



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
สัญญาเลขที่ RDG5550073

โครงการย่อยที่ 2

เรื่อง การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิตที่มีความสามารถในการยับยั้ง
การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง

โดย ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว และคณะ

กรกฎาคม 2556

สัญญาเลขที่ RDG5550073

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการย่อยที่ 2

เรื่อง การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิตที่มีความสามารถในการยับยั้ง
การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นายสิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. นางอารี ทองทุ่ง	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
4. นางทัศนีย์ มีพยุง	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปย่อรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)	การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีความสามารถในการยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง
(ภาษาอังกฤษ)	Screening of actinomycetes which has ability to inhibit growth of bacterial causing putrefaction of fresh latex

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล	ดร.นารีนลักษณ์ นาแก้ว
หน่วยงาน	ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ที่อยู่	ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
โทรศัพท์/โทรสาร	(055) 964622/ 964770 E-mail: nnakaew@hotmail.com

ผู้ร่วมโครงการ

- | | |
|---------------------------------|-------------------|
| 1. นายสิทธิศักดิ์ สร้อยเพชรเกษม | มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 2. นางอารี ทองทุ่ง | มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 3. นางทัศนีย์ มีพยุง | มหาวิทยาลัยนเรศวร |

งบประมาณทั้งโครงการ 140,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2555 – 31 กรกฎาคม 2556

ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญ

น้ำยางสดจะเกิดการเสียสภาพ เนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำยาง จึงมีการใส่สารเคมีที่เรียกว่า สารป้องกันการจับตัว (Anticoagulant) ลงไปเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเสียสภาพของน้ำยาง ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้แอมโมเนียและโซเดียมซัลไฟด์ ซึ่งแอมโมเนียเป็นสารที่ระเหยง่ายและมีกลิ่นรุนแรงมาก เมื่อระเหยสูบบรรยากาศจะทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม และยังส่งผลให้ยากต่อการควบคุมคุณสมบัติของน้ำยางธรรมชาติในระหว่างการเก็บรักษาให้คงที่อีกด้วย ส่วนโซเดียมซัลไฟด์จะก่อให้เกิดไอรระเหยเป็นกาซซัลเฟอร์ซึ่งเป็นอันตราย ระหว่างการจับตัวยางด้วยกรด จากปัญหาดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการวิจัยและพัฒนาหา สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบว่ามีรายงานการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดและดีที่สุด เพื่อช่วยในการรักษาสภาพของน้ำยาง เพื่อนำมาใช้ทดแทนแอมโมเนียและโซเดียมซัลไฟด์ การวิจัยหาสารรักษาสภาพชนิดใหม่นี้จะช่วยลดมลพิษทางอากาศ เพิ่มคุณภาพชีวิตของบุคคลที่ทำงานเกี่ยวข้องกับน้ำยาง ตั้งแต่ชาวสวนจนถึงผู้นำน้ำยางพารามาทำเป็นผลิตภัณฑ์ รวมถึงผู้ที่อาศัยอยู่ใกล้เขตโรงงานที่มีการใช้น้ำยางพารา และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมวัสดุและสิ่งก่อสร้างที่สัมผัสน้ำยาง

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยางและประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่คัดเลือกได้เทียบกับสารเคมีที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมยาง

ผลการดำเนินงาน

1. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการ

จากการนำ เชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 102 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia* เป็นแบคทีเรียทดสอบพบว่า ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*, *Staphylococcus*) ได้ดีที่สุด คือ 8-2-1 รองลงมา คือ B6 และ 9AAI ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ (*Serratia*) เชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทให้ผลการยับยั้งไม่ดี โดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 9 มิลลิเมตร

2. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์กับ streptomycin

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท (8-2-1, B6 และ 9AAI) มาทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (*Staphylococcus* sp.) เทียบกับสเตรปโตมัยซิน พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Staphylococcus* sp. ได้ดีกว่า ไอโซเลท B6 และ 9AAI รวมไปถึงสเตรปโตมัยซิน โดยสารสกัดหยาบจากไอโซเลท 8-2-1 ให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml ในขณะที่ Streptomycin ให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml

ดังนั้นจึงเลือกเอาสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 มาทำการทดสอบหาค่า MBC กับแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) สายพันธุ์อื่นๆ เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้รักษาสภาพน้ำยางโดยเปรียบเทียบกับ Streptomycin พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้ง *Staphylococcus* และ *Bacillus* ได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml ส่วนแบคทีเรียแกรมลบการใช้สารสกัดหยาบความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ (1000 µg/ml) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ ส่วน Streptomycin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml แบคทีเรียแกรมลบให้ค่า MBC เท่ากับ 250 µg/ml

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาสภาพน้ำยางสดพบว่า แอมโมเนียสามารถรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด รองลงมาคือโซเดียมซัลไฟด์ สารสกัดหยาบและสเตรปโตมัยซิน โดยรูปแบบการเตรียมสารสกัดมีผลต่อการรักษาสภาพน้ำยาง เมื่อเปรียบเทียบกับ สเตรปโตมัยซิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบพบว่า การเตรียมสารสกัดหยาบในรูปแบบที่ต่างกัน ทำให้มีผลต่อการรักษาสภาพน้ำยางโดยการเตรียมสารสกัดหยาบแบบที่ 1 (สารสกัด+เมทานอล+น้ำ) น้ำยางจะเกิดการเสียเร็วกว่าสเตรปโตมัยซิน 20 นาที แต่เมื่อปรับวิธีการเป็นวิธีที่ 2 (สารสกัด+เมทานอล) ทำ

ให้น้ำยางที่เดิมสารสกัดหยาบเสียช้ากว่าน้ำยางที่เดิมสเตรปโตมัยซิน 1 ชั่วโมง และเกิดการเสียสภาพเร็วกว่าโซเดียมซัลไฟต์เพียง 30 นาที

3. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 กับ แอมโมเนียและ Na_2SO_3

ผลการคิดต้นทุนการผลิต พบว่าสารสกัดหยาบมีต้นทุนการผลิตสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟต์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย

1. ผลจากการวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก
2. เมื่อนำสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 มาใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางโดยเปรียบเทียบกับสารรักษาสภาพอื่นๆ พบว่าแอมโมเนียรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด รองลงมาคือ โซเดียมซัลไฟต์ สารสกัดหยาบ และ สเตรปโตมัยซินโดยพบว่ารูปแบบการเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทมีผลต่อการรักษาสภาพน้ำยาง
3. ส่วนในเรื่องของต้นทุนการผลิตพบว่า สารสกัดหยาบมีต้นทุนการผลิตสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟต์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

1. ควรมีการวิจัยเพิ่มเติมต่อไปในเรื่องของการศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อเติมลงในน้ำยางโดยการใช้ตัวทำละลายอื่นนอกเหนือจากเมทานอล เนื่องจากเมทานอลจะทำให้น้ำยางเกิดการจับตัวกันบางส่วนซึ่งอาจมีผลต่อค่า VFA No.
2. ถ้าได้มีการวิจัยการใช้สารสกัดร่วมกับสารรักษาสภาพอื่นๆ อาจจะช่วยลดต้นทุนการผลิตและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำยางสดได้นานขึ้น
3. ในส่วนของต้นทุนการผลิตที่มีราคาสูงกว่าแอมโมเนียมาก ถ้าได้มีการวิจัยต่อเพื่อให้สารมีความบริสุทธิ์และมีการผลิตในสเกลที่ใหญ่ขึ้นอาจจะลดต้นทุนการผลิตลงได้บ้าง ซึ่งแม้ว่าจะมีราคาแพงกว่าและประสิทธิภาพด้อยกว่าแต่สารสกัดจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำมาใช้ทดแทนแอมโมเนียซึ่งสารสกัดนี้จะช่วยลดมลพิษทางอากาศ เพิ่มคุณภาพชีวิตของบุคคลที่ทำงานเกี่ยวข้องกับน้ำยาง ตั้งแต่ชาวสวนจนถึงผู้นำน้ำยางพารามาทำเป็นผลิตภัณฑ์ รวมถึงผู้ที่อาศัยอยู่ใกล้เขตโรงงานที่มีการใช้น้ำยางพารา และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมวัสดุและสิ่งก่อสร้างที่สัมผัสน้ำยางอีกด้วย

ผลงานทางวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

รหัสโครงการ: RDG5550073
 ชื่อโครงการ โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
 มหาวิทยาลัยนเรศวร
 ชื่อโครงการย่อยที่ 2 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ
 แบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง
 ชื่อนักวิจัย: ดร. นารีนักษณ์ นาแก้ว
 สังกัด: ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ม. นเรศวร
 โทรศัพท์: 055 964622
 E-mail: nnakaew@hotmail.com
 ระยะเวลาดำเนินโครงการ: 1 สิงหาคม 2555 – 31 กรกฎาคม 2556

บทคัดย่อ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเสียของน้ำยาง (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ของเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Dual culture bioassay และ Agar well diffusion method โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก พบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ไอโซเลท 8-2-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MBC) พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml ในแบคทีเรียแกรมลบพบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองคือ 1000 µg/ml ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ ส่วนสเตรปโตมัยซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml แบคทีเรียแกรมลบให้ค่า MBC เท่ากับ 250 µg/ml เมื่อนำใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางโดยเปรียบเทียบกับสารรักษาสภาพอื่นๆ พบว่าแอมโมเนียรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด รองลงมาคือ โซเดียมซัลไฟด์ สารสกัดหยาบ และ สเตรปโตมัยซิน โดยพบว่ารูปแบบการเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์มีผลต่อการรักษาสภาพน้ำยาง เมื่อเปรียบเทียบกับ สเตรปโตมัยซิน พบว่า การเตรียมสารสกัดหยาบรูปแบบที่ 1 (สารสกัด+เมทานอล+น้ำ) น้ำยางจะเกิดการเสียเร็วกว่าสเตรปโตมัยซิน แต่เมื่อปรับวิธีการเตรียมเป็นรูปแบบที่ 2 (สารสกัด+เมทานอล) ทำให้เกิดการเสียช้ากว่าน้ำยางที่เติมสเตรปโตมัยซิน 60 นาที และเกิดการเสียสภาพเร็วกว่าโซเดียมซัลไฟด์เพียง 30 นาที ส่วนในเรื่องของต้นทุนการผลิตพบว่า สารสกัดหยาบมีต้นทุนการผลิตสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟด์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

Project code: RDG5550073
Project title: Screening of actinomycetes which has ability to inhibit growth of bacterial causing putrefaction of fresh latex
Investigator: Dr. Nareeluk Nakaew
E-mail Address: nnakaew@hotmail.com
Project Period: 1 August 2555 – 31 July 2556

Abstract

The antibacterial activities of actinomycetes were tested by dual culture bioassay and agar well diffusion method. Results showed actinobacteria isolate 8-2-1 revealed the most distinctive antimicrobial activity against a number of common bacteria (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia* and *Escherichia*) causing putrefaction of fresh latex. The most susceptible test organisms were Gram positive bacteria. A crude extract derived from this isolate was used to determine the minimum bactericidal concentration (MBC). Results showed that the crude extract had an MBC value of 100 µg/ml against gram positive bacteria and the maximum concentration used in this research (1000 µg/ml) could not inhibit gram negative bacteria. The streptomycin had MBC value of 200 µg/ml and 250 µg/ml against gram positive bacteria and gram negative bacteria respectively. With the aim to evaluate the potential of crude extract for preservation of latex's quality compared to those other chemical preservatives, it was found that ammonia showed as the best preservative followed by sodium sulfite, crude extract and streptomycin. Furthermore, we found that difference of crude extract preparations influenced the preservative capacity compared to streptomycin. Whereas, the formula 1 (crude extract + methanol + water) caused deterioration of latex faster than streptomycin but the formula 2 (crude extract + methanol) caused a delay of deterioration, resulting in 60 min of extended preservative time compared to the use of streptomycin, which somehow caused faster deterioration than the use of sodium sulfite just 30 min. Concerning the investment cost, we found that the crude extract remained 77.9, 6,040 and 4,657 times higher cost than streptomycin, sodium sulfite and ammonia, respectively.

1. ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

น้ำยางสดจะคงสภาพอยู่ได้ไม่เกิน 6 ชั่วโมง เนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำยางจะย่อยสลายสารอาหารที่อยู่ในน้ำยาง ซึ่งจะทำให้เกิดกรดที่ระเหยง่าย ทำให้ pH ของน้ำยางลดลง ทำให้อนุภาคของยางเกิดการรวมตัวกันเองตามธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพของน้ำยางก่อนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ จึงมีการใส่สารเคมีที่เรียกว่าสารป้องกันการจับตัว (Anticoagulant) ลงไปเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเสียสภาพของน้ำยาง ซึ่งปัจจุบันแอมโมเนียได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางสดเพื่อการผลิตน้ำยางข้นและยางแท่ง แต่แอมโมเนียเป็นสารที่ระเหยง่ายและมีกลิ่นรุนแรงมากเมื่อระเหยสูบรรยากาศจะทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการกักกร่อนของโลหะและยังส่งผลให้ยากต่อการควบคุมคุณสมบัติของน้ำยางธรรมชาติในระหว่างการเก็บรักษาให้คงที่อีกด้วย นอกจากนี้แอมโมเนียแล้วยังนิยมใช้โซเดียมซัลไฟต์ในการรักษาสภาพน้ำยางสดเพื่อการเตรียมยางแผ่น ซึ่งโซเดียมซัลไฟต์มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียต่ำ จึงใช้เพื่อป้องกันการเสียของน้ำยางในระยะสั้น และก่อให้เกิดไอรระเหยเป็นกาซซัลเฟอร์ซึ่งเป็นอันตราย ระหว่างการจับตัวยางด้วยกรด

จากปัญหาดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการวิจัยและพัฒนาหา สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิที่ซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบว่ามีรายงานการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดและดีที่สุด เพื่อช่วยในการรักษาสภาพของน้ำยาง เพื่อนำมาใช้ทดแทนแอมโมเนียและโซเดียมซัลไฟต์ การวิจัยหาสารรักษาสภาพชนิดใหม่นี้จะช่วยลดมลพิษทางอากาศ เพิ่มคุณภาพชีวิตของบุคคลที่ทำงานเกี่ยวข้องกับน้ำยาง ตั้งแต่ชาวสวนจนถึงผู้นำน้ำยางพารามาทำเป็นผลิตภัณฑ์ รวมถึงผู้ที่อาศัยอยู่ใกล้เขตโรงงานที่มีการใช้น้ำยางพาราและยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมวัสดุและสิ่งก่อสร้างที่สัมผัสน้ำยาง

2. วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยางและประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิที่คัดเลือกได้เทียบกับสารเคมีที่ใช้อยู่ในอุตสาหกรรมยาง

3. ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

ในน้ำยางสดจะมีสารต่าง ๆ อยู่มากมายรวมถึงสารคาร์โบไฮเดรต สารคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ที่พบในน้ำยางธรรมชาติเป็นพวก 1-เมทิลลิโนซิลิทอล (1-methylinositol) หรือที่เรียกว่า คิวบราซิทอล (Quebrachitol) มีอยู่ประมาณร้อยละ 1 ในน้ำยาง และยังมีคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ อีกประมาณเล็กน้อย ได้แก่ กลูโคส ซูโครส กาแลคโตส และ ฟรุคโตส เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะถูกใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่มีอยู่ในน้ำยาง เช่น *Bacillus coagulans*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia ficaria*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacillus brevis* และ *Enterobacter aerogenes* (จุติพรและคณะ, 2008) ซึ่งการย่อยสลายของจุลินทรีย์จะทำให้สารเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acids, VFAs) กรดไขมันที่ระเหยได้ที่เคยมี

รายงานพบในน้ำยางได้แก่ กรดฟอร์มิก (Formic acid) กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดมาลิก (Malic acid) กรดซัคซินิก (Succinic acid) และกรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) ซึ่งกรดเหล่านี้ทำให้ pH ของน้ำยางลดลง ทำให้อนุภาคของยางเกิดการรวมตัวกันเองตามธรรมชาติมีผลทำให้น้ำยางเสียสภาพ โดยน้ำยางสดจะคงสภาพอยู่ได้ไม่เกิน 6 ชั่วโมง ถ้ามีการเก็บรักษาไม่ดี ดังนั้นเพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพของน้ำยางก่อนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ จึงมีการรักษาสภาพน้ำยางโดยการเติมสารชนิดต่าง ๆ ลงไป

คุณสมบัติของสารที่ใช้เป็นสารรักษาสภาพน้ำยาง

1. ควรทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำยางได้
2. ช่วยเพิ่มสถานะคอลลอยด์ของน้ำยาง โดยการเพิ่มประจุ และเพิ่มพลังงานระหว่างอนุภาคยางกับส่วนที่เป็นน้ำ
3. ควรมีความเป็นต่าง เช่นเดียวกับน้ำยาง
4. ควรเป็นสารที่ทำให้อนุมูลของพวกโลหะไม่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยการขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา หรือ อาจทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นเกลือที่ไม่ละลายน้ำก็ได้
5. ไม่มีพิษต่อทั้งคนและไม่ทำให้คุณสมบัติของเนื้อยางเปลี่ยนไป
6. ไม่ควรทำให้สีของน้ำยางหรือสีของยางที่แห้งแล้วเปลี่ยน
7. ควรมีราคาถูก ขนย้ายได้ง่าย

