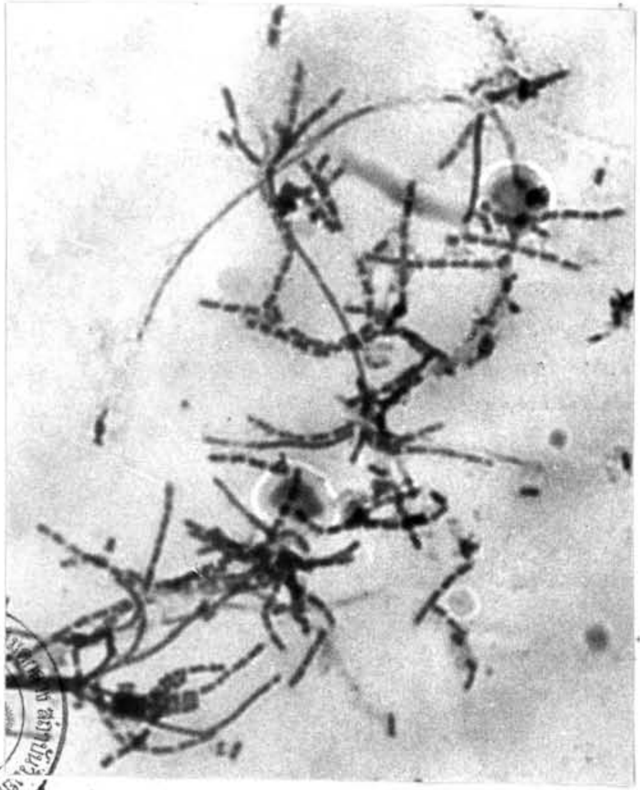
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญ (Cultural characteristic), การใช้สารแหล่งคาร์บอนและการผลิตปฏิชีวนะสารของ Streptomyces sp. CU 279 และสายพันธุ์อื่นที่มีลักษณะใกล้เคียง

ลักษณะ	สายพันธุ์ของ			
	CU 279	S.achromogenes	S.antibioticus	S.violaceoretus
1. การสร้างสีแพร่กระจาย (Diffusible pigment)	-	-	ไม่ได้รายงานไว้	สีม่วง
2. ความสามารถทน	>4% แต่ <7%	>7% แต่ <10%	> 7% แต่ <10%	ไม่ได้รายงานไว้
3. ลักษณะสายใย	RF	RF	RF	RF
4. สร้างสารต่อต้านแบคทีเรีย	-	+	+	+
5. สร้างสารต่อต้านเชื้อรา	+	-	-	+
6. การใช้สารแหล่งคาร์บอน				
แรมโนส	-	+	+	-
อินโนซิทอล	+	+	+	-
แมนนิทอล	+	+	-	-

จากการพิจารณาพบว่า Streptomyces sp. CU 279 ถึงแม้จะมีลักษณะบางประการใกล้เคียงกับ S.achromogenes, S.antibioticus และ C.violaceorectus แต่มีลักษณะบางอย่างที่แตกต่างกัน จึงมีทางเป็นไปได้ว่า Streptomyces sp. CU 279 จะเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อน



ก. ภาพขยาย 400 เท่า



ข. ภาพขยาย 1,000 เท่า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 2</u> ก. สายใยของ <u>Streptomyces</u> sp. CU 279 ที่เจริญบนอาหารสูตรหมายเลข 8

ข. สายสปอร์ของ <u>Streptomyces</u> sp. CU 279 ที่เจริญบนอาหารสูตรหมายเลข 8

รูปที่ 3 ผิวสปอร์ของ Streptomyces sp. CU 279

3. <u>สารแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารต่อต้านเชื้อราของ Streptomyces sp. CU 279</u>

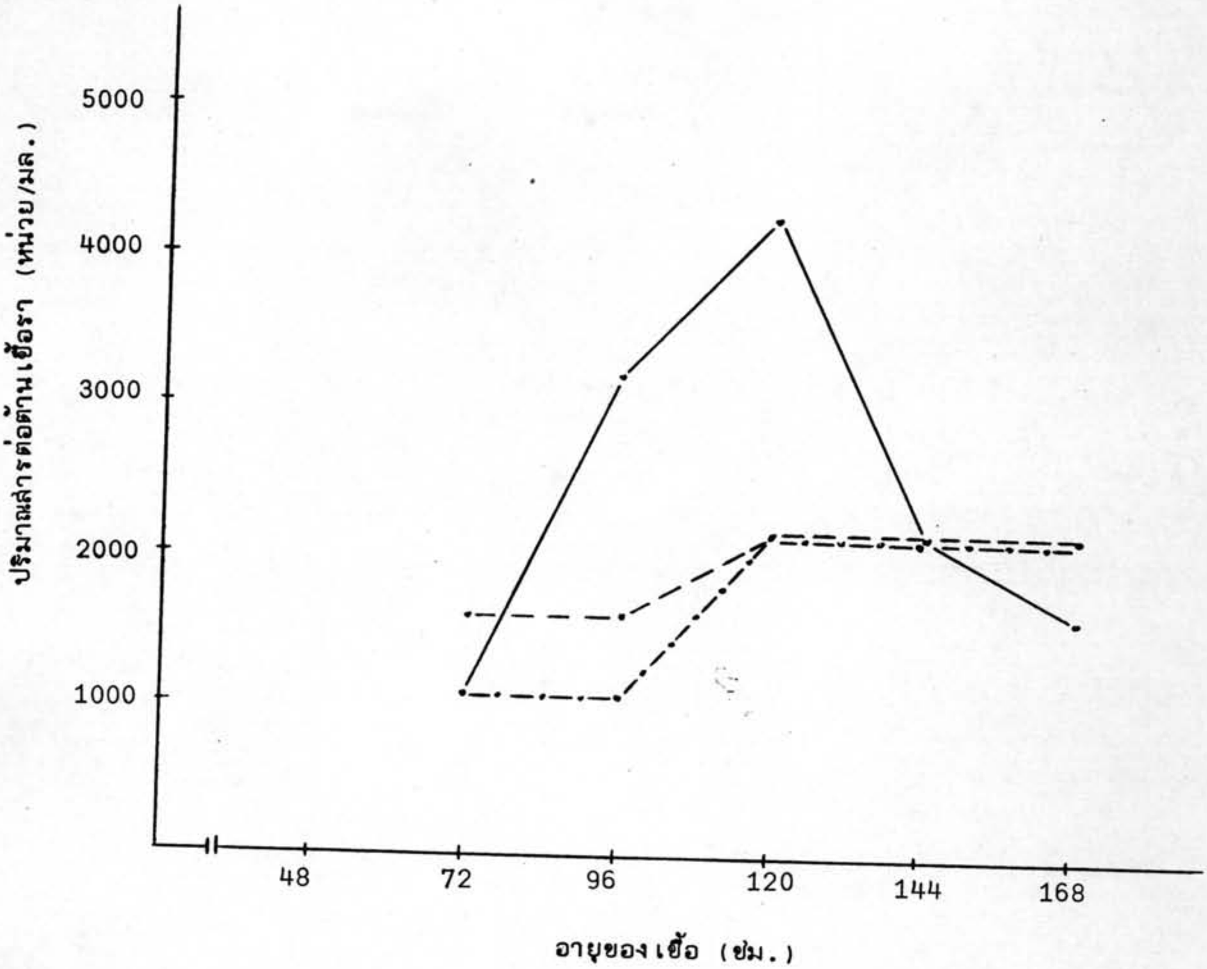
3.1 <u>สารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม</u>

จากการสกัดสารต่อต้านเชื้อราออกมาจากเซลของ <u>Streptomyces</u> sp. CU 279 แล้วทำไบโอแอสเซย์ เพื่อหาปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ถูกสร้างขึ้น โดยเทียบว่าปริมาณสาร 1 หน่วย คือปริมาณสารที่ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งต่อ <u>C.albicans</u> กว้าง 1.3 ซ.ม. นั้น พบว่า แป้งมันสำปะหลัง 2% เป็นสารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา คือ ผลิตได้สารต่อต้านเชื้อรา 4266.67 หน่วย/มล. เมื่อบ่มเชื้อไปได้ 120 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 6 และ รูปที่ 4

<u>ตารางที่ 6</u> ปริมาณของสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย <u>Streptomyces</u> sp. CU 279 เมื่อใช้สารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

ปริมาณสารต่อต้านเชื้อรา (หน่วย/มล.) / อายุของเชื้อ (ชม.)	ชนิดของสารแหล่งคาร์บอน (2%)		
	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งมันฝรั่ง	แป้งละลายน้ำ
72	1066.67	1066.67	1600.00
96	3200.00	1066.67	1600.00
120	4266.67	2133.33	2133.33
144	2133.33	2133.33	2133.33
168	1600.00	2133.33	2133.33

<u>หมายเหตุ</u> สาร 1 หน่วยคือ ปริมาณสารที่ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งต่อ <u>C.albicans</u> กว้าง 1.3 ซ.ม.