หลักการเตรียมสารเคมีสำหรับน้ำยาง

สารเคมีนั้นจะต้องเข้าได้กับตัวกลางของน้ำยาง คือ น้ำ ,ต้องมี pH เป็นต่างเหมือนกับน้ำยาง และควรมี Stabilizer เหมือนน้ำยาง และต้องมีการเตรียม dispersion เพื่อให้ขนาดอนุภาคของสารเคมีมีขนาดเล็ก จะได้กระจายอยู่ในน้ำยางอย่างสม่ำเสมอ ไม่ตกตะกอนแยกชั้นออกมา ในทางทฤษฎี ขนาดของอนุภาคที่เหมาะสมที่สุดน่าจะพอๆ กับขนาดอนุภาคเม็ดยาง จะได้แขวนลอยในอัตราเดียวกัน เนื่องด้วยน้ำยางจากธรรมชาติจะเกิดการเสียสภาพการเป็นของเหลวและจับตัวแข็งและมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (เม็ดพริก) ภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วโมงหลังจากถูกกรีดออกจากต้นยาง การจับตัวดังกล่าวจะช้าหรือเร็วเพียงใดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิของสภาพแวดล้อม คุณสมบัติความคงตัวของน้ำยางแต่ละพันธุ์ เป็นต้น เมื่อเกิดการเสียสภาพ น้ำยางจะแยกออกเป็น สองส่วน คือส่วนของน้ำยางกับส่วนของเซรุ่ม และภายหลังจากน้ำยางจับตัวแล้ว จะมีกลิ่นบูดเหม็นของน้ำยางเกิดขึ้น ฉะนั้น เพื่อป้องกันมิให้น้ำยางจับตัวเป็นก้อนและเพื่อไม่ให้มีกลิ่นบูดเหม็นเกิดขึ้น จึงมีความจำเป็นต้องรักษาสภาพน้ำยางให้น้ำยางเหลวเหมือนเมื่อแรกออกจากต้น

การรักษาสภาพน้ำยางแบ่งเป็น

1. การรักษาสภาพน้ำยางไว้ให้คงสภาพเหลวอยู่ในช่วงเวลาสั้น (short-term preservation)

มีจุดประสงค์หลักเพื่อรักษาน้ำยางให้คงอยู่เป็นของเหลวได้ 2-3 วันก่อนที่จะนำเข้าสู่กรรมวิธีการผลิตยางแห้งรูปต่างๆ หรือ ก่อนการทำเป็นน้ำยางข้น สารเคมีที่ใช้เรียกว่า สารป้องกันน้ำยางจับตัว (anticoagulant) นิยมใช้ในอุตสาหกรรมทำยางแผ่นยางแท่งสารเคมีเหล่านี้ได้แก่

○ แอมโมเนีย มีลักษณะเป็นก๊าซ มีฤทธิ์เป็นด่าง ทำให้เกิดการระคายเคืองจมูก เตรียมใช้งานโดยการละลายในน้ำ ทำให้น้ำยางมีความเสถียรมากขึ้น และช่วยกำจัดแมงกนีเซียมในน้ำยางสด โดย

ใช้ปริมาณ 0.01-0.05% ต่อน้ำหนักน้ำยาง สามารถเก็บรักษาน้ำยางได้ 3-10 ชั่วโมง หากต้องการเก็บนาน 1-2 วัน ต้องใช้ปริมาณ 0.15% ต่อน้ำหนักน้ำยาง

○ **ฟอร์มัลดีไฮด์** มีลักษณะเป็นก๊าซ เตรียมใช้งานในรูปของก๊าซละลายน้ำ เรียกว่า ฟอร์มาลิน เข้มข้น 38-40% ระหว่างการเก็บสามารถเปลี่ยนรูปเป็นกรดฟอร์มิกได้ ดังนั้น ก่อนใช้งานต้องทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมคาร์บอเนต หรือโซเดียมซัลไฟท์ โดยใช้งานเข้มข้น 1% ก็มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้

○ **โซเดียมซัลไฟท์** เตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายเข้มข้น 3-5% น้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ในน้ำยาง 0.02-0.08% โดยน้ำหนัก (เทียบกับเนื้อยางแห้ง) แนะนำให้ใช้ที่ 0.05% ต่อน้ำหนักน้ำยาง โดยส่วนแรกให้หยดลงไปในตัวรองรับน้ำยาง และส่วนที่เหลือให้ใส่ลงในถังรวบรวมน้ำยางสด และให้เตรียมใช้งานวันต่อวัน

○ **โซเดียมคาร์บอเนต** มีลักษณะเป็นผลสีขาว มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนๆ สามารถลดปริมาณกรดที่เกิดขึ้นในน้ำยางสดได้ สามารถเก็บรักษาน้ำยางสดได้ในระยะเวลาช่วงสั้นๆ 1-2 ชั่วโมง ถ้าใช้ปริมาณสูงขึ้นจะเก็บรักษาได้นานขึ้น

○ **บอแรกซ์** มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนๆ สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ และสามารถเก็บรักษาน้ำยางโดยไม่ทำให้ยางมีสีเข้ม

2. การรักษาสภาพน้ำยางไว้ให้คงสภาพเหลวอยู่ได้นาน (long-term preservation)

มีจุดประสงค์หลักเพื่อรักษาสภาพน้ำยางในช่วงระยะเวลาการเก็บสต็อกและการขนส่งจากโรงงานผลิต ไปโรงงานอุตสาหกรรมผลิตวัตถุดิบสำเร็จรูปต่างๆ ใช้ในการรักษาน้ำยางสดเพื่อทำน้ำยางข้น สารเคมีที่ใช้เรียกว่า สารรักษาสภาพน้ำยาง (preservatives) นิยมใช้สารละลายแอมโมเนีย (Spence and Neil, 1936) การใช้แอมโมเนีย หากใส่ในปริมาณที่น้อยกว่า 0.05% จะทำให้ pH เพิ่มขึ้นจาก 6.5 เป็น 8 ซึ่งเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงขึ้น ดังนั้นต้องใส่ปริมาณสูง กว่า 0.1% ขึ้นไป และในทางปฏิบัติ จะใส่ปริมาณ 0.3-0.5% การเพิ่มปริมาณแอมโมเนียในน้ำยาง ทำให้การเจริญเติบโตของแบคทีเรียในน้ำยางลดลง กรดที่ระเหยง่าย ซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย ย่อยสลายสารอาหารในน้ำยางจะมีค่าต่ำ

การเติมแอมโมเนียแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ (1) การรักษาสภาพน้ำยางสดที่กรีดได้ก่อนส่งโรงงาน ซึ่งจะใช้สารละลายแอมโมเนียความเข้มข้นประมาณ 15-20% โดยน้ำหนัก และ(2) การรักษาคุณภาพน้ำยางข้นซึ่งจะเติมหลังจากการปั่นแยก โดยในการเติมปริมาณแอมโมเนียแบ่งตามประเภทการผลิตน้ำยางข้น คือ น้ำยางข้นชนิด Low Ammonia (LA) : เติมแอมโมเนียร่วมกับสารเคมีอื่นในปริมาณแอมโมเนีย ที่น้อยกว่า 0.29 % ของน้ำยาง และน้ำยางข้นชนิด High Ammonia (HA) : เติมปริมาณแอมโมเนีย 0.3-0.7 % ของน้ำยาง (กรมควบคุมมลพิษ, 2548)

การใช้แอมโมเนียร่วมกับสารเคมีอื่น

สารเคมีอื่นที่ใช้ร่วมกับแอมโมเนีย เรียกว่า Secondary Preservative ได้แก่ ซิงค์ออกไซด์, กรดบอริก, โซเดียมเพนตะคลอโรฟิเนท, ซิงค์ไดออกไซด์ไทโอคาร์บาเมท และ เตตระเมทิลไทยแรมไดซัลไฟด์

1. โซเดียมเพนตะคลอโรฟีเนท (SPP)

○ SPP 0.2% ร่วมกับแอมโมเนีย 0.1% ต่อน้ำหนักของน้ำยาง สามารถเก็บรักษาน้ำยางสดได้นาน 120 วัน

○ SPP 0.2% ร่วมกับแอมโมเนีย 0.275% ต่อน้ำหนักของน้ำยาง สามารถเก็บรักษาน้ำยางสดได้นาน โดยเรียกน้ำยางชนิดนี้ว่า LA-SPP ซึ่งเป็นน้ำยางที่มีความเสถียรสูงมาก อาจมีปัญหาในการแปรรูปและทำให้ง่ายมีสีคล้ำ รวมทั้งเป็นอันตรายต่อการทำผลิตภัณฑ์ประเภท อาหารและยา จึงไม่นิยมใช้ในปัจจุบัน

2. กรดบอริก

○ แอมโมเนีย 0.2% ร่วมกับกรดบอริก 0.2% และโซลลอริกไป 0.05% เพื่อให้น้ำยางมีความเสถียรขึ้น จะทำให้เก็บน้ำยางสดได้เป็นเวลานาน เรียกน้ำยางชนิดนี้ว่า LA-BA

○ แอมโมเนีย 0.25% ร่วมกับกรดบอริก 0.25% จะทำให้เก็บน้ำยางสดได้เป็นเวลานาน และจะให้ยางแผ่นสีจาง สวย แต่มีข้อเสีย คือ ความเสถียรของน้ำยางต่อ ZnO ต่ำ ทำให้ง่ายนิวคลาไนซ์ช้า

3. ซิงค์ไดอัลคิลไดไทโอคาร์บาเมท (ZDC)

○ ZDC 0.2% และกรดลอริก 0.2% เรียกน้ำยางชนิดนี้ว่า LA-ZDC มีความเสถียรต่ำและไม่สามารถเก็บได้นาน

4. ซิงค์ออกไซด์ (ZnO)

○ ZnO 0.04% ใช้ร่วมกับแอมโมเนีย 0.15% สามารถเก็บรักษาน้ำยางสดได้ประมาณ 2 เดือนโดยที่ปริมาณกรดที่ระเหยได้คงที่ในระดับต่ำ

5. ซิงค์ออกไซด์ (ZnO) ร่วมกับ เตตระเมทิลไทูแรมไดซัลไฟด์ (TMTD)

○ แอมโมเนีย 0.2% ร่วมกับ ZnO 0.025% และ TMTD 0.025% สามารถเก็บน้ำยางได้นานขึ้น แต่ต้องระมัดระวังเนื่องจากสาร TMTD และ ZnO ทำให้โมเลกุลของยางเกิดพันธะทางเคมีได้ หากใส่ปริมาณสูงเพียงพอจะทำให้ยางเกิดการจับตัวเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไปในน้ำยางที่อุณหภูมิสูง เรียกน้ำยางชนิดนี้ว่า 0.2% แอมโมเนีย + 0.025% TMTD + 0.025% ZnO + 0.04% Lauric acid ว่า LA-TZ มีข้อเสียคือ TMTD ก่อให้เกิด nitrosamine ขณะเกิดการวัลคาไนซ์ (อาจทำให้เกิดมะเร็ง)

ในช่วง 30-40 ปีที่ผ่านมา มีความพยายามในการลดปริมาณการใช้แอมโมเนียลง เนื่องจากแอมโมเนียเป็นสารที่ระเหยง่ายและมีกลิ่นรุนแรงมาก เมื่อระเหยสู่อากาศจะทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการกัดกร่อนของโลหะ และยังส่งผลให้ยากต่อการควบคุมคุณสมบัติของน้ำยางธรรมชาติในระหว่างการเก็บรักษาให้คงที่อีกด้วย

จากปัญหาดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการวิจัยเพื่อหาสารรักษาสภาพน้ำยางสดที่นำมาใช้ทดแทนแอมโมเนีย ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นจะศึกษาแอดดิติฟในสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของสารรักษาสภาพน้ำยาง เชื้อแอคติโนมัยซิตซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบว่ามีการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดและดีที่สุด เพื่อช่วยในการรักษาสภาพของน้ำยาง เพื่อลดปริมาณการใช้แอมโมเนียลง หรืออาจจะไม่ต้องใช้แอมโมเนียเลย การวิจัยหาสารรักษาสภาพชนิดใหม่จะช่วยลดมลพิษทางอากาศ เพิ่มคุณภาพชีวิตของบุคคลที่ทำงาน

เกี่ยวข้องกับน้ำยาง ตั้งแต่ชาวสวนจนถึงผู้นำน้ำยางพารามาทำเป็นผลิตภัณฑ์ รวมถึงผู้ที่อาศัยอยู่ใกล้เขตโรงงานที่มีการใช้น้ำยางพารา และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมวัสดุและสิ่งก่อสร้างที่สัมผัสน้ำยาง

เชื้อแอสโคไมซีตเป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ใน order Actinomycetales ที่มีปริมาณ guanine และ cytosine ในเซลล์สูงกว่า 55 % จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนเล็กน้อยในการเจริญแอสโคไมซีตนับว่าเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อในสกุล Streptomyces โดยพบว่าสามในสี่ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันได้มาจากแอสโคไมซีตกลุ่มนี้ (Takizawa et al., 1993) จากเหตุผลดังกล่าวในเวลา 50 ปีที่ผ่านมา ทำให้มีการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะจาก Streptomyces กันอย่างกว้างขวาง

Castillo et al. (2003) รายงานว่าสารปฏิชีวนะ kakadumycins ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. NRRL 30566 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ส่วนสารปฏิชีวนะ meroparamycin ที่ผลิตโดย Streptomyces sp. MAR01 สามารถยับยั้งได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และ Candida albicans (El-Naggaret al., 2006) หรือ Streptomyces padanus สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ fungichromin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา Rhizoctonia solani ได้ (Shih et al., 2003) สารปฏิชีวนะ ivermectin จาก Streptomyces avermectinarius ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในปศุสัตว์ สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากปรสิตทั้งที่อยู่บนผิวหนังและภายในร่างกายสัตว์ เช่น หนอนตัวกลม เห็บ พยาธิ ตัวไร นิยมนำมาใช้ในสัตว์จำพวก โค แกะ ม้า หมู เป็นต้น (Omura and Crump, 2004)

4. วิธีการ

1. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเชื้อแอสโคไมซีตที่มีในห้องปฏิบัติการ โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*, *Staphylococcus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ในขั้นปฐมภูมิ ด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett et al., 1996) ทำได้โดยการเพาะเชื้อแอสโคไมซีตไว้ด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะแบคทีเรียโดยใช้หยดเชื้อชิดเป็นแนวตั้งฉากกับเชื้อแอสโคไมซีต จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตดูโซนการยับยั้ง (Inhibition Zone) ที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำในเชื้อแต่ละไอโซเลต

จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโซนการยับยั้งกว้าง 40 มิลลิเมตรขึ้นไป ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในขั้นทุติยภูมิ ด้วยวิธี Agar well diffusion method โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอสโคไมซีตในอาหาร ISP2 broth บนเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้มาหยดลงในหลุมในอาหาร Mueller Hinton agar ที่มีการเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียทดสอบบนผิวหน้าอาหาร จากนั้น บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตดู clear zone ที่เกิดขึ้น (ทำการทดลอง 3 ซ้ำในเชื้อแต่ละไอโซเลต) คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone กว้างสุด 3 อันดับแรก ไปประเมินศักยภาพ เทียบกับสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ได้จากเชื้อแอสโคไมซีตที่มีขายในทางการค้า (streptomycin)

2. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกับ streptomycin

2.1 การเตรียมสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิท

2.1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้ในอาหาร ISP2 broth บนเครื่องเขย่า บ่ม ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

2.1.2 เติมน้ำทำละลาย (ethyl acetate) ลงไปในอาหาร ข้อ 2.1.1 ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เขย่า ทุก 15 นาที

2.1.3 แยกส่วนของ ethyl acetate ออกมา ทำการระเหย ethyl acetate ออกด้วยเครื่อง evaporator เก็บส่วนที่เหลือ (สารสกัด หรือ crude extract) ไว้ทดสอบในขั้นต่อไป

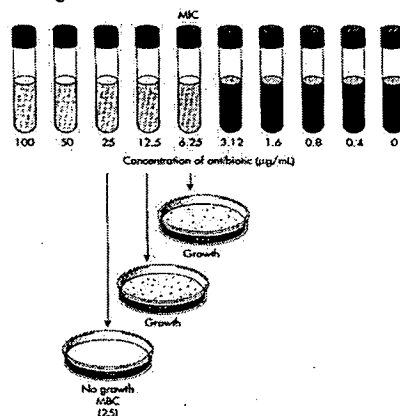
2.2 ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) เทียบกับสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีขายในทางการค้า (streptomycin) โดยเจือจางสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิท และ streptomycin ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น) เปรียบเทียบค่า MIC ที่ได้ และนำปริมาณสารที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบต้นทุน

วิธีการหาค่า MIC ด้วยวิธี broth tube dilution method ทำได้ดังนี้

2.2.1 เจือจางสารสกัด streptomycin ด้วยอาหารเหลว TSB ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็น ลำดับ ๆ

2.2.2 เติมเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวลงในทุกๆหลอดของข้อ 2.2.1 หลอดละ 50 ไมโครลิตร

2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำมาอ่านผลหาค่า MIC (หลอดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตจากความขุ่นที่เกิดขึ้น) ดังภาพ 1



ภาพ 1 ขั้นตอนการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC)

แต่เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณน้อย ดังนั้นในขั้นตอนของการทำเจือจางจึงต้องใช้ปริมาณของอาหารที่นำมาเจือจางน้อยลง โดยปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 1 มล. จึงสังเกตความขุ่นได้ยาก ดังนั้นจึงนำสารละลายในแต่ละความเข้มข้นมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 agar เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) โดยดูจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด นั่นคือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร ISP2 agar เนื่องจากการสกัดสารเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบของแต่ละไอโซเลทเพื่อให้ได้ปริมาณมากพอที่จะใช้ทดสอบต้องใช้เวลานาน ดังนั้นการทดลองจะนำสารสกัดหยาบของไอโซเลทที่ให้ขนาดของเคลียร์โซนสูงสุด 3 อันดับแรกมาหาค่า MBC กับ *Staphylococcus* ก่อน จากนั้นคัดเลือกเอาไอโซเลทที่ให้ค่า MBC ต่ำสุดมาทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบแกรมบวกและแกรมลบอื่นๆ เพื่อเปรียบเทียบกับ Streptomycin ต่อไป

2.3 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสด

2.3.1 ตรวจสอบปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณเนื้อยางแห้งของน้ำยางที่ใช้ในการวิจัย

2.3.2 เตรียมสารสกัดหยาบของเชื้อ 8-2-1 โดยละลายสารสกัด 800 มิลลิกรัม ด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร (ดังนั้นมีความเข้มข้นเท่ากับ 160 มก./มล.)

2.3.3 เติมสารรักษาสภาพน้ำยางชนิดต่างๆลงไปดังตาราง 1

ตาราง 1 ปริมาณสารรักษาสภาพที่เติมลงในน้ำยาง

ลำดับ	สารรักษาสภาพ	ความเข้มข้น	ปริมาณที่ใช้	ปริมาณน้ำยาง (มล.)
1	สารสกัดหยาบจาก 8-2-1	16 มก./มล	25 มล.	375
2	สารสกัดหยาบจาก 8-2-1	160 มก./มล.	2.5 มล.	397.5
3	Streptomycin	32 มก./มล	25 มล.	375
4	สารละลายแอมโมเนีย	25%	1	399
5	โซเดียมซัลไฟด์	3 %	11 มล.	389
6	ชุดควบคุม (ไม่เติมสารรักษาสภาพ)	-	-	400

หมายเหตุ : ลำดับที่ 1 ใช้สารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.3 ปริมาณ 2.5 มล. แล้วเติมน้ำกลั่น 22.5 มล.
ลำดับที่ 2 ใช้สารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.3

2.3.4 สังเกตการเสียของน้ำยางโดยดูการจับตัวกันของเนื้อยาง, ทดสอบการกระจายตัวของน้ำยางสดในน้ำ และการหาค่า VFA No. ที่เวลา 0 3 6 9 และ 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งมีวิธีการเตรียมสารสกัดหยาบ 8-2-1 ต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบวิธีการเตรียม หรือ ปริมาณของสารที่ใช้ในการละลายสารสกัดหยาบว่ามีผลต่อการจับตัวของน้ำยางหรือไม่ โดยการทดสอบครั้งที่ 1 ใช้การเตรียมสารลำดับที่ 1 การทดสอบครั้งที่ 2 ใช้การเตรียมสารตามลำดับ 2 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง)

3. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 กับ แอมโมเนียและ Na_2SO_3

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 และ metalaxyl โดยการผลิตสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ทำโดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ในอาหาร ISP2 ปริมาณ 1000 มล. (สูตร ISP2: yeast extract 4 กรัม, malt extract 10 กรัม, glucose 4 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate 2000 ml (ethyl acetate สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก จะมีการสูญเสียเนื่องจากการระเหยระหว่างการสกัดไม่เกิน 50 มิลลิลิตร) ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator นำตัวทำละลายกลับ去做การสกัดสารใหม่อีก 9 รอบ

ผลการวิจัย

1. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเสียของน้ำยาง (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ขึ้นปรูมภูมิ โดยวิธี dual culture bioassay ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวนทั้งหมด 102 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 28 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ และมี 11 ไอโซเลทที่ให้ขนาดของโซนการยับยั้งใน *Staphylococcus* และ *Bacillus* มากกว่า 40 มิลลิเมตร ดังตาราง 2 ดังภาพ 2

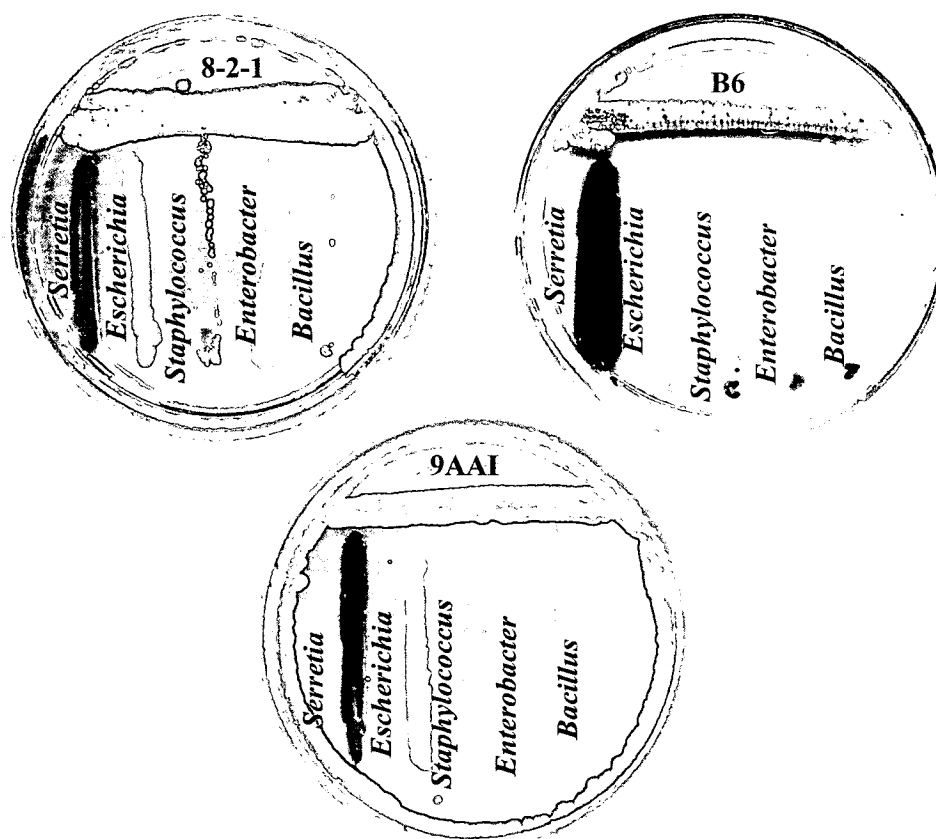
นำเชื้อแอคติโนมัยสิททั้ง 11 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียขึ้นหุติภูมิเพื่อหาสายพันธุ์ที่สร้างสารต้านเชื้อราได้ดีที่สุดในอาหารเหลว โดยวิธี agar well diffusion พบว่าไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* ได้ดีที่สุด คือ 8-2-1 รองลงมา คือ B6 และ 9AAI โดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 49, 37 และ 12 mm. ตามลำดับ ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus* ได้ดีที่สุด คือ 8-2-1 รองลงมาคือ B6 และ 9AAI โดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 47, 34 และ 15 mm. ตามลำดับ โดยทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Serratia* ได้ดีเท่ากันโดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 9 มิลลิเมตร ดังตาราง 3 ภาพ 3

ตาราง 2 เชื้อแอคติโนมัยสิทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งมากกว่า 40 มิลลิเมตร

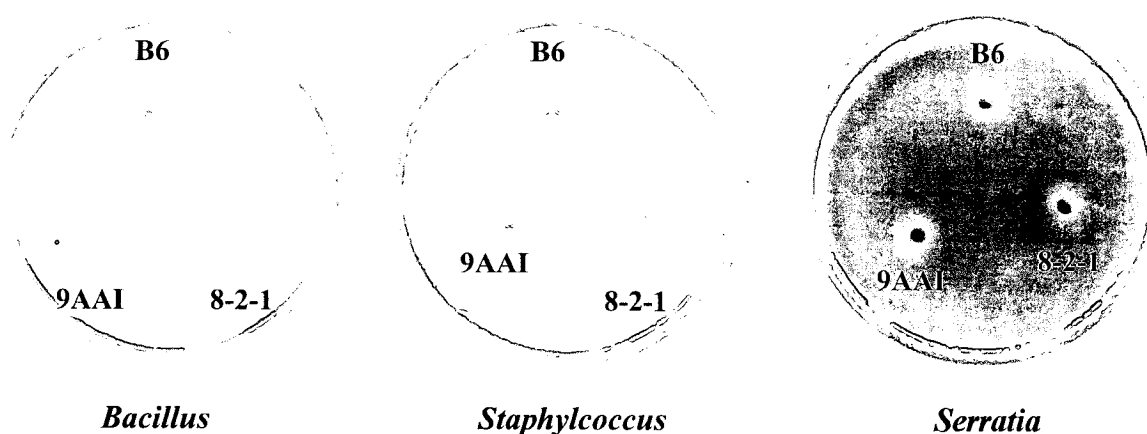
เชื้อแอคติโนมัยสิท	ขนาดของโซนการยับยั้ง (มม.)				
	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Bacillus</i>
228	0	0	45	0	47
Ex5.4	0	0	43	0	48
8-2-1	0	0	56	0	58
4-1	0	0	44	0	45
7AB	0	0	47	0	46
F2	0	0	48	0	47
2-1	0	0	43	0	45
A11	0	0	44	0	43
B6	0	0	51	0	49
9AAI	0	0	58	0	56
A18	0	0	40	0	41

ตาราง 3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยสิทโดยวิธี agar well diffusion

เชื้อแอคติโนมัยสิท	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มม.)				
	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Bacillus</i>
228	0	0	7	0	6
Ex5.4	0	0	8	0	7
8-2-1	9	0	47	0	49
4-1	0	0	8	0	7
7AB	0	0	9	0	9
F2	0	0	7	0	8
2-1	0	0	7	0	8
A11	0	0	8	0	7
B6	9	0	34	0	37
9AAI	9	0	15	0	12
A18	0	0	8	0	7



ภาพ 2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการชั้นปฐมนูมิ โดยวิธี Dual culture bioassay ของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1, B6 และ 9AAI



ภาพ 3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการชั้นทุติยภูมิ โดยวิธี agar well diffusion ของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1, B6 และ 9AAI

2. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกับ streptomycin

นำเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท (8-2-1, B6 และ 9AAI) มาเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth ทำการสกัดสารต้านการเจริญของแบคทีเรียด้วย ตัวทำละลาย (ethyl acetate) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำชั้นของ ethyl acetate ไปทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator นำส่วนของสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (*Staphylococcus* sp.) เทียบกับ streptomycin พบว่าสารสกัดที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 ให้ค่า MBC ต่ำสุดคือเท่ากับ 100 µg/ml ในขณะที่ Streptomycin ให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml ดังตาราง 4 ภาพ 4 และ 5

ดังนั้นจึงเลือกเอาสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 มาทำการทดสอบหาค่า MBC กับแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) เปรียบเทียบกับ Streptomycin พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้ง *Staphylococcus* และ *Bacillus* ได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MBC กับแบคทีเรียแกรมลบ มากกว่า 1000 µg/ml ดังตาราง 5 สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน Streptomycin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml แบคทีเรียแกรมลบให้ค่า MBC เท่ากับ 250 µg/ml ดังตาราง 6

ตาราง 5 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1

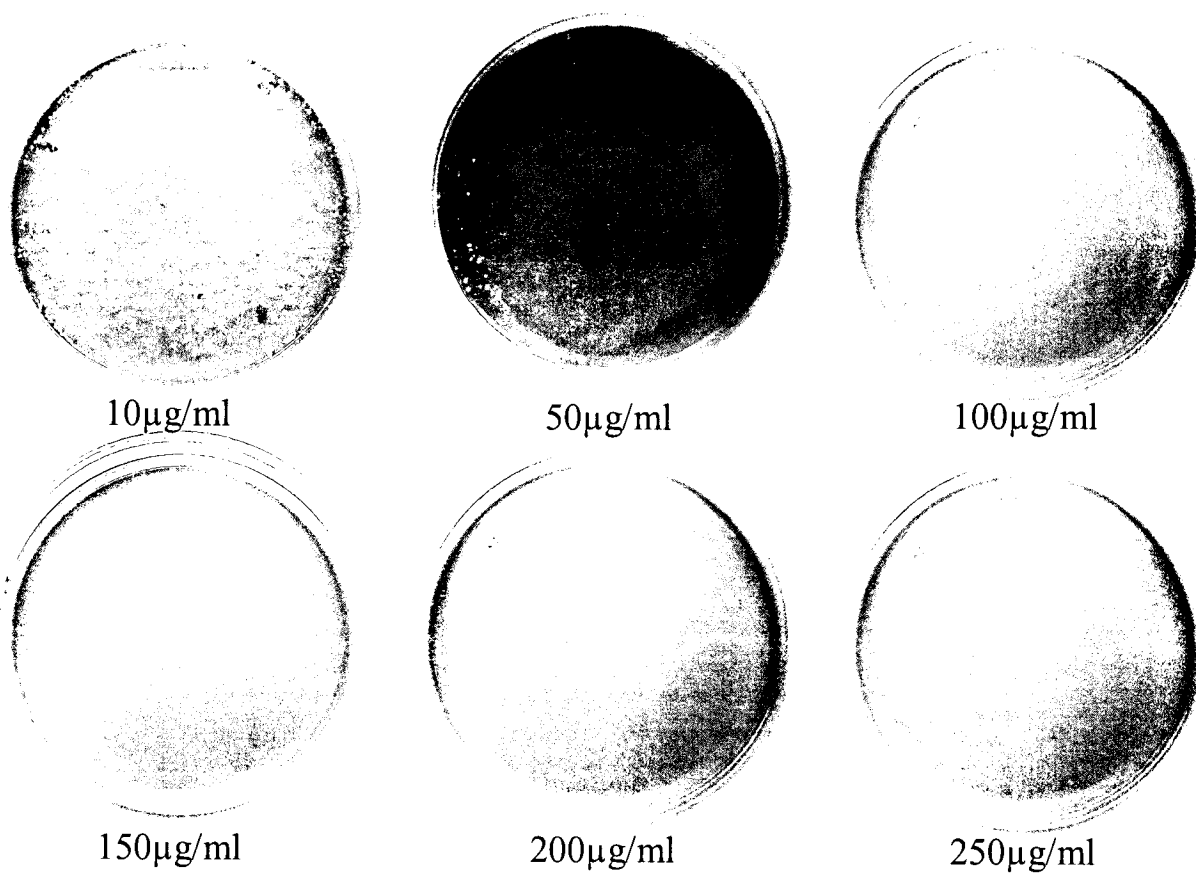
แบคทีเรีย	ความเข้มข้นสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิท (µg/ml)												
	20	25	30	50	100	150	200	250	300	400	600	800	1000
<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ มีการเจริญของแบคทีเรีย, - ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย

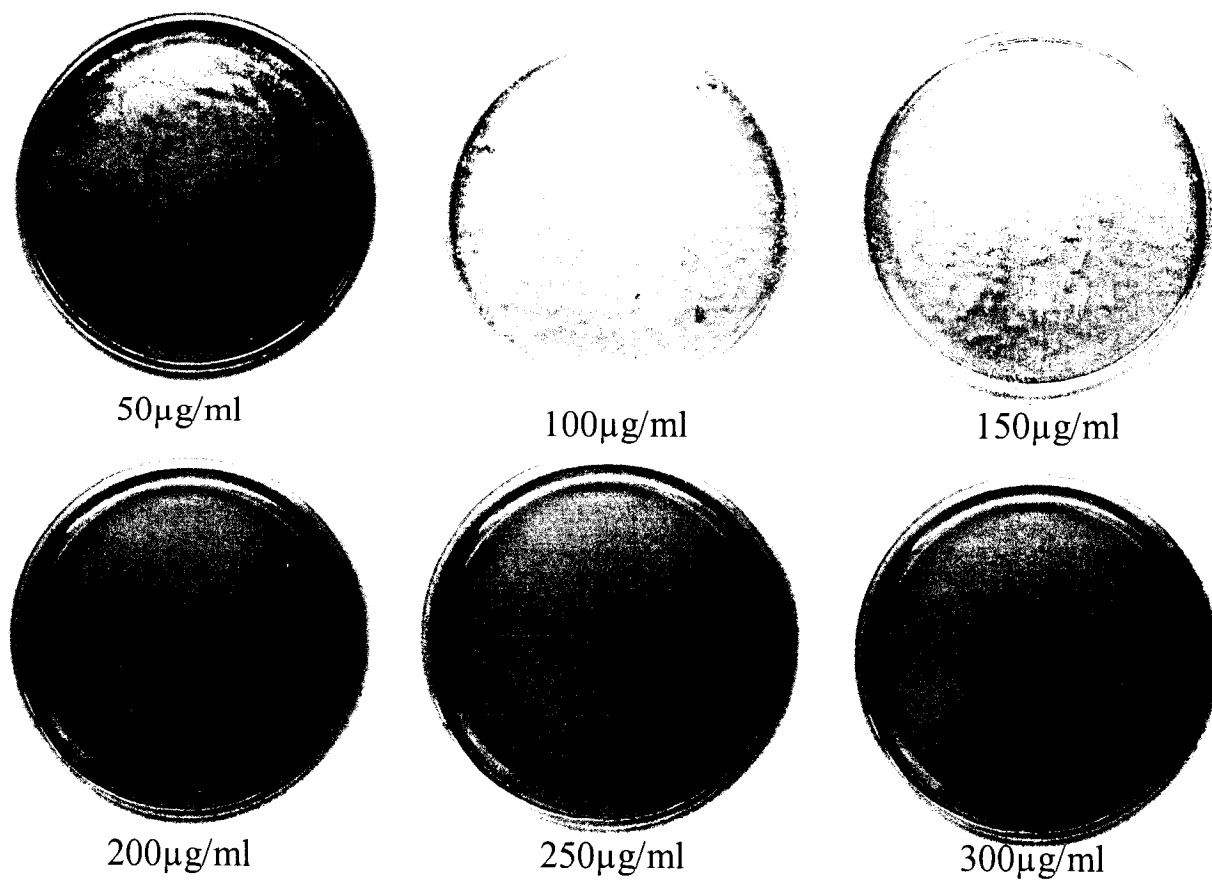
ตาราง 6 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสาร streptomycin

แบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสาร streptomycin (µg/ml)												
	1	5	10	15	20	25	30	50	100	150	200	250	300
<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Serratia</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+ มีการเจริญของแบคทีเรีย, - ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย



ภาพ 4 ผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus* ของสารสกัดจากเชื้อไอโซเลต 8-2-1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพ 5 ผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus* ของสาร Streptomycin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาสภาพน้ำยางสด

ผลจากการนำสารสกัดจากเชื้อแอคติโนไมซีตไอโซเลท 8-2-1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสดเปรียบเทียบกับ Streptomycin และสารที่ใช้ในการรักษาสภาพน้ำยาง โดยสังเกตการเสียของน้ำยางโดยดูการจับตัวกันของเนื้อยาง, การหาค่า VFA No. ที่เวลา 0 3 6 9 และ 24 ชั่วโมง โดยการใช้น้ำยางที่มีคุณสมบัติต่างกันในการทดลอง พบว่าค่า VFA No. ของน้ำยางในแต่ละชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงดังตาราง 7

ตาราง 7 การเปลี่ยนแปลงค่า VFA No. ของน้ำยางในแต่ละชุดการทดลอง

		VFA No. ของสารรักษาสภาพแต่ละชนิด				คุณสมบัติน้ำยาง	
เวลา (ชม.)		เชื้อ8-2-1	streptomycin	Na ₂ SO ₃	NH ₄ OH	ปริมาณของแข็งทั้งหมด	ปริมาณเนื้อยางแห้ง
ครั้งที่ 1	0	0.0439	0.0393	0.1805	0.0365	44.276	42.4425
	3	ND	ND	0.1851	0.0851		
	6	ND	ND	0.1898	0.2946		
	9	ND	ND	ND	ND		
	12	ND	ND	ND	ND		
เวลาที่น้ำยางเสียสภาพ		1 ชม. 50 นาที	2 ชม. 10 นาที	8 ชม.	> 8 ชม.		
ครั้งที่ 2	0	0.021	0.021	0.1049	0.0186	37.6738	35.1499
	3	0.021	0.0233	0.1530	0.0225		
	6	0.0861	ND	0.1585	0.0248		
	9	ND	ND	ND	ND		
	12	ND	ND	ND	ND		
เวลาที่น้ำยางเสียสภาพ		4 ชม. 30 นาที	3 ชม. 30 นาที	5 ชม.	> 8 ชม.		

หมายเหตุ: การเสียสภาพ = สังเกตว่าน้ำยางมีลักษณะเป็นเม็ดฟริก และทำให้ไม่สามารถวัดค่า VFA No. ต่อไปได้
ND = ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ครั้งที่ 1 การเตรียมสารสกัดหยาบ: เตรียมสารสกัดหยาบเหมือนลำดับที่ 1 ในตาราง 1
น้ำยางที่ใช้ในการทดลอง: ถูกทิ้งนานประมาณ 5 ชั่วโมง หลังกรีต

ครั้งที่ 2 การเตรียมสารสกัดหยาบ: เตรียมสารสกัดหยาบที่เหมือนลำดับที่ 2 ในตาราง 1
น้ำยางที่ใช้ในการทดลอง: ถูกทิ้งนานประมาณ 3 ชั่วโมง หลังกรีต

จากตาราง 7 แอมโมเนียสามารถรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด การทดลองครั้งที่ 1 ค่า VFA No. เริ่มต้นของน้ำยางค่อนข้างสูงคือ เท่ากับ 0.0365 ทำให้ในชั่วโมงที่ 6 ของการทดลองค่า VFA No. ของน้ำยางสูงโดยพบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมงน้ำยางที่เติมแอมโมเนียยังมีค่า VFA No. สูงกว่าค่ามาตรฐานน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น (>0.07) แต่น้ำยางยังคงไม่เกิดการเสียสภาพ ในการทดลองครั้งที่ 2 ค่า VFA No. เริ่มต้นต่ำกว่าการทดลองครั้งแรกคือมีค่าเท่ากับ 0.0186 ดังนั้นหลังการเติมแอมโมเนีย 6 ชั่วโมง น้ำ

ยางมีค่า VFA No. เพิ่มขึ้นเพียง 0.0062 ซึ่งค่า VFA No. ที่ชั่วโมงที่ 6 ยังอยู่ในค่ามาตรฐานของน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น

ผลจากการเตรียมสารสกัดหยาบในรูปแบบที่ต่างกัน คือ แบบที่ 1 ใช้ในการทดลองครั้งที่ 1 เตรียมโดยใช้สารสกัดหยาบ 4 กรัมละลายในเมทานอล 2.5 มล. จากนั้นละลายในน้ำกลั่น 22.5 มล. แล้วเติมลงในน้ำยาง 375 มล. วิธีการเตรียมแบบที่ 2 ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 เตรียมโดยใช้ สารสกัด 4 กรัมละลายในเมทานอล 2.5 มล.แล้วผสมลงในน้ำยาง 397.5 มล. พบว่าการเติมน้ำลงในสารสกัดในการเตรียมแบบที่ 1 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า สเตรปโตมัยซิน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมแบบที่ 2 ซึ่งจากตารางจะพบว่าการเตรียมสารสกัดหยาบวิธีที่ 1 น้ำยางชุดที่เติมสารสกัดหยาบจะเกิดการเสียเร็วกว่าสเตรปโตมัยซิน 20 นาที แต่เมื่อปรับวิธีการเป็นวิธีที่ 2 โดยการไม่เติมน้ำทำให้น้ำยางที่เติมสารสกัดหยาบเสียช้ากว่าน้ำยางที่เติมสเตรปโตมัยซิน 1 ชั่วโมง แต่มีค่า VFA No. เท่ากับ 0.0861 ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานของน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมสารสกัดหยาบกับโซเดียมซัลไฟด์ลงในน้ำยางพบว่า การเติมสารสกัดหยาบในวิธีการเตรียมแบบที่ 1 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า โซเดียมซัลไฟด์ 6 ชั่วโมง 10 นาที แต่เมื่อเติมสารสกัดหยาบที่เตรียมแบบที่ 2 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า โซเดียมซัลไฟด์เพียง 30

3. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 กับ แอมโมเนียและ Na₂SO₃

ผลการคิดต้นทุนการผลิตสารสกัด หยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ปริมาณ 1 กรัม ดังตาราง 8 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณการใช้และต้นทุนการผลิตกับสารอื่นๆ ได้ผลดังตาราง 9

ตาราง 8 ต้นทุนการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ปริมาณ 1 กรัม

ลำดับ	รายการ	ราคา(บาท)/หน่วย	ปริมาณที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
1	Yeast extract	990/500กรัม	4กรัม	7.92
2	Malt extract	1750/500กรัม	10 กรัม	35
3	glucose	96/1000กรัม	4 กรัม	0.384
4	Ethyl acetate	1000/ลิตร	50 มล	50
5	ประมาณค่าไฟ			
	-เครื่องเขย่า 7 วัน	-	-	50
	- evaporator รอบละ 30	-	-	50
	นาที (10 รอบ)			
รวม				193.304

ตาราง 9 ต้นทุนการผลิตของสารรักษาสภาพนํ้ายาง 400 มิลลิลิตร

ลำดับ	รายการ	ราคา(บาท)/หน่วย	ปริมาณที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
1	สารสกัดจาก 8-2-1	193.304/กรัม	4กรัม	773.216
2	Streptomycin	3100/250กรัม	0.8กรัม	9.92
3	โซเดียมซัลไฟด์	200/500กรัม	0.32 กรัม	0.128
4	สารละลายแอมโมเนีย	75/450 มล.	1 มล	0.166

จากตาราง 9 พบว่าการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ปริมาณ 1 กรัม ใช้ต้นทุน 193.304 บาท นั่นคือ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารอื่นๆ พบว่ามีต้นทุนสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟด์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

วิจารณ์ผลการวิจัย

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเสียของนํ้ายาง (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี dual culture bioassay แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุด 11 ตัวแรกมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรียชั้นทุติยภูมิ โดยวิธี agar well diffusion ซึ่งพบว่าไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* ได้ดีที่สุด คือ 8-2-1 รองลงมา คือ B6 และ 9AAI โดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 49, 37 และ 12 mm. ตามลำดับ ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus* ได้ดีที่สุด คือ 8-2-1 รองลงมาคือ B6 และ 9AAI โดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 47, 34 และ 15 mm. ตามลำดับ โดยทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Serratia* ได้ดีเท่ากันโดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 9 มิลลิเมตร จากนั้นนำเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท (8-2-1, B6 และ 9AAI) มาเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth เพื่อทำการสกัดสารด้านการเจริญของแบคทีเรีย แล้วสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งมาเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (*Staphylococcus* sp.) ได้ เทียบกับ streptomycin พบว่าสารสกัดที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 ให้ค่า MBC ต่ำสุดคือเท่ากับ 100 µg/ml ในขณะที่ Streptomycin ให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml

ดังนั้นจึงเลือกเอาสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 มาทำการทดสอบหาค่า MBC กับแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้รักษาสภาพนํ้ายางโดยเปรียบเทียบกับ Streptomycin พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้ง *Staphylococcus* และ *Bacillus* ได้ โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MIC กับแบคทีเรียแกรมลบ มากกว่า 1000 µg/ml ส่วน Streptomycin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml แบคทีเรียแกรมลบให้ค่า MBC เท่ากับ 250 µg/m จากผลการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างสารสกัดหยาบจากไอโซเลท 8-2-1 และสเตรปโต

มัยซิน พบว่าสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพดีกว่าสเตรปโตมัยซินโดยให้ค่า MBC ต่ำกว่า ซึ่งถ้าได้มีการทำให้สารบริสุทธิ์มากขึ้นจะยิ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูงขึ้นอีก

ดังนั้นจึงนำเอาสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสดเปรียบเทียบกับ Streptomycin และสารที่ใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสูงกว่าค่า MBC 10 เท่า นั่นคือ สารสกัดหยาบใช้ความเข้มข้น 1 มก./มล. Streptomycin ใช้ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาสภาพน้ำยางสดของสารชนิดต่าง ๆ พบว่าแอมโมเนียสามารถรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด การทดลองครั้งที่ 1 ค่า VFA No. เริ่มต้นของน้ำยางค่อนข้างสูงคือ เท่ากับ 0.0365 ซึ่งอาจเนื่องมาจากหลังจากกรีดน้ำยางถูกทิ้งไว้นาน 5 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการทดลอง ทำให้ในชั่วโมงที่ 3 ของการทดลอง น้ำยางที่เติมแอมโมเนียมีค่า VFA No. สูงกว่าค่ามาตรฐานน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น (>0.07) แต่น้ำยางยังคงไม่เกิดการเสียสภาพ ในการทดลองครั้งที่ 2 ค่า VFA No. เริ่มต้นต่ำกว่าการทดลองครั้งแรกคือมีค่าเท่ากับ 0.0186 ซึ่งอาจเนื่องมาจากหลังจากกรีดน้ำยางถูกทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการทดลอง หลังการเติมแอมโมเนีย 6 ชั่วโมง น้ำยางยังคงมีค่า VFA No. เพิ่มขึ้นเพียง 0.0062 ซึ่งค่า VFA No. ที่ชั่วโมงที่ 6 ยังอยู่ในค่ามาตรฐานของน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น แอมโมเนียเป็นสารที่นิยมใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางเพราะสามารถรักษาสภาพน้ำยางสดนาน เนื่องจากแอมโมเนียทำให้น้ำยางมีสภาพเป็นด่าง ซึ่งส่งเสริมสถานะแขวนลอยให้น้ำยาง แอมโมเนียสามารถทำลายแบคทีเรียได้โดยต้องเติม 0.35% ในน้ำยางโดยน้ำหนัก การรักษาสภาพน้ำยางขึ้นอยู่กับเวลาที่เติมแอมโมเนียลงไปเร็วหรือช้ามากน้อยเพียงใดหลังจากที่น้ำยางถูกกรีดและไหลจากต้นยาง (วรารณ, 2549)

ผลจากการเตรียมสารสกัดหยาบในรูปแบบที่ต่างกัน คือ แบบที่ 1 ใช้ในการทดลองครั้งที่ 1 เตรียมโดยใช้สารสกัดหยาบ 4 กรัมละลายในเมทานอล 2.5 มล. จากนั้นละลายในน้ำกลั่น 22.5 มล. แล้วเติมลงในน้ำยาง 375 มล. วิธีการเตรียมแบบที่ 2 ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 เตรียมโดยใช้ สารสกัด 4 กรัมละลายในเมทานอล 2.5 มล.แล้วผสมลงในน้ำยาง 397.5 มล. พบว่าการเติมน้ำลงในสารสกัดในการเตรียมแบบที่ 1 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า สเตรปโตมัยซิน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมแบบที่ 2 ซึ่งจากตารางจะพบว่าการเตรียมสารสกัดหยาบวิธีที่ 1 น้ำยางชุดที่เติมสารสกัดหยาบจะเกิดการเสียเร็วกว่าสเตรปโตมัยซิน 20 นาที แต่เมื่อปรับวิธีการเป็นวิธีที่ 2 โดยการไม่เติมน้ำทำให้น้ำยางที่เติมสารสกัดหยาบเสียช้ากว่าน้ำยางที่เติมสเตรปโตมัยซิน 1 ชั่วโมง แต่มีค่า VFA No. เท่ากับ 0.0861 ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานของน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมสารสกัดหยาบกับโซเดียมซัลไฟต์ลงในน้ำยางพบว่า การเติมสารสกัดหยาบในวิธีการเตรียมแบบที่ 1 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า โซเดียมซัลไฟต์ 6 ชั่วโมง 10 นาที แต่เมื่อเติมสารสกัดหยาบที่เตรียมแบบที่ 2 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า โซเดียมซัลไฟต์เพียง 30 นาที ดังนั้นการเติมน้ำลงในสารสกัดหยาบที่มีเมทานอลเป็นตัวทำละลายมีผลต่อการรักษาสภาพยางนั่นคือ การเติมน้ำลงไปจะทำให้เกิดการเสียสภาพเร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการละลายสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลมีผลทำให้น้ำยางจับตัวกันซึ่งอาจมีผลต่อการเสียของน้ำยางและค่า VFA No. ได้

จากผลการทดลองที่พบว่าสารสกัดจาก 8-2-1 สามารถรักษาสภาพน้ำยางได้ดีกว่าสเตรปโตมัยซินเพียง ทั้งที่สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีแต่ในแกรมลบไม่สามารถ

ยับยั้งการเจริญได้ ส่วนสเตรปโตมัยซินซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อ *Streptomyces griseus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Singh และ Mitchison, 1954) ทั้งนี้การเสียที่เกิดขึ้นนอกจากมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแล้ว อาจจะมีปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่นการสูญเสียน้ำ (Dehydration) ของโปรตีนที่หุ้มอนุภาคยางซึ่งอาจเกิดจากการเติมแอลกอฮอล์หรือสารบางอย่างลงในน้ำยาง ทำให้อนุภาคยางมารวมตัวกันเป็นก้อนยาง (coagulum) และเกิดการเสียสภาพขึ้น (วราภรณ์, 2549) ดังนั้นการเตรียมสารสำหรับใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางจึงมีความสำคัญ จะเห็นได้ว่าการใช้สารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ในความเข้มข้นที่เท่ากันแต่มีการเตรียมที่แตกต่างกัน จะให้ผลไม่เท่ากัน ดังนั้นถ้าได้มีการวิจัยต่อไปถึงความเหมาะสมในการเตรียมสารเพื่อเติมลงไปในน้ำยาง และทดลองหาตัวทำละลายอื่นนอกเหนือจากเมทานอลอาจทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพน้ำยางสูงขึ้น

ผลการคิดต้นทุนการผลิตสารสกัด หยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ปริมาณ 1 กรัม ใช้ต้นทุนการผลิตเท่ากับ 193.304 บาท และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารอื่นๆ โดยคำนึงถึงปริมาณที่ใช้ร่วมด้วย พบว่าสารสกัดหยาบมีต้นทุนสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟต์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

แอมโมเนียเป็นสารที่รักษาสภาพน้ำยางได้นานที่สุด มีราคาถูก แต่มีก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ มีผลต่อสุขภาพของบุคคลที่ทำงานเกี่ยวข้องกับน้ำยาง ตั้งแต่ชาวสวนจนถึงผู้นำน้ำยางพารามาทำเป็นผลิตภัณฑ์ รวมถึงผู้ที่อาศัยอยู่ใกล้เขตโรงงานที่มีการใช้น้ำยางพารา และทำให้เกิดการกัดกร่อนของโลหะ ซึ่งอาจจะเป็นส่วนประกอบของโรงงาน ดังนั้นถ้ามีการวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรการใช้สารสกัดจาก 8-2-1 ร่วมกับแอมโมเนีย หรือสารรักษาสภาพน้ำยางอื่นๆ อาจจะช่วยให้อาจสามารถลดปริมาณการใช้แอมโมเนียลงได้ซึ่งส่วนนี้นอกจากจะดีต่อสุขภาพของผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องแล้ว ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมวัสดุและสิ่งก่อสร้างที่สัมผัสน้ำยางอีกด้วย