รูปที่ 4 แสดงปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ Streptomyces sp. CU 279 ผลิตขึ้นเมื่อใช้สารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

——— แป้งมันสำปะหลัง

–·–·– แป้งมันฝรั่ง

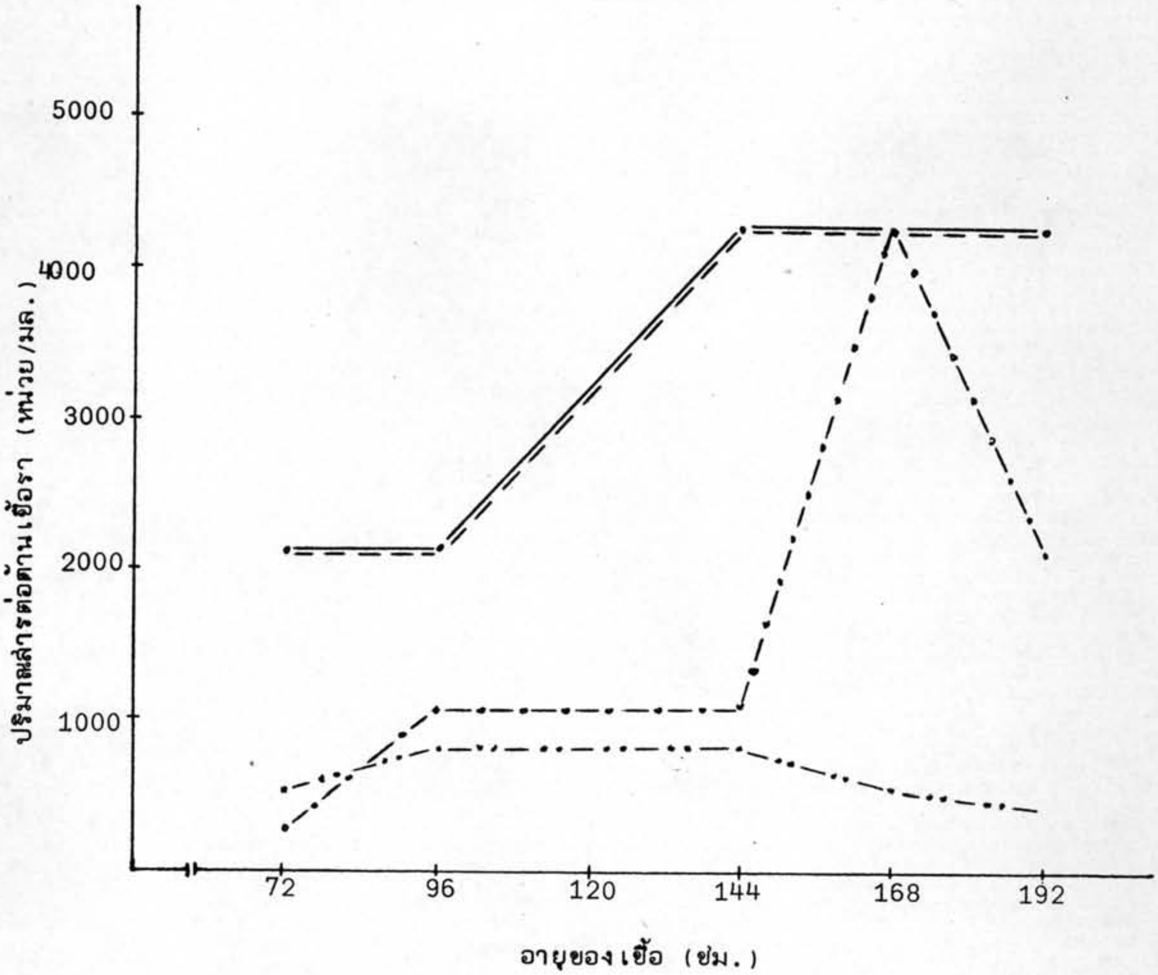
– – – แป้งละลายน้ำ

3.2 สารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการสกัดสารต่อต้านเชื้อราออกมาจากเซลของ Streptomyces sp. CU 279 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ แล้วนำมาทำไบโอแอสเซย์เช่นเดียวกับวิธีการทดลองในข้อ 4 พบว่ากากถั่วเหลืองจากประเทศญี่ปุ่น , โพลีเปบโตน และกากถั่วเหลืองผลิตในประเทศไทย เป็นสารที่ทำให้มีการผลิตสารต่อต้านเชื้อราได้สูงถึง 4266.67 หน่วย/มล. โดยที่กากถั่วเหลืองจากประเทศญี่ปุ่นและโพลีเปบโตนจะทำให้มีการผลิตสารมากที่สุดเมื่อทำการบ่มเชื้อไปได้ 144 ชั่วโมง ในขณะที่กากถั่วเหลืองผลิตในประเทศไทยทำให้มีการผลิตสารมากที่สุดเมื่อบ่มเชื้อได้ 168 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 5 ส่วนคอร์นสตีปลิเคอว์จะทำให้มีการผลิตสารได้น้อยกว่าสารแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ดังนั้นคอร์นสตีปลิเคอว์จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารต่อต้านเชื้อราจาก Streptomyces sp. CU 279

ตารางที่ 7 ปริมาณสารต่อต้านเชื้อรา (หน่วย/มล.) ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU-279 เมื่อใช้สารแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

ปริมาณสารต่อต้านเชื้อรา (หน่วย/มล.) / อายุของเชื้อ (ช.ม.)	ชนิดของสารแหล่งไนโตรเจน (1%)			
	โพลีเปบโตน	กากถั่วเหลืองจากประเทศญี่ปุ่น	กากถั่วเหลืองผลิตในประเทศไทย	คอนสตีปลิเคอว์
72	2133.33	2133.33	266.67	533.33
96	2133.33	2133.33	1066.67	800.00
144	4266.67	4266.67	1066.67	800.00
168	4266.67	4266.67	4266.67	533.33
192	4266.67	4266.67	2133.33	400.00



รูปที่ 5 แสดงปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ *Streptomyces* sp. CU 279 ผลิตขึ้น เมื่อใช้สารแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