สรุปผลการวิจัย

1. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเสียของน้ำยาง (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด
2. เมื่อนำใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางโดยเปรียบเทียบกับสารรักษาสภาพอื่นๆ พบว่าแอมโมเนียรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด รองลงมาคือ โซเดียมซัลไฟด์ สารสกัดหยาบ และ สเตรปโตมัยซินโดยพบว่ารูปแบบการเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทมีผลต่อการรักษาสภาพน้ำยาง เมื่อเปรียบเทียบกับ สเตรปโตมัยซิน พบว่าการเตรียมสารสกัดหยาบแบบที่ 1 (สารสกัด+เมทานอล+น้ำ) น้ำยางจะเกิดการเสียเร็วกว่าสเตรปโตมัยซิน แต่เมื่อปรับวิธีเตรียมสารสกัดเป็นแบบที่ 2 (สารสกัด+เมทานอล) ทำให้น้ำยางที่เติมสารสกัดหยาบเสียช้ากว่าน้ำยางที่เติมสเตรปโตมัยซิน และเกิดการเสียสภาพเร็วกว่าโซเดียมซัลไฟด์เพียง 30 นาที
3. ผลการคิดต้นทุนการผลิต พบว่าสารสกัดหยาบมีต้นทุนการผลิตสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟด์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการวิจัยเพิ่มเติมต่อไปในเรื่องของการศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อเติมลงในน้ำยางเพื่อให้สารสกัดกระจายตัวในน้ำยางได้ดีขึ้น และ มีความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม ซึ่งคาดว่าจะช่วยรักษาสภาพน้ำยางได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2548. คู่มือแนวปฏิบัติที่ดีด้านการป้องกันและลดมลพิษอุตสาหกรรมน้ำยางชั้น
จุติพร บุญสถิตย์, ลัดดาวัลย์ บุญคุ้ม, กัญจน์ นวมะวัฒน์ และจิตต์ลัดดา ตักดาภิพาณิชย์. 2551.
การศึกษาชนิดของแบคทีเรียในน้ำยางธรรมชาติและสารถนอมน้ำยางธรรมชาติชนิดใหม่ 34th
Congress on Science and Technology of Thailand
- วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2549.ยางธรรมชาติ: การผลิตและการใช้งาน.กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุน
การวิจัย. 176 หน้า.
- Bennett J. V., Brodie J. L., Benner E. J. and Kirby W. M. M. 1966. Simplified,
accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol* **14**(2): 170-177.
- Castillo, U., J.K. Harper, G.A. Strobel, J. Sears, K. Alesi, E. Ford, J. Lin, M. Hunter, M. Maranta,
H. Ge, D. Yaver, J.B. Jensen, H. Porter, R. Robison, D. Millar, W.M. Hess, M. Condrón
and D. Teplow. 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL
30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol.Lett.* **224**: 183-190.
- Cherrappathanathu Kuruvilla, J.; Lau, C. M.; Ng, C. S.; P. Subburao, R. R.; Murugesu, N.
Preservation of natural rubber latex, GB patent no. 1,517,025 (1978)
Ong, C. O. Preservation and enhanced stabilization of latex, GB patent no. 2,283,747
(1995), US patent no. 5,840,790 (1998)
- El-Naggar MY, El-Assar SA, Abdul-Gawad SM (2006). Meroparamycin Production by Newly
Isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and
Structural Elucidation. *J. Microbiol.* **44**: 432-438.
- Omura, S. and A. Crump. 2004. The life and times of ivermectin - a success story. *Nat. Rev.*
Microbiol. **2**: 984-989.
- Shih, H., Y. Liu, F. Hsu, V. Mulabagal, R. Dodda and J. Huang. 2003. Fungichromin: a substance
from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. *J. Agricult. Food*
Chem. **51**: 95-99.
- Singh, B., and Mitchison, D.A. 1954. Bactericidal Activity of Streptomycin and Isoniazid Against
Tubercle Bacilli. *Br Med J.* **16**; 1(4854): 130-132.
- Spence D. and Van Niel C.B., *Industrial & Engineering Chemistry*, 1936, 28(7).
- Takizawa, M., Colwell, R. R. and Hill, R. T. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes
in the Chesapeake bay. *Appl Environ Microbiol* **59**(4): 997-1002.

ภาคผนวก

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย
กลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง

Screening of actinomycetes which has ability to inhibit growth of
bacterial causing putrefaction of fresh latex

ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ. พิษณุโลก

Dr. Nareeluk Nakaew

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical science,
Naresuan University, Phitsanulok

บทคัดย่อ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเสียของน้ำยาง (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Dual culture bioassay และ Agar well diffusion method โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก พบว่า สารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MBC) พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml ในแบคทีเรียแกรมลบพบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองคือ 1000 µg/ml ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ ส่วนสเตรปโตมัยซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml แบคทีเรียแกรมลบให้ค่า MBC เท่ากับ 250 µg/ml เมื่อนำใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางโดยเปรียบเทียบกับสารรักษาสภาพอื่นๆ พบว่าแอมโมเนียรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด รองลงมาคือ โซเดียมซัลไฟด์ สารสกัดหยาบ และ สเตรปโตมัยซิน โดยพบว่ารูปแบบการเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทมีผลต่อการรักษาสภาพน้ำยาง เมื่อเปรียบเทียบกับ สเตรปโตมัยซิน พบว่า การเตรียมสารสกัดหยาบรูปแบบที่ 1 (สารสกัด+เมทานอล+น้ำ) น้ำยางจะเกิดการเสียเร็วกว่าสเตรปโตมัยซิน แต่เมื่อปรับวิธีการเตรียมเป็นรูปแบบที่ 2 (สารสกัด+เมทานอล) ทำให้เกิดการเสียช้ากว่าน้ำยางที่เติมสเตรปโตมัยซิน 60 นาที และเกิดการเสียสภาพเร็วกว่าโซเดียมซัลไฟด์เพียง 30 นาที ส่วนในเรื่องของต้นทุนการผลิตพบว่า สารสกัดหยาบมีต้นทุนการผลิตสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟด์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

Abstract

The antibacterial activities of actinomycetes were tested by dual culture bioassay and agar well diffusion method. Results showed actinobacteria isolate 8-2-1 revealed the most distinctive antimicrobial activity against a number of common bacteria (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia* and *Escherichia*) causing putrefaction of fresh latex. The most susceptible test organisms were Gram positive bacteria. A crude extract derived from this isolate was used to determine the minimum bactericidal concentration (MBC). Results showed that the crude extract had an MBC value of 100 µg/ml against gram positive bacteria and the maximum concentration used in this research (1000 µg/ml) could not inhibit gram negative bacteria. The streptomycin had MBC value of 200 µg/ml and 250 µg/ml against gram positive bacteria and gram negative bacteria respectively. With the aim to evaluate the potential of crude extract for preservation of latex's quality compared to those other chemical preservatives, it was found that ammonia showed as the best preservative followed by sodium sulfite, crude extract and streptomycin. Furthermore, we found that difference of crude extract preparations influenced the preservative capacity compared to streptomycin. Whereas, the formula 1 (crude extract + methanol + water) caused deterioration of latex faster than streptomycin but the formula 2 (crude extract + methanol) caused a delay of deterioration, resulting in 60 min of extended preservative time compared to the use of streptomycin, which somehow caused faster deterioration than the use of sodium sulfite just 30 min. Concerning the investment cost, we found that the crude extract remained 77.9, 6,040 and 4,657 times higher cost than streptomycin, sodium sulfite and ammonia, respectively.

คำนำ

น้ำยางสดจะคงสภาพอยู่ได้ไม่เกิน 6 ชั่วโมง เนื่องจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำยางจะย่อยสลายสารอาหารที่อยู่ในน้ำยาง ซึ่งจะทำให้เกิดกรดที่ระเหยง่าย ทำให้ pH ของน้ำยางลดลง ทำให้อนุภาคของยางเกิดการรวมตัวกันเองตามธรรมชาติ ดังนั้นเพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพของน้ำยางก่อนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ จึงมีการใส่สารเคมีที่เรียกว่าสารป้องกันการจับตัว (Anticoagulant) ลงไปเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเสียหายของน้ำยาง ซึ่งปัจจุบันแอมโมเนียได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางสดเพื่อการผลิตน้ำยางข้นและยางแท่ง แต่แอมโมเนียเป็นสารที่ระเหยง่ายและมีกลิ่นรุนแรงมากเมื่อระเหยสู่อากาศจะทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการกัดกร่อนของโลหะและยังส่งผลให้ยากต่อการควบคุมคุณสมบัติของน้ำยางธรรมชาติในระหว่างการเก็บรักษาให้คงที่อีกด้วย นอกจากนี้แอมโมเนียแล้วยังนิยมใช้โซเดียมซัลไฟด์ในการรักษาสภาพน้ำยางสดเพื่อการเตรียมยางแผ่น ซึ่งโซเดียมซัลไฟด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียต่ำ จึงใช้เพื่อป้องกันการเสียของน้ำยางในระยะสั้น และก่อให้เกิดไอระเหยเป็นก๊าซซัลเฟอร์ซึ่งเป็นอันตราย ระหว่างการจับตัวยางด้วยกรด

จากปัญหาดังกล่าว จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการวิจัยและพัฒนาหา สารสกัดจากเชื้อแอคติโนไมซีตซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบว่ามียารักษาการผลัดสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดและดีที่สุด เพื่อช่วยในการรักษาสุขภาพของนํ้ายาง เพื่อนำมาใช้ทดแทนแอมโมเนียและโซเดียมซัลไฟด์ การวิจัยหาสารรักษาสุขภาพชนิดใหม่จะช่วยลดมลพิษทางอากาศ เพิ่มคุณภาพชีวิตของบุคคลที่ทำงานเกี่ยวข้องกับนํ้ายาง ตั้งแต่ชาวสวนจนถึงผู้นำนํ้ายางพารามาทำเป็นผลิตภัณฑ์ รวมถึงผู้ที่อาศัยอยู่ใกล้เขตโรงงานที่มีการใช้นํ้ายางพารา และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมวัสดุและสิ่งก่อสร้างที่สัมผัสนํ้ายาง

วิธีการวิจัย

1. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเชื้อแอคติโนไมซีตที่มีในห้องปฏิบัติการ โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*, *Staphylococcus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ในชั้นปฐมภูมิ ด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett et al., 1996) ทำได้โดยการเพาะเชื้อแอคติโนไมซีตไว้ด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะแบคทีเรียโดยใช้หวงถ่ายเชื้อขีดเป็นแนวตั้งฉากกับเชื้อแอคติโนไมซีต จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตดูโซนการยับยั้ง (Inhibition Zone) ที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำในเชื้อแต่ละไอโซเลท

จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโซนการยับยั้งกว้าง 40 มิลลิเมตรขึ้นไป ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในชั้นทุติยภูมิ ด้วยวิธี Agar well diffusion method โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีตในอาหาร ISP2 broth บนเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้มาหยอดลงในหลุมในอาหาร Mueller Hinton agar ที่มีการเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียทดสอบบนผิวหน้าอาหาร จากนั้น บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตดู clear zone ที่เกิดขึ้น (ทำการทดลอง 3 ซ้ำในเชื้อแต่ละไอโซเลท) คัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone กว้างสุด 3 อันดับแรก ไปประเมินศักยภาพ เทียบกับสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ได้จากเชื้อแอคติโนไมซีตที่มีขายในทางการค้า (streptomycin)

2. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนไมซีตกับ streptomycin

2.1 การเตรียมสารสกัดจากเชื้อแอคติโนไมซีต

2.1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีตที่คัดเลือกได้ในอาหาร ISP2 broth บนเครื่องเขย่า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

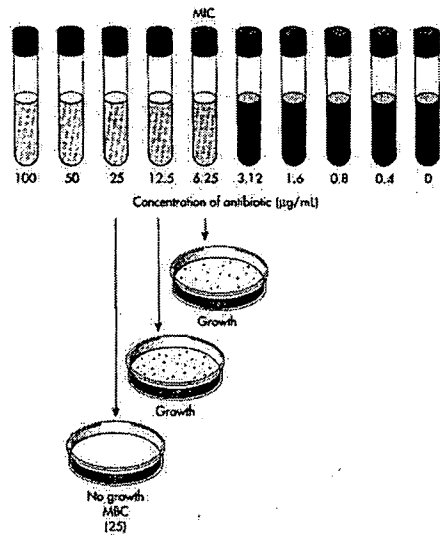
2.1.2 เติมตัวทำละลาย (ethyl acetate) ลงไปในอาหาร ข้อ 2.1.1 ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เขย่า ทุก 15 นาที

2.1.3 แยกส่วนของ ethyl acetate ออกมา ทำการระเหย ethyl acetate ออกด้วยเครื่อง evaporator เก็บส่วนที่เหลือ (สารสกัด หรือ crude extract) ไว้ทดสอบในขั้นต่อไป

2.2 ทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) เทียบกับสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีขายในทางการค้า (streptomycin) โดยเจือจางสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิท และ streptomycin ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้น) เปรียบเทียบค่า MIC ที่ได้ และนำปริมาณสารที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบต้นทุน

วิธีการหาค่า MIC ด้วยวิธี broth tube dilution method ทำได้ดังนี้

- 2.3.1 เจือจางสารสกัด streptomycin ด้วยอาหารเหลว TSB ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นลำดับ
- 2.3.2 เติมเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวลงในทุก ๆ หลอดของข้อ 2.2.1 หลอดละ 50 ไมโครลิตร
- 2.3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำมาอ่านผลหาค่า MIC (หลอดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตจากความขุ่นที่เกิดขึ้น) ดังภาพ 1



ภาพ 1 ขั้นตอนการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC)

แต่เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณน้อย ดังนั้นในขั้นตอนของการทำเจือจางจึงต้องใช้ปริมาณของอาหารที่นำมาเจือจางน้อยลง โดยปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 1 มล. จึงสังเกตความขุ่นได้ยาก ดังนั้นจึงนำสารละลายในแต่ละความเข้มข้นมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร ISP2 agar เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) โดยดูจากความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด นั่นคือ ไม่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร ISP2 agar เนื่องจากการสกัดสารเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบของแต่ละไอโซเลทเพื่อให้ได้ปริมาณมากพอที่จะใช้ทดสอบต้องใช้เวลานาน

ดังนั้นการทดลองจะนำสารสกัดหยาบของไอโซเลทที่ให้ขนาดของเคลียร์โซนสูงสุด 3 อันดับแรกมาหาค่า MBC กับ *Staphylococcus* ก่อน จากนั้นคัดเลือกเอาไอโซเลทที่ให้ค่า MBC ต่ำสุดมาทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบแกรมบวกและแกรมลบอื่นๆ เพื่อเปรียบเทียบกับ Streptomycin ต่อไป

2.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสด

2.3.1 ตรวจสอบปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณเนื้อยางแห้งของน้ำยางที่นำมาใช้ในการวิจัย

2.3.2 เตรียมสารสกัดหยาบของเชื้อ 8-2-1 โดยละลายสารสกัด 800 มิลลิกรัม ด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร (ดังนั้นมีความเข้มข้นเท่ากับ 160 มก./มล.)