——— โพลีเปปโตน

– – – กากถั่วเหลืองผลิตในประเทศญี่ปุ่น

—·—·— กากถั่วเหลืองผลิตในประเทศไทย

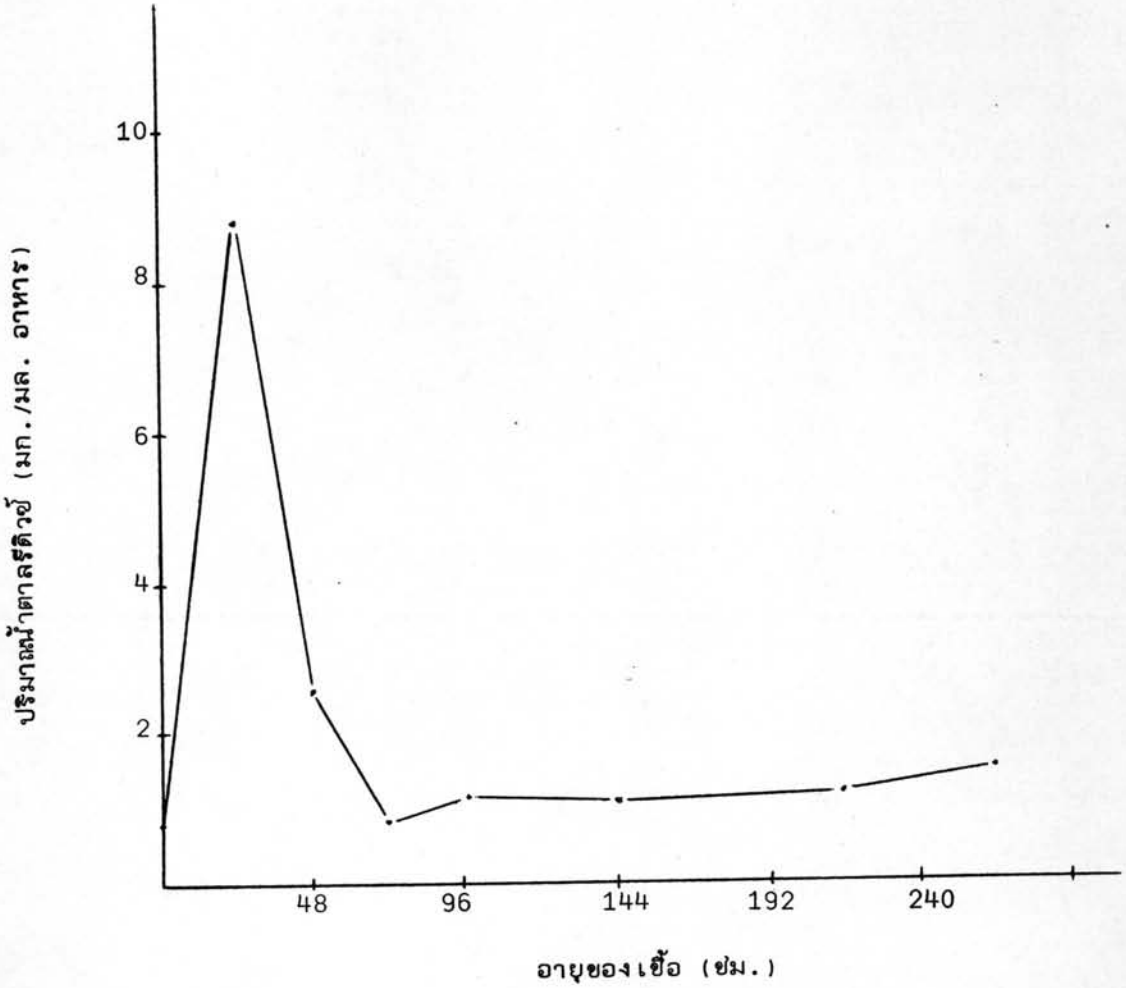
—··—··— คอร์นสตีปลิเคว้อ

4. ผลของน้ำตาลมัลโทสที่มีต่อการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา

จากการตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหมายเลข 21 เมื่อเลี้ยง Streptomyces sp. CU 279 ไปได้เวลาต่าง ๆ กัน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะมีปริมาณสูงสุดประมาณ 9 ม.ก./ม.ล. ในเวลา 24 ชั่วโมง และปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งต่ำสุดประมาณ 1 ม.ก./ม.ล. ในเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 6 และจากผลการเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. CU 279 ในอาหารสูตรหมายเลข 21 แล้วเติมมัลโทสลงไปอีก 0.64% นั้นพบว่า น้ำตาลมัลโทสที่เติมลงไปในขณะที่เชื้ออายุ 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 เมื่อมีการเติมมัลโทสเพิ่มลงไปอีก 0.64% ในช่วงเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการเพาะเชื้อ

อายุของเชื้อ (ช.ม.)	ปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิต (หน่วย/ม.ล.)		
	ไม่เติมมัลโทส	เติมมัลโทสที่ 48 ชม.	เติมมัลโทสที่ 72 ชม.
96	2133.33	2133.33	2133.33
120	2133.33	2133.33	2133.33
144	2133.33	2133.33	2133.33
192	2133.33	2133.33	2133.33
216	2133.33	2133.33	2133.33
264	2133.33	2133.33	2133.33



<u>รูปที่</u> 6 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (เทียบกับมัลโทส) ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง **Streptomyces** sp. CU 279 ในอาหารสูตรหมายเลข 21 ในช่วงเวลาต่าง ๆ

5. <u>ประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279</u>

5.1 <u>คุณสมบัติทางชีวภาพในเพลททดลอง</u>

จากการใช้วิธีเพลทไดลูชัน (Plate Dilution Method) หาความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (test organism) แต่ละชนิด ผลที่ได้พบว่าสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. CU 279 นั้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้เป็นส่วนใหญ่ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 9

5.2 <u>ประสิทธิภาพในการยับยั้งการแพร่ของโรคบนรวงข้าว</u>

ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งการแพร่กระจายของโรครวงข้าวเน่า (Sheath rot) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Acrocylindrium oryzae* แสดงในตารางที่ 10, 11 และ 12

I15591487.

ตารางที่ 9 ค่าความเข้มข้นของสารที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 ที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ

ชนิดของเชื้อทดสอบ (Test organism)	ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (ไมโครกรัม/ม.ล.)
แบคทีเรีย	
Bacillus subtilis	>150*
Serratia marcescens	>150*
Escherichia coli	>150*
ยีสต์	
Saccharomyces cerevisiae TISTR	0.5
Candida albicans	1.0
Candida tropicalis	>150*
Candida utilis ARCT Y.46	0.5
Hansenula anomala DMKU Y-4	<0.5
Endomycopsis fibuligera TISTR 5033	<5
รา	
Fusarium moniliform UPCC 3713	2
Aspergillus oryzae TISTR 3014	>150*
Aspergillus niger (Kyushu)	4
Rhizopus sp. TISTR	>150*
Trichoderma viridae TISTR 3162	150
Penicillium sp TISTR	>150*
Acrocylindrium oryzae (Botany)	2
Helminthosporium oryzae (Botany)	<5
Mucor racemosus ARTC # M-20	2
Curvularia lunata TISTR-3068	1.5
Pericularia oryzae (Botany)	1.5

หมายเหตุ * : ไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารมากถึง 150 ไมโครกรัม/ม.ล.

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวที่เป็นโรครวงข้าวเน่าซึ่งเกิดจากเชื้อ Acrocylindrium oryzae เมื่อพ่นสารที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 หลังจากฉีดเชื้อแก่ต้นข้าวแล้ว 2 วัน

วันที่เก็บผล	เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวที่เป็นโรคหลังพ่นสารความเข้มข้นต่าง ๆ						
หลังพ่นสาร	ควบคุม*	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm	600 ppm	800 ppm
1	13.42	18.10	27.02	24.83	20.28	18.26	10.91
7	25.39	41.(8	44.25	57.18	51.63	22.03	18.70
14	41.18	52.88	57.87	59.91	62.32	26.38	21.56
21	53.03	63.79	71.20	62.05	69.72	28.12	23.12

หมายเหตุ * : พ่นต้นข้าวด้วย 17% เมทธานอลในน้ำ ซึ่งใช้เป็นตัวละลายสารต่อต้านเชื้อราที่ใช้

ตารางที่ 11 แสดงเปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวที่เป็นโรคที่เพิ่มขึ้นจากวันแรกเมื่อพ่นสารความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังจากฉีดเชื้อแก่ต้นข้าวแล้ว 2 วัน

วันที่เก็บผล	เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวเป็นโรคที่เพิ่มหลังพ่นสารความเข้มข้นต่าง ๆ						
หลังพ่นสาร	ควบคุม*	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm	600 ppm	800 ppm
7	11.97	23.08	17.23	32.35	31.35	3.77	7.79
14	27.76	34.79	30.85	35.08	42.04	8.12	10.65
21	39.61	45.69	44.18	37.22	49.44	9.86	12.21

หมายเหตุ * : พ่นต้นข้าวด้วย 17% เมทธานอลในน้ำ ซึ่งใช้เป็นตัวละลายสารต่อต้านเชื้อราที่ใช้

<u>ตารางที่ 12</u> เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวที่เป็นโรครวงข้าวเน่าซึ่งเกิดจากเชื้อ <u>Acrocylindrium oryzae</u> เมื่อพ่นสารที่ผลิตโดย <u>Streptomyces</u> sp. CU 279 ก่อนฉีดสปอร์แก่ต้นข้าว 1 วัน

วันที่เก็บผล หลังพ่นสาร	เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวที่เป็นโรคหลังจากพ่นสารความเข้มข้นต่าง ๆ						
	ควบคุม*	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm	600 ppm	800 ppm
3	13.42	9.41	10.31	11.72	4.93	1.28	1.26
7	20.00	16.36	17.47	18.66	10.81	7.30	5.36
14	36.32	30.07	32.84	22.64	17.33	11.75	10.21
21	49.74	36.88	38.08	31.17	22.46	18.82	13.42

<u>หมายเหตุ</u> * : พ่นต้นข้าวด้วย 17% เมทธานอลในน้ำซึ่งใช้เป็นตัวละลายสารต่อต้านเชื้อราที่ใช้

จากตารางที่ 10 และ 11 แสดงว่าเมื่อทำการพ่นสารหลังจากฉีดเชื้อ <u>Acrocylindrium</u> <u>oryzae</u> ไปแล้ว 2 วัน ความเข้มข้นของสาร 100 - 400 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) ไม่มีผลในการยับยั้งการแพร่ของโรคเพราะเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดที่เป็นโรคเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับชุดควบคุม (control) แต่ความเข้มข้น 600 และ 800 ส่วนในล้านส่วนให้ผลยับยั้งการแพร่ของโรคได้ เพราะเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของเมล็ดที่เป็นโรคต่ำกว่าควบคุมมาก และเห็นชัดตั้งแต่หลังจากพ่นสารไปได้ 7 วัน

จากตารางที่ 12 แสดงว่าถ้าพ่นสารแก่ต้นข้าวก่อนฉีดเชื้อ <u>Acrocylindrium</u> <u>oryzae</u> 1 วัน ความเข้มข้นของสาร 100 - 300 ส่วนในล้านส่วนไม่มีผลยับยั้งการแพร่ของโรคให้เห็นอย่างชัดเจน ส่วนความเข้มข้น 400 - 800 ส่วนในล้านส่วนให้ผลยับยั้งการแพร่ของโรคได้ค่อนข้างดี ดังจะเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดที่เป็นโรคในวันที่ 7, 14 และ 21 มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ก. สภาพปกติ

ข. สภาพที่เป็นโรคร วงข้าวเน่า

รูปที่ 7 ลักษณะเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 3

6. <u>ความเป็นพิษของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดได้จาก Streptomyces sp. CU 279</u>

ฉีดสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เข้าไปทางช่องท้อง (intraperitoneal cavity) ของหนูขาว (albino mice) ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 25 กรัม แล้วคำนวณค่า LD_{50} ได้เท่ากับ 5.7 ม.ก./น้ำหนักหนู 1 ก.ก. ดังแสดงในตารางที่ 13

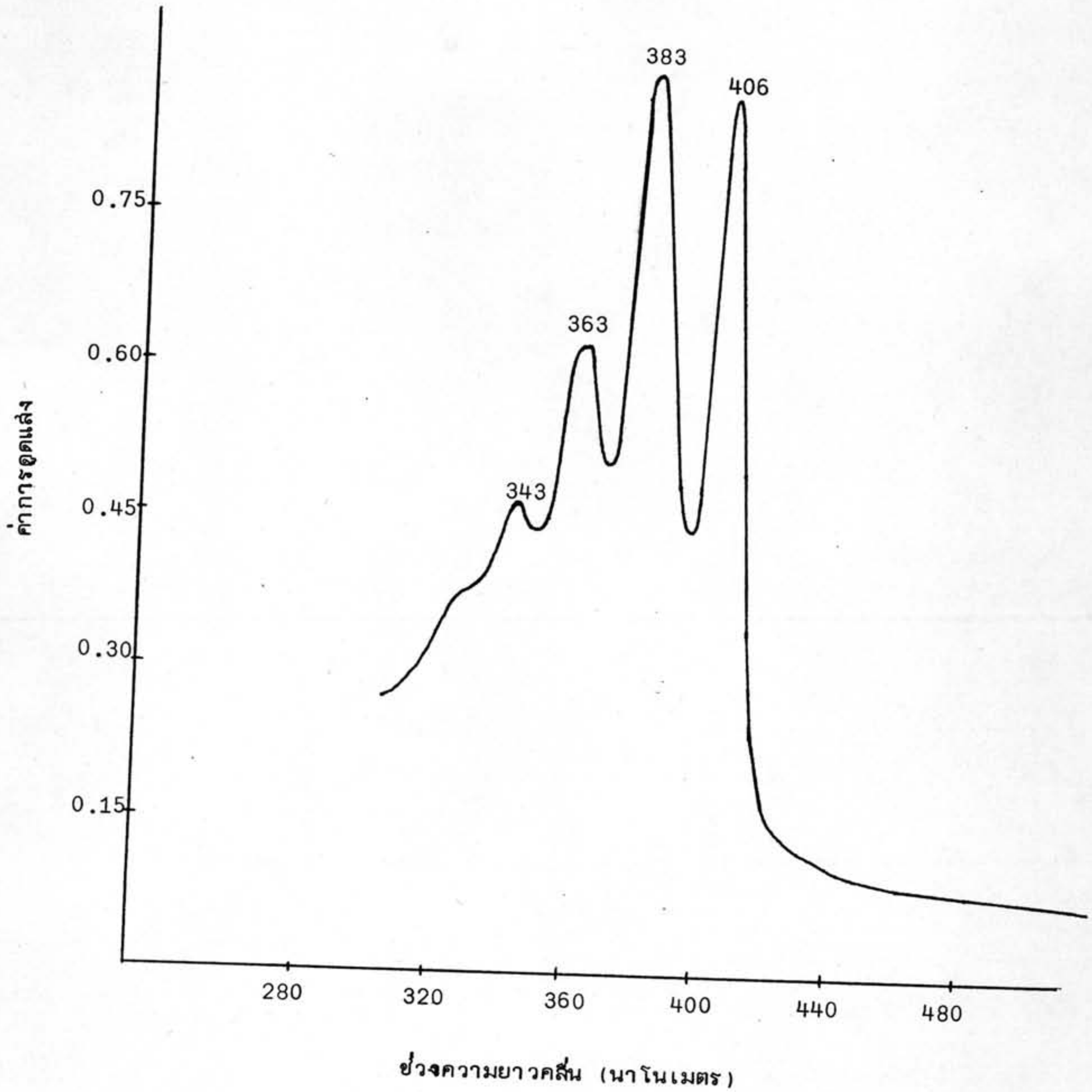
ตารางที่ 13 ความเป็นพิษของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดได้จาก Streptomyces sp. CU 279 เมื่อฉีดเข้าไปในช่องท้องของหนูขาว (albino mice) ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 25 กรัม

หนูทดลองกลุ่มที่ (กลุ่มละ 10 ตัว)	ปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ฉีด (ไมโครกรัม/น้ำหนักหนู 25 ตัว)	จำนวนหนูตาย / จำนวนหนูที่ถูกฉีด	LD_{50} (ม.ก./หนู 1 ก.ก.)
1	800	10/10	
2	400	10/10	
3	200	10/10	
4	100	0/10	5.7
5	50	0/10	
6	25	0/10	

7. <u>คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279</u>

<u>คุณสมบัติการดูดแสง</u>

จากการวัดค่าการดูดแสงในช่วงความยาวคลื่น 190 - 510 นาโนเมตร ของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279 เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.01 ม.ก./ม.ล. พบว่าสารจะดูดแสงมากที่ความยาวคลื่นของแสง 343,363,383 และ 406 นาโนเมตร รูปแบบการดูดแสงของสารแสดงไว้ในรูปที่ 8 ซึ่งเป็นลักษณะการดูดแสงของปฏิชีวนะสารโพลีอีนชนิดเฮบตาอีน (Korzybski, 1978)



รูปที่ 8 แสดงรูปแบบของการดูดแสงที่ช่วงความยาวคลื่นแสงต่าง ๆ ของสารต่อต้านเชื้อรา ที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279

8. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279

8.1 ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

พบว่าสารที่สกัดได้สามารถละลายได้ดีในเมทรานอลและเอทธานอล ละลายได้เล็กน้อยในโพรพานอล, บิวทานอล, อซีโตน และน้ำที่ปรับสภาพความเป็นกรดต่างที่ 2, 3, 5, 7, 9 และ 11 และไม่ละลายในเฮกเซน, เบนซินและอีเธอร์ ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 14 ซึ่งเป็นค่าความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นแก่ C.albicans เมื่อใช้สารที่อยู่บริเวณน้ำใส่ทดสอบโดยวิธีไบโอแอสเซย์

ตารางที่ 14 การละลายของสารต่อต้านเชื้อรา (ที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279) ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ชนิดของตัวทำละลาย (solvent)	เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งต่อ C.albicans (ซ.ม.)
เมทรานอล	2.20
เอทธานอล	2.10
น้ำปรับสภาพความเป็นกรดต่างที่ 2	1.10
3	1.10
5	1.20
7	1.30
9	1.25
11	1.20
โพรพานอล	1.20
บิวทานอล	1.20
อซีโตน	1.30
เฮกเซน	0
เบนซิน	0
อีเธอร์	0

8.2 ความคงตัว (stability) ของสารในสภาพความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิห้อง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราที่อยู่ในสภาพความเป็นกรดด่างที่ 2, 5, 7, 9, 12 และ 14 ตามลำดับนั้น พบว่าสารที่สกัดได้จะยังคงรักษาประสิทธิภาพไว้ได้ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) = 5, 7, 9, 12 และ 14 และสารจะสูญเสียประสิทธิภาพไปบางส่วนในสารละลายที่เป็นกรดมาก ๆ คือที่ระดับความเป็นกรดด่างที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพในการยับยั้ง C.albicans ของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดได้จาก Streptomyces sp. CU 279 ในสภาพความเป็นกรดด่างต่าง ๆ