2.3.3 เติมสารรักษาสภาพน้ำยางชนิดต่างๆลงไปดังตาราง 1

ตาราง 1 ปริมาณสารรักษาสภาพที่เติมลงในน้ำยาง

ลำดับ	สารรักษาสภาพ	ความเข้มข้น	ปริมาณที่ใช้	ปริมาณน้ำยาง (มล.)
1	สารสกัดหยาบจาก 8-2-1	16 มก./มล	25 มล.	375
2	สารสกัดหยาบจาก 8-2-1	160 มก./มล.	2.5 มล.	397.5
3	Streptomycin	32 มก./มล	25 มล.	375
4	สารละลายแอมโมเนีย	25%	1	399
5	โซเดียมซัลไฟด์	3 %	11 มล.	389
6	ชุดควบคุม	-	-	400
(ไม่เติมสารรักษาสภาพ)				

หมายเหตุ : ลำดับที่ 1 ใช้สารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.3 ปริมาณ 2.5 มล. แล้วเติมน้ำกลั่น 22.5 มล.
ลำดับที่ 2 ใช้สารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.3

2.3.4 สังเกตการเสียของน้ำยางโดยการจับตัวกันของเนื้อยาง, ทดสอบการกระจายตัวของน้ำยางสดในน้ำ และการหาค่า VFA No. ที่เวลา 0 3 6 9 และ 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งมีวิธีการเตรียมสารสกัดหยาบ 8-2-1 ต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบวิธีการเตรียม หรือ ปริมาณของสารที่ใช้ในการละลายสารสกัดหยาบว่ามีผลต่อการจับตัวของน้ำยางหรือไม่ โดยการทดสอบครั้งที่ 1 ใช้การเตรียมสารลำดับที่ 1 การทดสอบครั้งที่ 2 ใช้การเตรียมสารตามลำดับ 2 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง)

3. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 กับ แอมโมเนียและ Na_2SO_3

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 และ metaxyl โดยการผลิตสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ทำโดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ในอาหาร ISP2 ปริมาณ 1000 มล. (สูตร ISP2: yeast extract 4 กรัม, malt extract 10 กรัม, glucose 4 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate 2000 ml (ethyl acetate สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก จะมีการสูญเสียเนื่องจากการระเหยระหว่างการสกัดไม่เกิน 50 มิลลิลิตร) ทำการระเหยตัวทำละลายออกจากเครื่อง evaporator นำตัวทำละลายกลับไปทำการสกัดสารใหม่อีก 9 รอบ

ผลการวิจัย

1. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเสียของน้ำยาง (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ชั้นปฐมภูมิ โดยวิธี dual culture bioassay ของเชื้อแอคติโนมัยสิทท์ที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวนทั้งหมด 102 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 28 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ และมี 11 ไอโซเลทที่ให้ขนาดของโซนการยับยั้งใน *Staphylococcus* และ *Bacillus* มากกว่า 40 มิลลิเมตร ดังตาราง 2 ดังภาพ 2

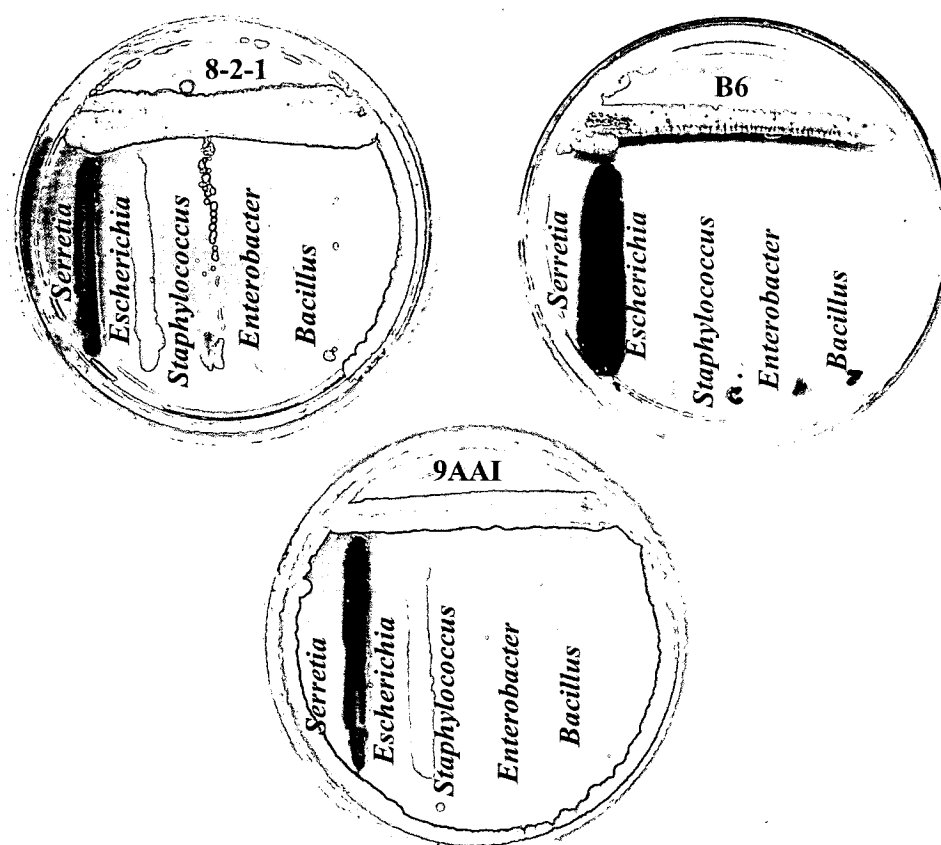
นำเชื้อแอคติโนมัยสิทท์ทั้ง 11 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชั้นทุติยภูมิเพื่อหาสายพันธุ์ที่สร้างสารต้านเชื้อราได้ดีที่สุดในอาหารเหลว โดยวิธี agar well diffusion พบว่าไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* ได้ดีที่สุด คือ 8-2-1 รองลงมา คือ B6 และ 9AAI โดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 49, 37 และ 12 mm. ตามลำดับ ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus* ได้ดีที่สุด คือ 8-2-1 รองลงมาคือ B6 และ 9AAI โดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 47, 34 และ 15 mm. ตามลำดับ โดยทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Serratia* ได้ดีเท่ากันโดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 9 มิลลิเมตร ดังตาราง 3 ภาพ 3

ตาราง 2 เชื้อแอคติโนมัยสิทท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยให้ขนาดของโซนการยับยั้งมากกว่า 40 มิลลิเมตร

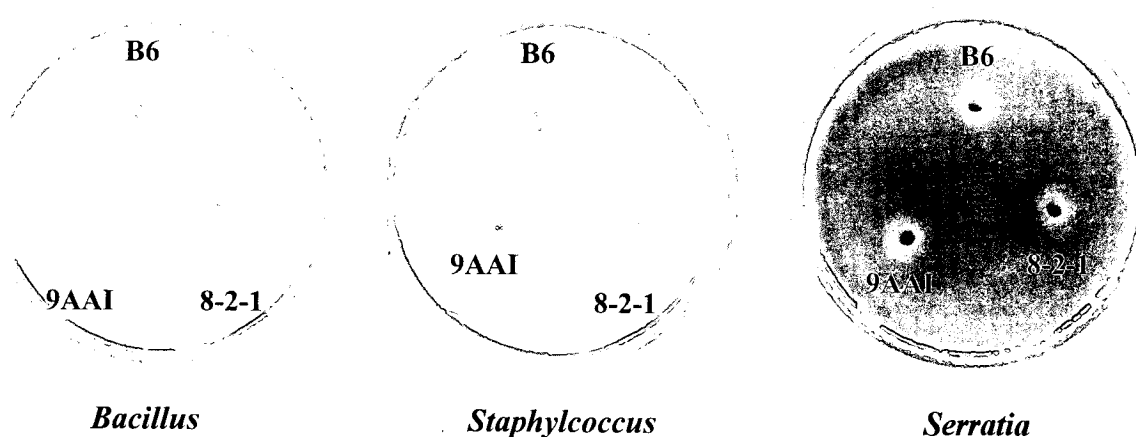
เชื้อแอคติโนมัยสิทท์	ขนาดของโซนการยับยั้ง (มม.)				
	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Bacillus</i>
228	0	0	45	0	47
Ex5.4	0	0	43	0	48
8-2-1	0	0	56	0	58
4-1	0	0	44	0	45
7AB	0	0	47	0	46
F2	0	0	48	0	47
2-1	0	0	43	0	45
A11	0	0	44	0	43
B6	0	0	51	0	49
9AAI	0	0	58	0	56
A18	0	0	40	0	41

ตาราง 3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบของเชื้อ
แอคติโนไมซีตโดยวิธี agar well diffusion

เชื้อแอคติโนไมซีต	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มม.)				
	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Bacillus</i>
228	0	0	7	0	6
Ex5.4	0	0	8	0	7
8-2-1	9	0	47	0	49
4-1	0	0	8	0	7
7AB	0	0	9	0	9
F2	0	0	7	0	8
2-1	0	0	7	0	8
A11	0	0	8	0	7
B6	9	0	34	0	37
9AAI	9	0	15	0	12
A18	0	0	8	0	7



ภาพ 2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการขั้นปฐมภูมิ โดยวิธี Dual culture bioassay ของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1, B6 และ 9AAI



ภาพ 3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในห้องปฏิบัติการขั้นทุติยภูมิ โดยวิธี agar well diffusion ของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1, B6 และ 9AAI

2. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกับ

streptomycin

นำเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท (8-2-1, B6 และ 9AAI) มาเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth ทำการสกัดสารต้านการเจริญของแบคทีเรียด้วย ตัวทำละลาย (ethyl acetate) ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำชั้นของ ethyl acetate ไปทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator นำส่วนของสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (*Staphylococcus* sp.) เทียบกับ streptomycin พบว่าสารสกัดที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 ให้ค่า MBC ต่ำสุดคือเท่ากับ 100 µg/ml ในขณะที่ Streptomycin ให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml ดังตาราง 4 ภาพ 4 และ 5

ดังนั้นจึงเลือกเอาสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 มาทำการทดสอบหาค่า MBC กับแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) เปรียบเทียบกับ Streptomycin พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้ง *Staphylococcus* และ *Bacillus* ได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MBC กับแบคทีเรียแกรมลบ มากกว่า 1000 µg/ml ดังตาราง 5 สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน Streptomycin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml แบคทีเรียแกรมลบให้ค่า MBC เท่ากับ 250 µg/ml ดังตาราง 6

ตาราง 5 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1

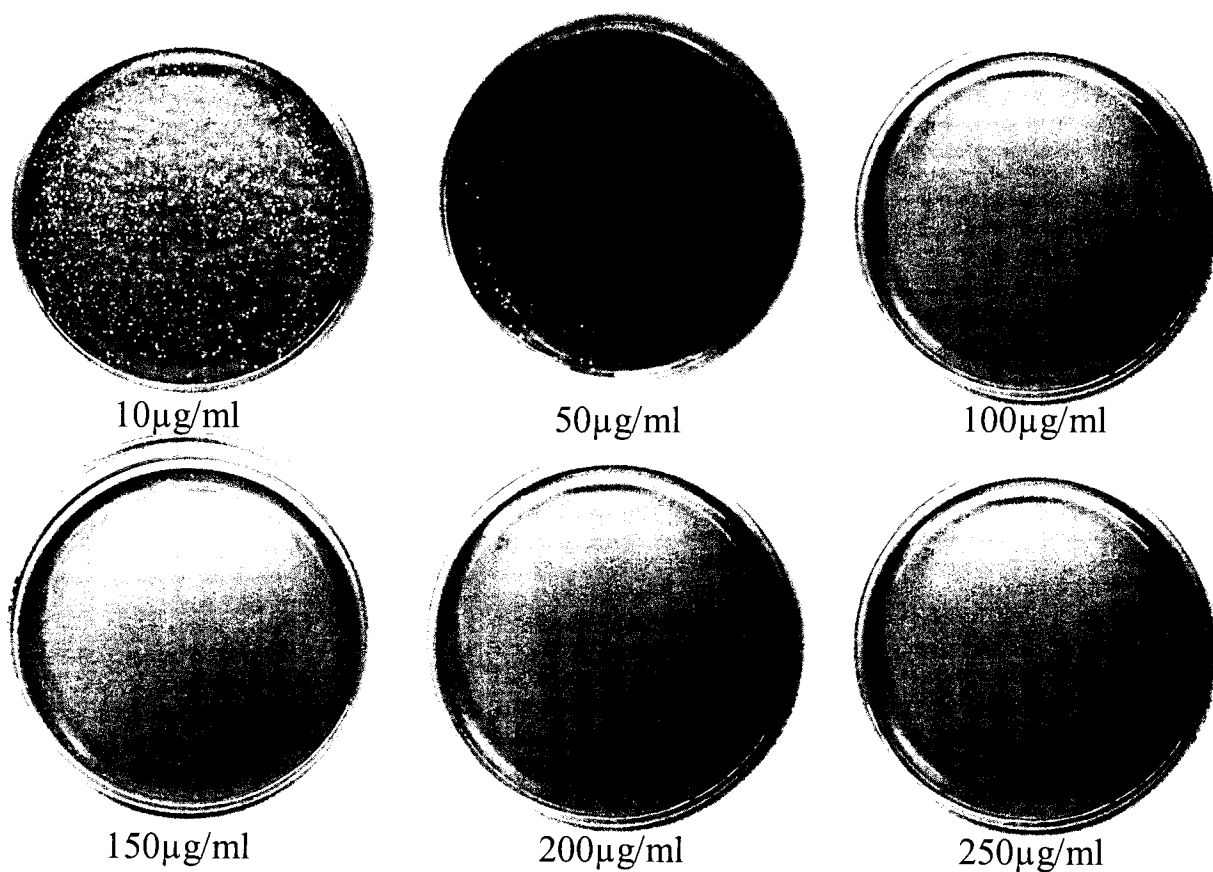
แบคทีเรีย	ความเข้มข้นสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิท (µg/ml)												
	20	25	30	50	100	150	200	250	300	400	600	800	1000
<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ มีการเจริญของแบคทีเรีย, - ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย

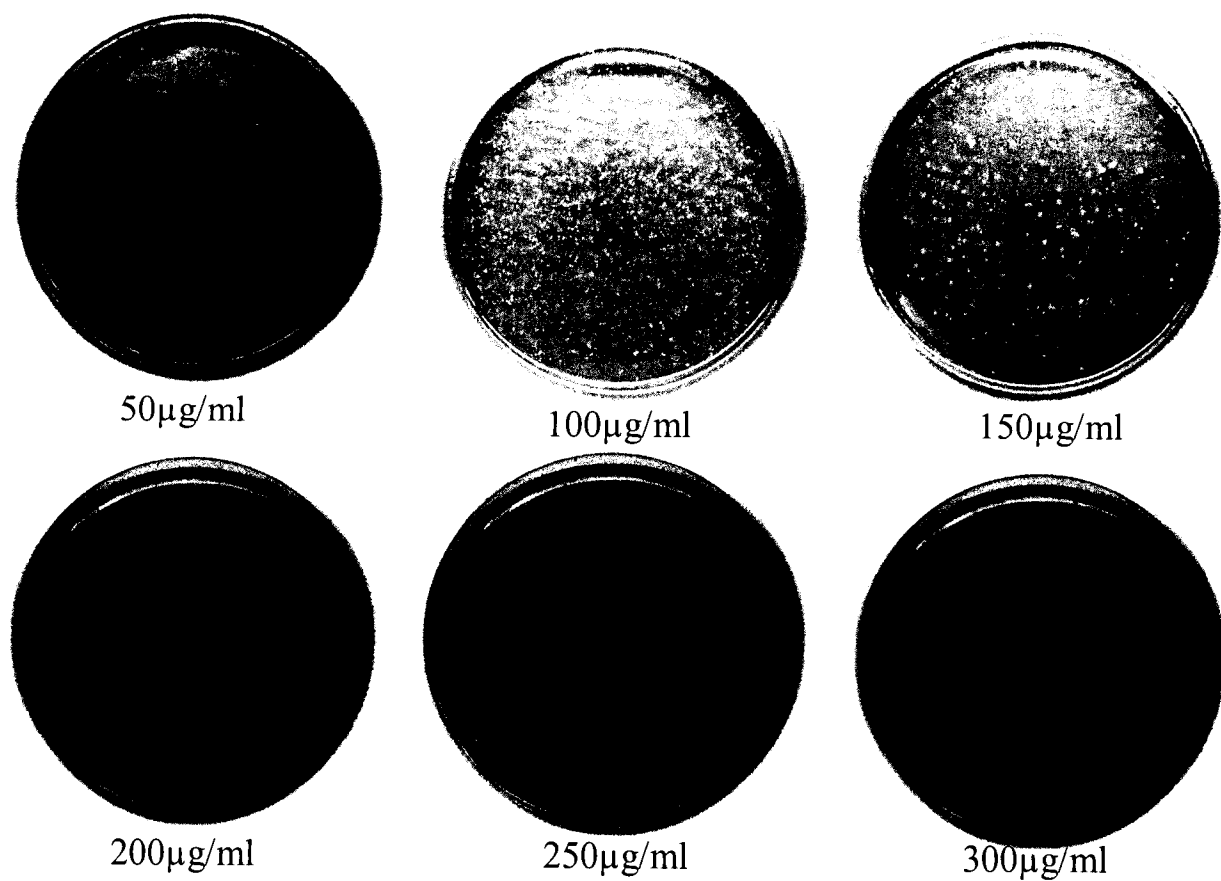
ตาราง 6 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสาร streptomycin

แบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสาร streptomycin (µg/ml)												
	1	5	10	15	20	25	30	50	100	150	200	250	300
<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Serratia</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+ มีการเจริญของแบคทีเรีย, - ไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย



ภาพ 4 ผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus* ของสารสกัดจากเชื้อไอโซเลท 8-2-1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพ 5 ผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus* ของสาร Streptomycin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาสภาพน้ำยางสด

ผลจากการนำสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสดเปรียบเทียบกับ Streptomycin และสารที่ใช้ในการรักษาสภาพน้ำยาง โดยสังเกตการเสียของน้ำยางโดยดูการจับตัวกันของเนื้อยาง, การหาค่า VFA No. ที่เวลา 0 3 6 9 และ 24 ชั่วโมง โดยการใช้ น้ำยางที่มีคุณสมบัติต่างกันในการทดลอง พบว่าค่า VFA No. ของน้ำยางในแต่ละชุดการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงดังตาราง 7

ตาราง 7 การเปลี่ยนแปลงค่า VFA No. ของน้ำยางในแต่ละชุดการทดลอง

		VFA No. ของสารรักษาสภาพแต่ละชนิด				คุณสมบัติ น้ำยาง	
เวลา (ชม.)		เชื้อ 8-2-1	streptomycin	Na ₂ SO ₃	NH ₄ OH	ปริมาณของแข็งทั้งหมด	ปริมาณเนื้อยางแห้ง
ครั้งที่ 1	0	0.0439	0.0393	0.1805	0.0365	44.276	42.4425
	3	ND	ND	0.1851	0.0851		
	6	ND	ND	0.1898	0.2946		
	9	ND	ND	ND	ND		
	12	ND	ND	ND	ND		
เวลาที่น้ำยางเสียสภาพ		1 ชม. 50 นาที	2 ชม. 10 นาที	8 ชม.	> 8 ชม.		
ครั้งที่ 2	0	0.021	0.021	0.1049	0.0186	37.6738	35.1499
	3	0.021	0.0233	0.1530	0.0225		
	6	0.0861	ND	0.1585	0.0248		
	9	ND	ND	ND	ND		
	12	ND	ND	ND	ND		
เวลาที่น้ำยางเสียสภาพ		4 ชม. 30 นาที	3 ชม. 30 นาที	5 ชม.	> 8 ชม.		