สภาพความเป็นกรดด่าง (พีเอช)	ประสิทธิภาพของสารที่สกัดได้ในการยับยั้ง C.albicans. (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง, ซ.ม.)
2	1.95
5	2.50
7	2.55
9	2.45
12	2.50
14	2.45

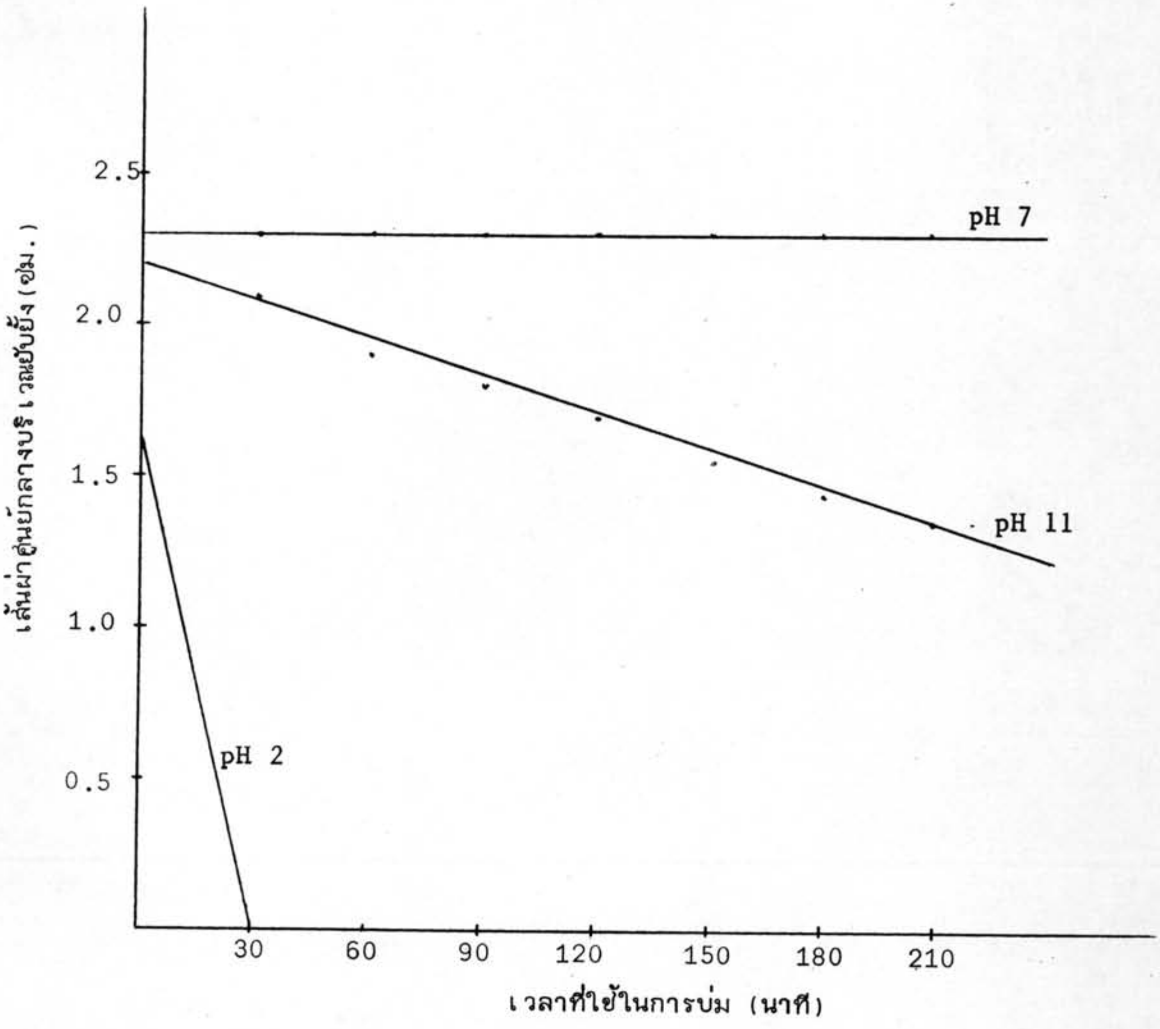
8.3 ความคงตัว (stability) ต่อความร้อนที่ระดับความเป็นกรดด่างต่าง ๆ

จากการศึกษาความคงตัวของสารละลายที่ความเข้มข้น 0.5 ม.ก./ม.ล. ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส, ระดับความเป็นกรดด่างที่ 2, 7 และ 11 พบว่าประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราจะคงที่นานกว่า 3.5 ชั่วโมง ที่ 60 องศาเซลเซียส เมื่อสารละลายอยู่ในสภาพความเป็นกรดด่างที่ 7 และที่ระดับความเป็นกรดด่างที่ 11 ประสิทธิภาพของสารจะลดลงเรื่อยๆ

แต่ลดลงต่ำกว่าที่ระดับความเป็นกรดด่างที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 16 แสดงว่าสารต่อต้านเชื้อราจะมีความคงตัวที่ 60 องศาเซลเซียส ได้ดีที่สภาวะเป็นกลาง (Neutral pH)

ตารางที่ 16 ความคงตัวของประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจากเชื้อ *Streptomyces* sp. CU 279 เมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเป็นกรดด่างที่ 2, 7 และ 11

เวลา (นาที)	เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (ซ.ม.)		
	พีเอช 2	พีเอช 7	พีเอช 11
0	1.65	2.30	2.30
30	0	2.30	2.10
60	0	2.30	1.90
90	0	2.30	1.80
120	0	2.30	1.70
150	0	2.30	1.55
180	0	2.30	1.45
210	0	2.30	1.35



<u>รูปที่ 9</u> แสดงประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก <u>Streptomyces</u> sp. CU 279 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในสภาพความเป็นกรดด่างที่ 2,7 และ 11

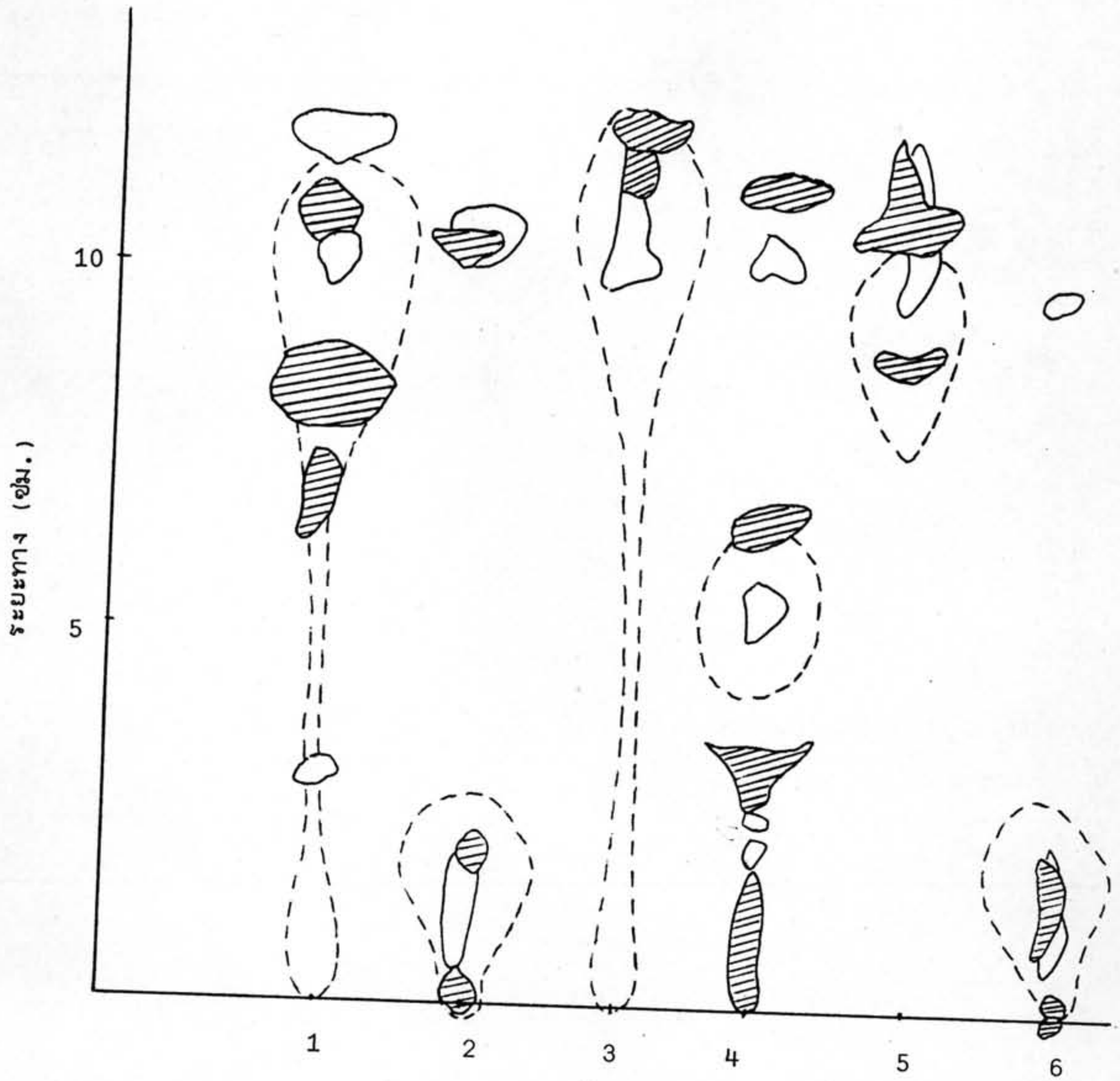
8.4 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279 โดยวิธีการโครมาโตกราฟฟี (Chromatography)

8.4.1 การเลือกสารละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วนประกอบของสารต่อต้านเชื้อราโดยวิธีการทางทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

จากการใช้วิธีทางโครมาโตกราฟฟีควบคู่ไปกับการตรวจหาสารปะปน (impurity) โดยวิธีไอโอดีนและแสงอุลตราไวโอเลต พร้อมทั้งทำออโตไบโอกราฟ (autobiograph) พบว่าสารละลายผสมของบิวทานอล : เมทรานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 4 : 1 : 2 เป็นระบบที่ค่อนข้างเหมาะสมต่อการแยกสิ่งปะปนออกจากส่วนที่มีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อรา แสดงในรูปที่ 10 ค่า R_f ของสารส่วนที่มีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อรา เมื่อใช้สารละลายผสมดังกล่าวประมาณ 0.46 - 0.48 ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 10

ตารางที่ 17 ค่า R_f ของสารส่วนที่มีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อราโดยใช้ระบบสารละลายชนิดต่างๆ เมื่อทำการแยกด้วยวิธีทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

ชนิดระบบสารละลาย	ค่า R_f
โพรพานอล : น้ำ (8 : 2)	0.76
บิวทานอลอิ่มตัวด้วยน้ำ	0.13
50% อซีโตนในน้ำ	0.80
บิวทานอล : เมทรานอล : น้ำ (4 : 1 : 2)	0.46 - 0.48
เมทรานอล : 25% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ : น้ำ (20 : 1 : 4)	0.75
บิวทานอลอิ่มตัวด้วย 0.2% กรดอซีติค	0.21



รูปที่ 10 แสดงแบบแผนของการแยกสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก **Streptomyces** sp. CU 279 โดยวิธีทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี โดยใช้ระบบสารละลายชนิดต่าง ๆ คือ

1. โพรพานอล : น้ำ (8 : 2)
2. บิวทานอลอิ่มตัวด้วยน้ำ
3. 50% อซีโตนในน้ำ
4. บิวทานอล: เมทานอล:น้ำ (4:1:2)
5. เมทานอล : 25% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ : น้ำ (20 : 1 : 4)
6. บิวทานอลอิ่มตัวด้วย 0.2% กรดอซีติค