หมายเหตุ: การเสียสภาพ = สังเกตว่าน้ำยางมีลักษณะเป็นเม็ดพริก และทำให้ไม่สามารถวัดค่า VFA No. ต่อไปได้
ND = ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ครั้งที่ 1 การเตรียมสารสกัดหยาบ: เตรียมสารสกัดหยาบเหมือนลำดับที่ 1 ในตาราง 1
น้ำยางที่ใช้ในการทดลอง: ถูกทิ้งนานประมาณ 5 ชั่วโมง หลังกรีต

ครั้งที่ 2 การเตรียมสารสกัดหยาบ: เตรียมสารสกัดหยาบที่เหมือนลำดับที่ 2 ในตาราง 1
น้ำยางที่ใช้ในการทดลอง: ถูกทิ้งนานประมาณ 3 ชั่วโมง หลังกรีต

จากตาราง 7 แอมโมเนียสามารถรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด การทดลองครั้งที่ 1 ค่า VFA No. เริ่มต้นของน้ำยางค่อนข้างสูงคือ เท่ากับ 0.0365 ทำให้ในชั่วโมงที่ 6 ของการทดลองค่า VFA No. ของน้ำยางสูงโดยพบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมงน้ำยางที่เติมแอมโมเนียยังมีค่า VFA No. สูงกว่าค่ามาตรฐานน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น (>0.07) แต่น้ำยางยังคงไม่เกิดการเสียสภาพ ในการทดลองครั้งที่ 2 ค่า VFA No. เริ่มต้นต่ำกว่าการทดลองครั้งแรกคือมีค่าเท่ากับ 0.0186 ดังนั้นหลังการเติมแอมโมเนีย 6 ชั่วโมง น้ำ

ยางมีค่า VFA No. เพิ่มขึ้นเพียง 0.0062 ซึ่งค่า VFA No. ที่ชั่วโมงที่ 6 ยังอยู่ในค่ามาตรฐานของน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น

ผลจากการเตรียมสารสกัดหยาบในรูปแบบที่ต่างกัน คือ แบบที่ 1 ใช้ในการทดลองครั้งที่ 1 เตรียมโดยใช้สารสกัดหยาบ 4 กรัมละลายในเมทานอล 2.5 มล. จากนั้นละลายในน้ำกลั่น 22.5 มล. แล้วเติมลงในน้ำยาง 375 มล. วิธีการเตรียมแบบที่ 2 ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 เตรียมโดยใช้ สารสกัด 4 กรัมละลายในเมทานอล 2.5 มล.แล้วผสมลงในน้ำยาง 397.5 มล. พบว่าการเติมน้ำลงไปในสารสกัดในการเตรียมแบบที่ 1 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า สเตรปโตมัยซิน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมแบบที่ 2 ซึ่งจากตารางจะพบว่าการเตรียมสารสกัดหยาบวิธีที่ 1 น้ำยางชุดที่เติมสารสกัดหยาบจะเกิดการเสียเร็วกว่าสเตรปโตมัยซิน 20 นาที แต่เมื่อปรับวิธีการเป็นวิธีที่ 2 โดยการไม่เติมน้ำทำให้น้ำยางที่เติมสารสกัดหยาบเสียช้ากว่าน้ำยางที่เติมสเตรปโตมัยซิน 1 ชั่วโมง แต่มีค่า VFA No. เท่ากับ 0.0861 ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานของน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมสารสกัดหยาบกับโซเดียมซัลไฟด์ลงในน้ำยางพบว่า การเติมสารสกัดหยาบในวิธีการเตรียมแบบที่ 1 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า โซเดียมซัลไฟด์ 6 ชั่วโมง 10 นาที แต่เมื่อเติมสารสกัดหยาบที่เตรียมแบบที่ 2 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า โซเดียมซัลไฟด์เพียง 30

3. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 กับ แอมโมเนียและ Na_2SO_3

ผลการคิดต้นทุนการผลิตสารสกัด หยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ปริมาณ 1 กรัม ดังตาราง 8 เมื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณการใช้และต้นทุนการผลิตกับสารอื่นๆ ได้ผลดังตาราง 9

ตาราง 8 ต้นทุนการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ปริมาณ 1 กรัม

ลำดับ	รายการ	ราคา(บาท)/หน่วย	ปริมาณที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
1	Yeast extract	990/500กรัม	4กรัม	7.92
2	Malt extract	1750/500กรัม	10 กรัม	35
3	glucose	96/1000กรัม	4 กรัม	0.384
4	Ethyl acetate	1000/ลิตร	50 มล	50
5	ประมาณค่าไฟ			
	-เครื่องเขย่า 7 วัน	-	-	50
	- evaporator รอบละ 30 นาที (10 รอบ)	-	-	50
รวม				193.304

ตาราง 9 ต้นทุนการผลิตของสารรักษาสภาพน้ำยาง 400 มิลลิลิตร

ลำดับ	รายการ	ราคา(บาท)/หน่วย	ปริมาณที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
1	สารสกัดจาก 8-2-1	193.304/กรัม	4กรัม	773.216
2	Streptomycin	3100/250กรัม	0.8กรัม	9.92
3	โซเดียมซัลไฟด์	200/500กรัม	0.32 กรัม	0.128
4	สารละลายแอมโมเนีย	75/450 มล.	1 มล	0.166

จากตาราง 9 พบว่าการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิโอสเตรปโตไมซิน 8-2-1 ปริมาณ 1 กรัม ใช้ต้นทุน 193.304 บาท นั่นคือ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารอื่นๆ พบว่ามีต้นทุนสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟด์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

วิจารณ์ผลการวิจัย

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเสียของน้ำยาง (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ของเชื้อแอคติโนมัยซิโอสเตรปโตไมซินที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี dual culture bioassay แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด 11 ตัวแรกมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรียชั้นทุติยภูมิ โดยวิธี agar well diffusion ซึ่งพบว่าไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* ได้ดีที่สุด คือ 8-2-1 รองลงมา คือ B6 และ 9AAI โดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 49, 37 และ 12 mm. ตามลำดับ ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus* ได้ดีที่สุด คือ 8-2-1 รองลงมาคือ B6 และ 9AAI โดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 47, 34 และ 15 mm. ตามลำดับ โดยทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Serratia* ได้ดีเท่ากันโดยให้ขนาดของวงใสเท่ากับ 9 มิลลิเมตร จากนั้นนำเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท (8-2-1, B6 และ 9AAI) มาเลี้ยงในอาหาร ISP2 broth เพื่อทำการสกัดสารด้านการเจริญของแบคทีเรีย แล้วสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (*Staphylococcus* sp.) ได้ เทียบกับ streptomycin พบว่าสารสกัดที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 ให้ค่า MBC ต่ำสุดคือเท่ากับ 100 µg/ml ในขณะที่ Streptomycin ให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml

ดังนั้นจึงเลือกเอาสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 มาทำการทดสอบหาค่า MBC กับแบคทีเรียแกรมบวก (*Bacillus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้รักษาสภาพน้ำยางโดยเปรียบเทียบกับ Streptomycin พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้ง *Staphylococcus* และ *Bacillus* ได้ โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MIC กับแบคทีเรียแกรมลบ มากกว่า 1000 µg/ml ส่วน Streptomycin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml แบคทีเรียแกรมลบให้ค่า MBC เท่ากับ 250 µg/m จากผลการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในยับยั้งเชื้อแบคทีเรียระหว่างสารสกัดหยาบจากไอโซเลท 8-2-1 และสเตรปโตไมซิน พบว่าสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพดีกว่าสเตรปโตไมซินโดยให้ค่า MBC ต่ำกว่า ซึ่งถ้าได้มีการทำให้สารบริสุทธิ์มากขึ้นจะยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูงขึ้นอีก

ดังนั้นจึงนำเอาสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซิโอสเตรปโตไมซิน 8-2-1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสดเปรียบเทียบกับ Streptomycin และสารที่ใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบสูงกว่าค่า MBC 10 เท่า นั่นคือ สารสกัดหยาบใช้ความเข้มข้น 1 มก./มล. Streptomycin ใช้ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาสภาพน้ำยางสดของสารชนิดต่าง ๆ พบว่าแอมโมเนียสามารถรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด การทดลองครั้งที่ 1 ค่า VFA No. เริ่มต้นของน้ำยางค่อนข้างสูงคือ เท่ากับ 0.0365 ซึ่งอาจเนื่องมาจากหลังจากกรีดน้ำยางถูกทิ้งไว้นาน 5 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการทดลอง ทำให้ในชั่วโมงที่ 3 ของการทดลอง น้ำยางที่เติมแอมโมเนียมีค่า VFA No. สูงกว่าค่ามาตรฐานน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น (>0.07) แต่น้ำยางยังคงไม่เกิดการเสียหาย ในการทดลองครั้งที่ 2 ค่า VFA No. เริ่มต้นต่ำกว่าการทดลองครั้งแรกคือมีค่าเท่ากับ 0.0186 ซึ่งอาจเนื่องมาจากหลังจากกรีดน้ำยางถูกทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการทดลอง หลังการเติมแอมโมเนีย 6 ชั่วโมง น้ำยางยังคงมีค่า VFA No. เพิ่มขึ้นเพียง 0.0062 ซึ่งค่า VFA No. ที่ชั่วโมงที่ 6 ยังอยู่ในค่ามาตรฐานของน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น แอมโมเนียเป็นสารที่นิยมใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางเพราะสามารถรักษาสภาพน้ำยางสดนาน เนื่องจากแอมโมเนียทำให้น้ำยางมีสภาพเป็นด่าง ซึ่งส่งเสริมสถานะแขวนลอยให้น้ำยาง แอมโมเนียสามารถทำลายแบคทีเรียได้โดยต้องเติม 0.35% ในน้ำยางโดยน้ำหนัก การรักษาสภาพน้ำยางขึ้นอยู่กับเวลาที่เติมแอมโมเนียลงไปเร็วหรือช้ามากน้อยเพียงใดหลังจากที่น้ำยางถูกกรีดและไหลจากต้นยาง (วรารกรณ์, 2549)

ผลจากการเตรียมสารสกัดหยาบในรูปแบบที่ต่างกัน คือ แบบที่ 1 ใช้ในการทดลองครั้งที่ 1 เตรียมโดยใช้สารสกัดหยาบ 4 กรัมละลายในเมทานอล 2.5 มล. จากนั้นละลายในน้ำกลั่น 22.5 มล. แล้วเติมลงในน้ำยาง 375 มล. วิธีการเตรียมแบบที่ 2 ใช้ในการทดลองครั้งที่ 2 เตรียมโดยใช้ สารสกัด 4 กรัมละลายในเมทานอล 2.5 มล.แล้วผสมลงในน้ำยาง 397.5 มล. พบว่าการเติมน้ำลงในสารสกัดในการเตรียมแบบที่ 1 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า สเตรปโตไมซิน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมแบบที่ 2 ซึ่งจากตารางจะพบว่าการเตรียมสารสกัดหยาบวิธีที่ 1 น้ำยางชุดที่เติมสารสกัดหยาบจะเกิดการเสียเร็วกว่าสเตรปโตไมซิน 20 นาที แต่เมื่อปรับวิธีการเป็นวิธีที่ 2 โดยการไม่เติมน้ำทำให้น้ำยางที่เติมสารสกัดหยาบเสียช้ากว่าน้ำยางที่เติมสเตรปโตไมซิน 1 ชั่วโมง แต่มีค่า VFA No. เท่ากับ 0.0861 ซึ่งสูงกว่าค่ามาตรฐานของน้ำยางสดที่นำไปแปรรูปเป็นน้ำยางข้น

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมสารสกัดหยาบกับโซเดียมซัลไฟต์ลงในน้ำยางพบว่า การเติมสารสกัดหยาบในวิธีการเตรียมแบบที่ 1 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า โซเดียมซัลไฟต์ 6 ชั่วโมง 10 นาที แต่เมื่อเติมสารสกัดหยาบที่เตรียมแบบที่ 2 ทำให้เกิดการเสียเร็วกว่า โซเดียมซัลไฟต์เพียง 30 นาที ดังนั้นการเติมน้ำลงในสารสกัดหยาบที่มีเมทานอลเป็นตัวทำละลายมีผลต่อการรักษาสภาพยางนั่นคือ การเติมน้ำลงไปจะทำให้เกิดการเสียสภาพเร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการละลายสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลมีผลทำให้น้ำยางจับตัวกันซึ่งอาจมีผลต่อการเสียของน้ำยางและค่า VFA No. ได้

จากผลการทดลองที่พบว่าสารสกัดจาก 8-2-1 สามารถรักษาสภาพน้ำยางได้ดีกว่าสเตรปโตไมซินเพียง ทั้งที่สารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีแต่ในแกรมลบไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ ส่วนสเตรปโตไมซินซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อ *Streptomyces griseus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Singh และ Mitchison, 1954) ทั้งนี้การเสียที่เกิดขึ้นนอกจาก

มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแล้ว อาจจะมีปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่นการสูญเสียน้ำ (Dehydration) ของโปรตีน ที่หุ้มอนุภาคยางซึ่งอาจเกิดจากการเติมแอลกอฮอล์หรือสารบางอย่างลงในน้ำยาง ทำให้อนุภาคยางมารวมตัวกันเป็นก้อนยาง (coagulum) และเกิดการเสียสภาพขึ้น (วรภกรณ, 2549) ดังนั้นการเตรียมสารสำหรับใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางจึงมีความสำคัญ จะเห็นได้ว่าการใช้สารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ในความเข้มข้นที่เท่ากันแต่มีการเตรียมที่แตกต่างกัน จะให้ผลไม่เท่ากัน ดังนั้นถ้าได้มีการวิจัยต่อไปถึงความเหมาะสมในการเตรียมสารเพื่อเติมลงไปในน้ำยาง และทดลองหาตัวทำละลายอื่นนอกเหนือจากเมทานอลอาจทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษาสภาพน้ำยางสูงขึ้น

ผลการคิดต้นทุนการผลิตสารสกัด หยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ปริมาณ 1 กรัม ใช้ต้นทุนการผลิตเท่ากับ 193.304 บาท และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารอื่นๆ โดยคำนึงถึงปริมาณที่ใช้ร่วมด้วย พบว่าสารสกัดหยาบมีต้นทุนสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟด์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

แอมโมเนียเป็นสารที่รักษาสภาพน้ำยางได้นานที่สุด มีราคาถูก แต่มีก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ มีผลต่อสุขภาพของบุคคลที่ทำงานเกี่ยวข้องกับน้ำยาง ตั้งแต่ชาวสวนจนถึงผู้นำน้ำยางพารามาทำเป็นผลิตภัณฑ์ รวมถึงผู้ที่อาศัยอยู่ใกล้เขตโรงงานที่มีการใช้น้ำยางพารา และทำให้เกิดการกัดกร่อนของโลหะ ซึ่งอาจจะเป็นส่วนประกอบของโรงงาน ดังนั้นถ้ามีการวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรการใช้สารสกัดจาก 8-2-1 ร่วมกับแอมโมเนีย หรือสารรักษาสภาพน้ำยางอื่นๆ อาจจะช่วยให้อาจสามารถลดปริมาณการใช้แอมโมเนียลงได้ซึ่งส่วนนี้นอกจากจะดีต่อสุขภาพของผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องแล้ว ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมวัสดุและสิ่งก่อสร้างที่สัมผัสน้ำยางอีกด้วย

สรุปผลการวิจัย

1. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเสียของน้ำยาง (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*) ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด
2. เมื่อนำใช้ในการรักษาสภาพน้ำยางโดยเปรียบเทียบกับสารรักษาสภาพอื่นๆ พบว่าแอมโมเนียรักษาสภาพน้ำยางได้ดีที่สุด รองลงมาคือ โซเดียมซัลไฟด์ สารสกัดหยาบ และ สเตรปโตมัยซินโดยพบว่ามีรูปแบบการเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทมีผลต่อการรักษาสภาพน้ำยาง เมื่อเปรียบเทียบกับ สเตรปโตมัยซิน พบว่าการเตรียมสารสกัดหยาบแบบที่ 1 (สารสกัด+เมทานอล+น้ำ) น้ำยางจะเกิดการเสียเร็วกว่าสเตรปโตมัยซิน แต่เมื่อปรับวิธีเตรียมสารสกัดเป็นแบบที่ 2 (สารสกัด+เมทานอล) ทำให้น้ำยางที่เติมสารสกัดหยาบเสียช้ากว่าน้ำยางที่เติมสเตรปโตมัยซิน และเกิดการเสียสภาพเร็วกว่าโซเดียมซัลไฟด์เพียง 30 นาที
3. ผลการคิดต้นทุนการผลิต พบว่าสารสกัดหยาบมีต้นทุนการผลิตสูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟด์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

คำขอบคุณ

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และได้รับคำปรึกษาและชี้แนะในด้านการวิเคราะห์ค่า VFA จาก คุณ จรัสศรี พันธุ์ไม้ หัวหน้าสายงานอุตสาหกรรมและทดลองผลิตภัณฑ์ยาง ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2548. คู่มือแนวปฏิบัติที่ดีด้านการป้องกันและลดมลพิษอุตสาหกรรมน้ำยางชั้น จุติพร บุญสถิตย์, ลัดดาวัลย์ บุญคุ้ม, กัญจน์ นวมะวัฒน์ และจิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณิชย์. 2551.
- การศึกษานิตของแบบคดีเรียในน้ำยางธรรมชาติและสารถนอมน้ำยางธรรมชาติชนิดใหม่ 34th Congress on Science and Technology of Thailand
- วราภรณ์ ขจรไชยกุล. 2549.ยางธรรมชาติ: การผลิตและการใช้งาน.กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 176 หน้า.
- Bennett J. V., Brodie J. L., Benner E. J. and Kirby W. M. M. 1966. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol* 14(2): 170-177.
- Castillo, U., J.K. Harper, G.A. Strobel, J. Sears, K. Alesi, E. Ford, J. Lin, M. Hunter, M. Maranta, H. Ge, D. Yaver, J.B. Jensen, H. Porter, R. Robison, D. Millar, W.M. Hess, M. Condon and D. Teplov. 2003. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol.Lett.* 224: 183-190.
- Cherrappathanathu Kuruvilla, J.; Lau, C. M.; Ng, C. S.; P. Subburao, R. R.; Murugesu, N. Preservation of natural rubber latex, GB patent no. 1,517,025 (1978)
- Ong, C. O. Preservation and enhanced stabilization of latex, GB patent no. 2,283,747 (1995), US patent no. 5,840,790 (1998)
- El-Naggar MY, El-Assar SA, Abdul-Gawad SM (2006). Meroparamycin Production by Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and Structural Elucidation. *J. Microbiol.* 44: 432-438.
- Omura, S. and A. Crump. 2004. The life and times of ivermectin - a success story. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 984-989.
- Shih, H., Y. Liu, F. Hsu, V. Mulabagal, R. Dodda and J. Huang. 2003. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. *J. Agricult. Food Chem.* 51: 95-99.
- Singh, B., and Mitchison, D.A. 1954. Bactericidal Activity of Streptomycin and Isoniazid Against *Tubercle Bacilli*. *Br Med J.* 16; 1(4854): 130-132.
- Spence D. and Van Niel C.B., *Industrial & Engineering Chemistry*, 1936, 28(7).
- Takizawa, M., Colwell, R. R. and Hill, R. T. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake bay. *Appl Environ Microbiol* 59(4): 997-1002.