——— อุลตราไวโอเลต

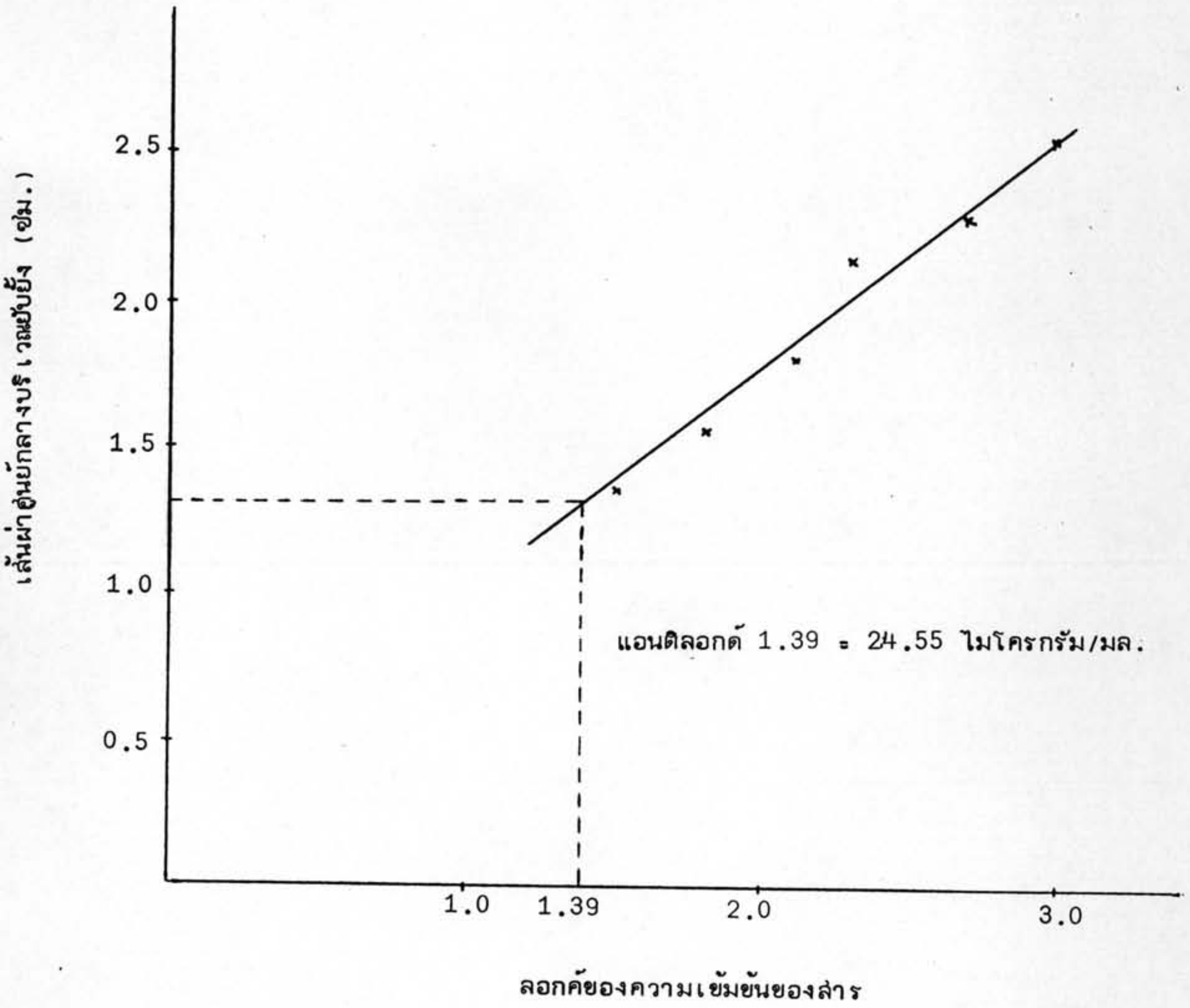
▨▨▨ ไอโอดีน

- - - - บริเวณยับยั้ง

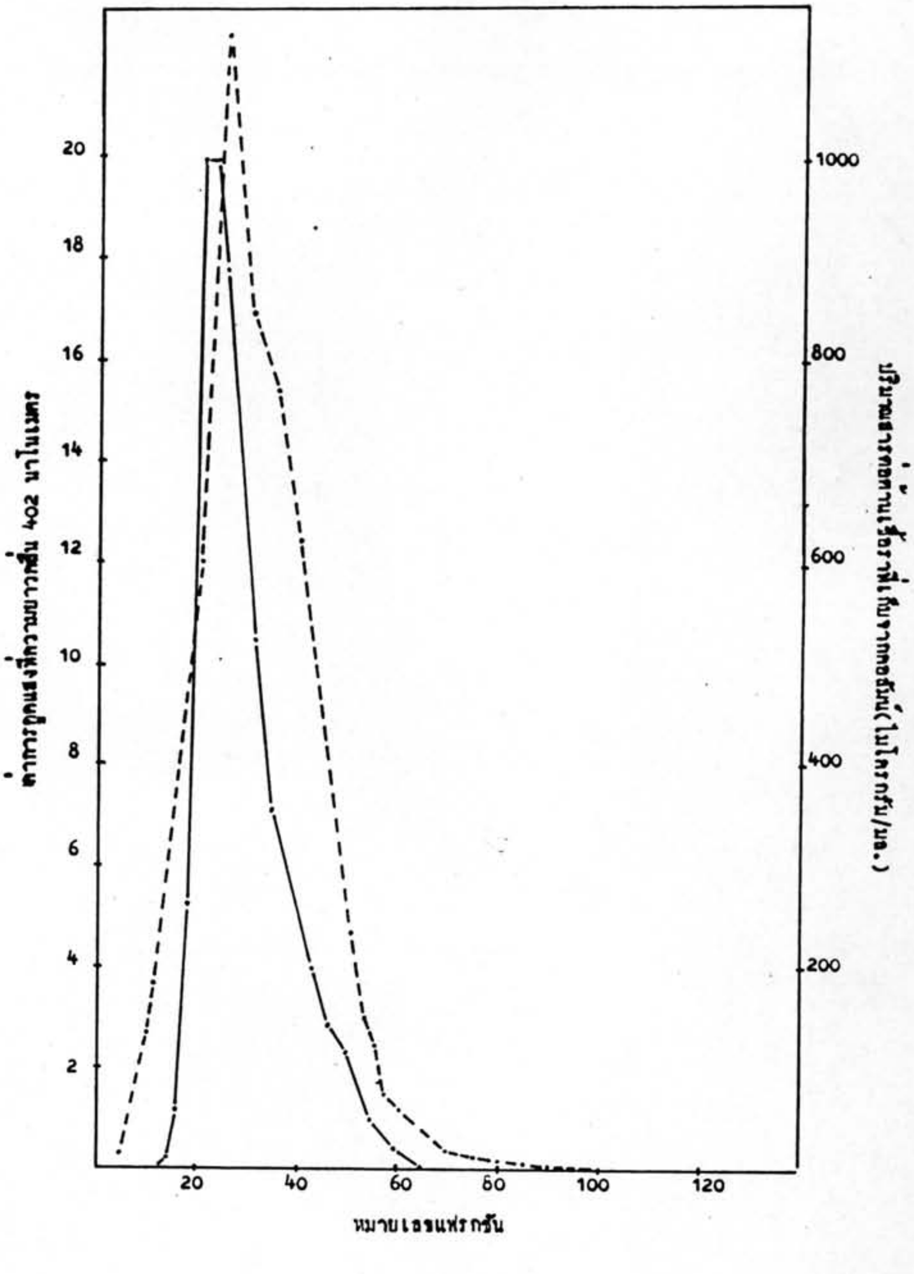
8.4.2 <u>การใช้วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีและทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟีในการขจัดสารเจือปน (impurity) ออกจากสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279</u>

ผ่านสารที่สกัดได้ลงบนซิลิกาเจล C - 200 คอลัมน์ แล้วชะสารด้วยสารละลายผสมของบิวทานอล : เมทานอล : น้ำ (4 : 1 : 2) นำแฟรคชัน(fraction) ต่าง ๆ ที่ออกมาจากคอลัมน์ไปหาค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 402 นาโนเมตร และหาประสิทธิภาพของสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ <u>C.albicans</u> แสดงได้ดังรูปที่ 12

จากรูปที่ 12 แสดงให้เห็นว่าช่วงที่มีประสิทธิภาพจะมีอยู่เพียงช่วงเดียวเท่านั้นเมื่อแยกสารด้วยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีและช่วงที่มีประสิทธิภาพจะซ้อนกับช่วงที่สารดูดแสงที่ความยาวคลื่น 402 นาโนเมตร ได้มากด้วย ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่าสารที่สกัดได้นี้เป็นปฏิชีวนะสารชนิดเดียว จากการนำแฟรคชันที่มีประสิทธิภาพสูงมาทำทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟีอีกครั้งหนึ่งพบว่า ยังคงมีสิ่งเจือปนหลงเหลืออยู่เมื่อทดสอบด้วยแสงอุลตราไวโอเลต แต่จะมีอยู่ช่วงหนึ่งของแฟรคชันที่สิ่งเจือปนถูกแยกออกจากจุดที่มีประสิทธิภาพ ดังแสดงในรูปที่ 13 (ก) ซึ่งเมื่อรวมแฟรคชันช่วงดังกล่าวเข้าด้วยกันแล้วนำมาทำทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟีแผ่นหนา และดีเวลลอปในสารละลายผสมระบบเดิม ขูดเอาเจลตรงส่วนที่มีประสิทธิภาพที่แยกจากสิ่งเจือปนมาวัดค่าการดูดแสง ปรากฏว่ามีรูปแบบการดูดแสงเหมือนกับสารที่สกัดมาได้จากเซลครั้งแรก ดังแสดงในรูปที่ 14 และเมื่อนำสารนี้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยทำทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟีอีกครั้ง พบว่าไม่มีสิ่งเจือปนปรากฏให้เห็นเมื่อทดสอบด้วยแสงอุลตราไวโอเลต แสดงในรูปที่ 13 (ข)



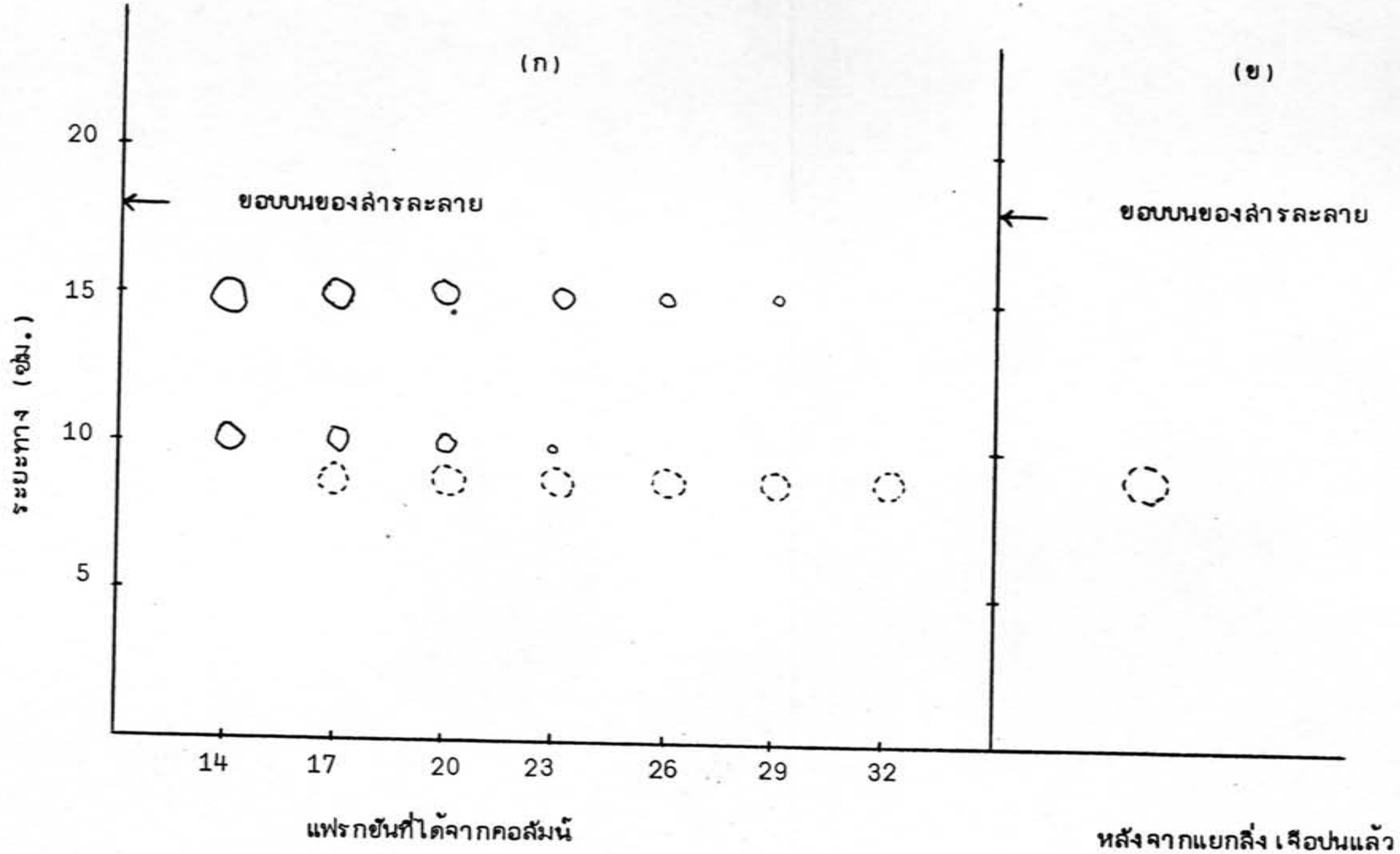
รูปที่ 11 แสดงคาลิเบรชันเคิร์พระหว่าง เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกับ ค่าลอกค์ของความเข้มข้นของสาร (ใช้ C. albicans เป็นเชื้อทดสอบ)



<u>รูปที่ 12</u> แสดงค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 402 นาโนเมตร เทียบกับปริมาณของสารต่อต้านเชื้อรา (ไมโครกรัม/มล.) แฟรคชันต่าง ๆ ที่ผ่านออกมาจากซิลิกา เจลคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

——— ปริมาณสารต่อต้านเชื้อรา (คำนวณจากการทำไบโอแอสเซย์)

- - - - ค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 402 นาโนเมตร



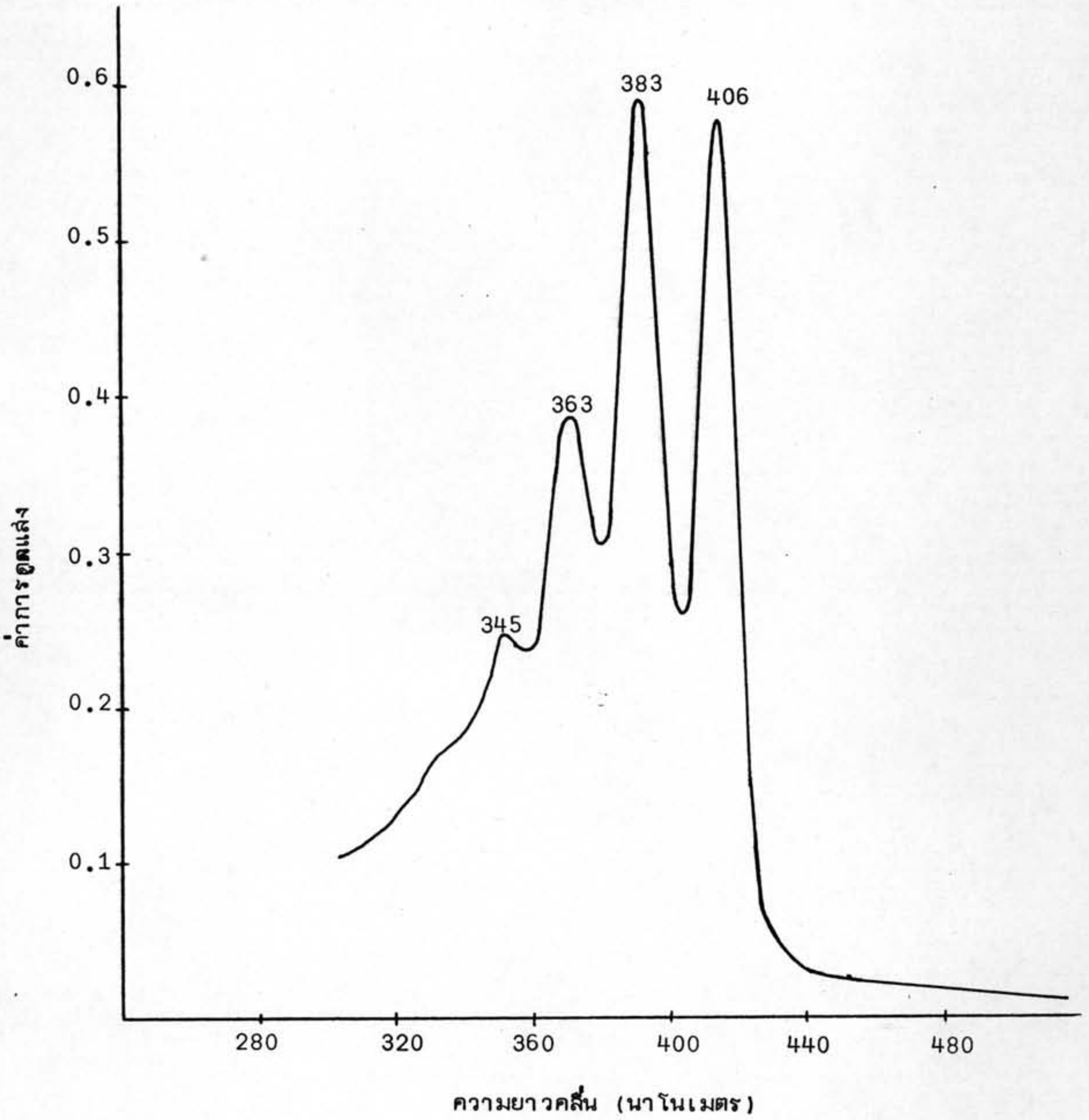
รูปที่ 13 แสดงแบบแผนการแยกของสารต่อต้านเชื้อรา เมื่อทำทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี เมื่อใช้ระบบสารละลาย บิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ (4 : 1 : 2)

ก. สารต่อต้านเชื้อราแฟรคชั่นต่าง ๆ ในช่วงที่มีประสิทธิภาพสูงที่ได้จากซิลิกา เจลคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี เมื่อใช้ระบบสารละลาย บิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ (4 : 1 : 2)

ข. สารต่อต้านเชื้อรา เมื่อแยกสิ่งเจือปนออกแล้วด้วยวิธีทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

——— สิ่งเจือปน

- - - - ส่วนที่มีประสิทธิภาพ



รูปที่ 14 แสดงรูปแบบของการดูดแสงที่ช่วงความยาวคลื่นแสงต่าง ๆ ของสารต่อต้านเชื้อราหลังจากที่แยกเอาสิ่งเจือปนออกโดยผ่านซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีและ ซิลิกาเจลทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟี

จากคุณสมบัติด้านชีววิทยา, ฟิสิกส์และเคมี ของสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดยเชื้อ <u>Streptomyces</u> sp. CU 279 ตามที่ได้รายงานแล้วจะใกล้เคียงกับคุณสมบัติของปฏิชีวนะ-สารโพลีอีน ซึ่งมีผู้ทำการศึกษาไว้แล้ว (Korzyski, 1978) คือ แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B), แอนติไบโอติค X - 63(Antibiotic X - 63), ไมโคเฮป-ติน (Mycoheptin), แคนดิไมซิน (Candimycin), และเพอริไมซิน (Perimycin) แต่ก็มีคุณสมบัติบางประการที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของปฏิชีวนะสารที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 กับปฏิชีวนะสารชนิดอื่น ๆ

ชนิดของปฏิชีวนะสาร	สายพันธุ์ที่ผลิต	แหล่งของปฏิชีวนะสาร	สารละลายที่ใช้สกัด	ช่วงความยาวคลื่นที่สารดูดแสงมาก (λ_{max})
CU 279	Streptomyces sp. CU 279	ภายในเซล	80% เมทธานอลในน้ำ pH 6.5	343,363,383 และ 406 นาโนเมตร
แอมโฟเทอริซิน บี	Streptomyces nodusus Streptomyces sp. M. 4575	ปล่อยออกมานอกเซลอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไอโซโพรพานอล pH 10.5	363,383 และ 406 นาโนเมตร
ไมโคเฮปติน	Streptomyces No.44W/1 Streptomyces netropsis	ภายในเซล	เมทธานอล(เปอร์เซ็นต์และ pH ของสารละลายไม่ได้รายงาน)	347,362,382 และ 406 นาโนเมตร
แคนดิไมซิน	Streptomyces chemensis	ภายในเซลและปล่อยออกมานอกเซลมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ	ไม่ได้รายงานไว้	362,382 และ 406 นาโนเมตร
แอนติไบโอติค X - 63	Streptomyces sp. X - 63	ภายในเซล	95% เอทธานอลในน้ำ	344.5, 363, 383 และ 406 นาโนเมตร

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ชนิดของปฏิชีวนะสาร	สายพันธุ์ที่ผลิต	แหล่งของปฏิชีวนะสาร	สารละลายที่ใช้สกัด	ช่วงความยาวคลื่นที่สารดูดแสงมาก (λ_{max})
เทอริไมซิน	<u>Streptomyces ceolicolor</u> var. <u>aminophilus</u>	ภายในเซล	เอทธานอล (เปอร์เซนต์และ pH ของสารละลายไม่ได้รายงานไว้)	361, 383 และ 406 นาโนเมตร

จากตารางที่ 18 จะเห็นว่าสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย <u>Streptomyces</u> sp. CU 279 จะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับไมโคเฮปติน, แอนติไบโอติค X - 63 และเพอริไมซิน ซึ่งเป็นปฏิชีวนะสารชนิดเฮบตาอีน แต่เนื่องจากไม่สามารถทำสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย <u>Streptomyces</u> sp. CU 279 ให้บริสุทธิ์มากกว่านี้ได้จึงไม่สามารถศึกษาคุณสมบัติของสารทางด้านเคมีวิเคราะห์ (chemical analysis) ได้