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้
และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
เพื่อคัดเลือกเชื้อ แอคติโนมัยสิทที่มี ความสามารถในการ ยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียซึ่งเป็น สาเหตุของการเสีย ของนํ้ายางและ ประเมินประสิทธิภาพ ของสารสกัดจากเชื้อ แอคติโนมัยสิทที่ คัดเลือกได้เทียบกับ สารเคมีที่ใช้อยู่ใน อุตสาหกรรมยาง	1. การทดสอบ ความสามารถของเชื้อแอ คติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ ในห้องปฏิบัติการในการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรียโดยวิธี dual culture bioassay	1. นำเชื้อแอคติโนมัยสิท 102 ไอโซ เลทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ มาทดสอบความสามารถการยับยั้ง การเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี dual culture bioassay 2. นำสายพันธุ์ที่ให้ผลการยับยั้งดี ที่สุด 11 ตัวแรกมาทดสอบ ความสามารถในการยับยั้งการ เจริญของเชื้อ แบคทีเรียชั้นทุติยภูมิ โดยวิธี agar well diffusion	1. พบว่ามี 11 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียได้ดี 2. พบว่ามี 3 ไอโซเลท (8-2-1, B6 และ 9AAI) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียแกรมบวก (<i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i>) ได้ดีที่สุด
	2. เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโน มัยสิทที่มีความสามารถในการ ยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และทำการสกัดสารด้าน การเจริญของแบคทีเรียที่ เชื้อสร้างขึ้นมา	1. เพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทเพื่อ ทำการสกัดสารและทำการสกัดสาร ด้านการเจริญของแบคทีเรีย 2. นำสารสกัดหยาบที่ได้จากทั้ง 3 ไอโซเลทมาทดสอบหาค่า MIC ของ แบคทีเรียทดสอบ (<i>Staphylococcus</i> sp.) เทียบกับ streptomycin 3. นำสารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซ เลท 8-2-1 มาทำการทดสอบหาค่า MBC กับแบคทีเรียแกรมบวก (<i>Bacillus</i>) และแบคทีเรียแกรมลบ (<i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Escherichia</i>) เพื่อหาปริมาณที่ เหมาะสมที่จะนำไปใช้รักษาสภาพ นํ้ายางโดยเปรียบเทียบกับ Streptomycin	1. ได้สารสกัดหยาบจากเชื้อทั้ง 2. พบว่าสารสกัดที่ได้จากไอโซเลท 8-2-1 ให้ค่า MBC ต่ำสุดคือเท่ากับ 100 µg/ml ในขณะที่ Streptomycin ให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml 3. สารสกัดหยาบที่ได้จากไอโซเลท 8-2- 1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ทั้ง <i>Staphylococcus</i> และ <i>Bacillus</i> ได้โดยให้ หาค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MBC กับแบคทีเรียแกรมลบ มากกว่า 1000 µg/ml ส่วน Streptomycin สามารถ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งแกรม บวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรม บวกให้ค่า MBC เท่ากับ 200 µg/ml แบคทีเรียแกรมลบให้ค่า MBC เท่ากับ 250 µg/ml 3 ไอโซเลท
	3. ทดสอบประสิทธิภาพใน การรักษาสภาพนํ้ายางสด ของสารที่สกัดได้เทียบกับ สารเคมี	1. นำเอาสารสกัดหยาบจากเชื้อแอ คติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ความ เข้มข้น 1 มก./มล. มาทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียในนํ้ายางสดเปรียบเทียบกับ Streptomycin ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. และสารที่ใช้ในการรักษา สภาพนํ้ายางโดยใช้ความเข้มข้น ตามคำแนะนำของกรมวิชาการ เกษตร 2. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต	1. ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจาก แอคติโนมัยสิทไอโซเลท 8-2-1 ที่เตรียม โดยใช้สารสกัด 4 กรัมละลายในเมทานอล 2.5 มล. แล้วผสมลงในนํ้ายาง 397.5 มล. สามารถรักษาสภาพนํ้ายางได้นาน 4 ชม. 30 นาที ซึ่งนานกว่า streptomycin และ ใช้เวลาใกล้เคียงกับการใช้โซเดียมซัลไฟด์ ส่วนสารละลายแอมโมเนียสามารถรักษา สภาพนํ้ายางได้ดีที่สุดโดยสามารถรักษา สภาพนํ้ายางได้มากกว่า 8 ชั่วโมง 2. พบว่าสารสกัดหยาบมีต้นทุนการผลิต สูงกว่า Streptomycin, โซเดียมซัลไฟด์ และ สารละลายแอมโมเนีย เท่ากับ 77.9, 6,040 และ 4657 เท่า ตามลำดับ

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องการนำโครงการนี้ไปใช้ประโยชน์

นำข้อมูลที่ได้ไปนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่มีความสามารถในการยับยั้ง

การเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง

Screening of actinomycetes which has ability to inhibit growth of bacterial causing putrefaction of fresh latex



ดร. นาริรักษ์ นานแก้ว

(ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.))

เรื่องย่อ

○ ผลการทดลองความสามารถในการยับยั้งเชื้อแอคติโนมัยซีท์ 102 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท์สายพันธุ์ 8-2-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยเมื่อกำหนดความเข้มข้นของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่ 100 µg/ml ในช่องที่มี Streptomyces 100 µg/ml พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท์สายพันธุ์ 8-2-1 สามารถยับยั้งการเจริญของ Streptomyces ได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml

○ ผลการทดลองประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท์สายพันธุ์ 8-2-1 สามารถยับยั้งการเจริญของ Streptomyces และ Bacillus ได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml ส่วน Streptomyces สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml

○ เมื่อนำไปใช้ในการรักษาคุณภาพน้ำยางโดยการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท์สายพันธุ์ 8-2-1 สามารถยับยั้งการเจริญของ Streptomyces และ Bacillus ได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml

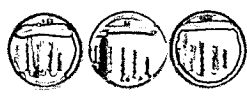
คำนำ

น้ำยางสดจะเกิดการเสียสภาพ เนื่องจากแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสด การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสดจะเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสด ซึ่งในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาคุณภาพน้ำยางสด เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียตลอดเวลา และเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาคุณภาพน้ำยางสดแล้ว เชื้อแบคทีเรียจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียตลอดเวลา และเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาคุณภาพน้ำยางสดแล้ว เชื้อแบคทีเรียจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียตลอดเวลา

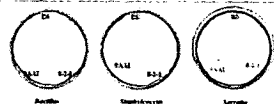
วิธีการทดลอง

1. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

Dual culture bioassay



Agar well diffusion method



2. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท์กับ streptomycin

สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท์	ความเข้มข้น (µg/ml)	ขนาดของวงยับยั้ง (mm)
Streptomyces	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000	

ผลการยับยั้งเชื้อ Streptomyces ของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท์ 8-2-1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



ผลการยับยั้งเชื้อ Streptomyces ของสาร Streptomycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



3. ผลการทดลองประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางสด

สายพันธุ์	สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท์ 8-2-1 (µg/ml)	ความเข้มข้น (µg/ml)	ขนาดของวงยับยั้ง (mm)
1	Streptomyces	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000	

สายพันธุ์	Streptomycin (µg/ml)	ความเข้มข้น (µg/ml)	ขนาดของวงยับยั้ง (mm)
1	Streptomycin	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000	

เมื่อนำไปใช้ในการรักษาคุณภาพน้ำยางสดโดยการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท์สายพันธุ์ 8-2-1 สามารถยับยั้งการเจริญของ Streptomyces และ Bacillus ได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml

วิจารณ์ผลการทดลอง

- จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท์ 8-2-1 สามารถยับยั้งการเจริญของ Streptomyces และ Bacillus ได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml
- จากการทดลองพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท์สายพันธุ์ 8-2-1 สามารถยับยั้งการเจริญของ Streptomyces และ Bacillus ได้โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 100 µg/ml และให้ค่า MIC เท่ากับ 200 µg/ml

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมโรค (2546) คู่มือแนวปฏิบัติสำหรับการป้องกันและควบคุมโรคอุจจาระร่วงในประเทศไทย
- จุฬารัตน์ ภูมิตถ์, อดิศักดิ์ ภูมิตถ์, กัญจน์ นวระวิชฌน์ และจิตต์ศักดิ์ ศักดาภิรมย์ (2551) การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางธรรมชาติและสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในน้ำยางธรรมชาติ
- Bennett J. V., Brode J. L., Benner E. J. and Kibbey W. M. 1966. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol* 14(2): 170-177.
- Chenrattaphanathun Kuruvilla, J.; Lau, C. M.; Ng, C. S.; P. Subbarao, R.; Murugesu, N. Preservation of natural rubber latex, GB patent no. 1,517,025 (1978)
- Ong, C. O. Preservation and enhanced stabilization of latex, GB patent no. 2,283,747 (1995), US patent no. 5,840,790 (1998)

ตอบข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่อร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการ
 “การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่เป็นสาเหตุของการเสียของน้ำยาง”

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิโดยนักวิจัย
<u>ความเห็นด้านการพิมพ์ (Editorial)</u>	
<u>ความเห็นด้านวิชาการ (Technical)</u> <u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1</u> 1. การเตรียมสารสกัดที่อยู่ในรูปตัวทำละลาย Methanol เพื่อนำมาเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย นำมาใช้เป็นสารรักษาสภาพน้ำยาง จะทำให้น้ำยางเสียสภาพจากการใช้ตัวทำละลายวิธีนี้ขอให้บทวนการรายงานผลในส่วนนี้ 2. ในตารางที่ 7 หน้าที่ 20 ควรใช้มาตรฐานยางชันเป็นค่าเปรียบเทียบสมบัติ VFA เพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่า VFA ของน้ำยางสดก่อนส่งโรงงานแปรรูปที่ผลิตน้ำยางชัน VFA โดยทั่วไปที่ปฏิบัติกันจะต้องไม่เกิน 0.07% มิฉะนั้นจะไม่สามารถนำไปปั่นน้ำยางชันให้มีคุณสมบัติต้องการได้ จึงไม่แน่ใจว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง ทำไมค่า VFA จึงสูง น่าจะหมายความว่าตั้งแต่กรีตจนขึ้นทดลองทำ VFA น้ำยางทิ้งได้นานก็ชั่วโมงแล้ว <u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 2</u> 1. เพื่อความถูกต้องสมบัติ VFA ที่รายงานทุกที่ให้เพิ่มเติมว่าเป็น VFA No. 2. ไม่น่าจะพัฒนาต่อเนื่องจากวิธีการยุ่งยากกว่าที่จะนำไปสู่การใช้จริง และค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิตสูงมากเมื่อเทียบกับการรักษาสภาพน้ำยางที่ใช้ทั่วไป	1. ได้นำข้อมูลเกี่ยวกับการเตรียมสารสกัดที่อยู่ในรูปตัวทำละลาย Methanolจะทำให้ น้ำยางเสียสภาพในวิจารณ์ผลการวิจัยหน้า 23 2. เปรียบเทียบค่า VFA No. ของน้ำยางในการทดลองกับค่า VFA No. ของน้ำยางสดก่อนส่งโรงงานแปรรูปที่ผลิตน้ำยางชันในผลการวิจัยหน้า 20-21 และในวิจารณ์ผลการวิจัยหน้า 23 1. แก้ไข VFA เป็น VFA No. 2. ผู้วิจัยมีความเห็นตรงกับผู้ทรงคุณวุฒิ

ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 3

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. การเขียนรายงานในส่วนทฤษฎี แนวคิดในงานวิจัยและผลงานที่เกี่ยวข้อง ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับ Actinomyces เอกสารอ้างอิงน้อย ไม่มีการระบุเอกสารอ้างอิงในส่วนของการศึกษาข้อมูล 2. เนื่องจากเป็นการศึกษาแบบง่ายๆ ทำให้การตีความผลการวิเคราะห์ไม่ได้ซับซ้อน สามารถแจกแจงได้ถูกต้อง แต่การนำผลที่ได้ไปวิจารณ์นั้นควรให้มีเนื้อหาที่เป็นประโยชน์กว่านี้ โดยนำข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงอื่นมาเทียบ หรือ ชี้แนะ ไม่ควรเขียนสรุปผลยาวเกินไป ควรเขียนในลักษณะตอบ โจทย์และวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ 3. จากรายงานมีเอกสารอ้างอิงน้อย ทำให้ไม่แน่ใจว่าผู้วิจัยมีการศึกษาเบื้องต้นมาเพียงพอหรือไม่ ข้อมูลที่ได้เกิดจากการทดลองครั้งเดียวหรือมีการทำซ้ำหรือไม่ ถ้าเป็นการดำเนินการครั้งเดียว ความถูกต้องอาจจะลดลง 4. หน้า 4-5 ควรปรับเนื้อหาของผลการดำเนินงาน สรุปข้อเสนอแนะให้ตรงกับหัวข้อ 5. ปรับปรุงบทคัดย่อให้เหมาะสมโดยการเพิ่มเติมข้อมูลของวิธีการวิจัย ไม่ควรเน้นประโยชน์ที่ยังไม่เกิด รายงานแค่ผลที่ได้เท่านั้นจะเหมาะสมกว่า Abstract ไม่ควรใช้คำซ้ำมากเช่นคำว่า we 6. ควรเพิ่ม reference ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับทฤษฎี และเพิ่มเติมข้อมูลของ Actinomyces ว่าเกี่ยวข้องกับงานวิจัยอย่างไร ทำไมถึงใช้เชื้อนี้ | <ol style="list-style-type: none"> 1. เพิ่มข้อมูลเกี่ยวกับแอคติโนมัยสิทในทฤษฎี แนวคิดในงานวิจัยและผลงานที่เกี่ยวข้อง ในหน้าที่ 12 และเพิ่มเอกสารอ้างอิงเกี่ยวกับแอคติโนมัยสิทในเอกสารอ้างอิงหน้า 15 2. เพิ่มเติมเนื้อหาและเอกสารอ้างอิงในส่วนของวิจารณ์ผลการวิจัย และปรับปรุงการเขียนสรุปผลการวิจัยเป็นการตอบวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ 3. เพิ่มเติมเอกสารอ้างอิง การทดลองมีการทำซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ และได้ระบุจำนวนซ้ำของการทดลองในวิธีการวิจัยหน้า 12-14 4. ปรับเนื้อหา ผลการดำเนินงาน และสรุปผลการวิจัยหน้า 4-5 ให้ตรงกับหัวข้อเรียบร้อยแล้ว 5. ปรับปรุงบทคัดย่อโดยการเพิ่มข้อมูลของวิธีการวิจัย ตัดส่วนที่อ้างถึงประโยชน์ที่อาจจะเกิดขึ้นออกเรียบร้อยแล้ว 6. เพิ่มเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องกับแอคติโนมัยสิทในเอกสารอ้างอิง หน้า 25 และเพิ่มเติมข้อมูลว่าเกี่ยวข้องกับงานวิจัยอย่างไรในทฤษฎี แนวคิดในงานวิจัยและผลงานที่เกี่ยวข้อง หน้า 11 |
|---|--|

7. วิธีการควรระบุว่าทำซ้ำหรือไม่ ผู้วิจัยระบุว่าสารสกัดจากเชื้อมีน้อย แต่ไม่ได้ผลิตเพิ่มเติม ซึ่งควรจะได้เพราะไม่ได้ใช้เวลามาก เพื่อให้ตรวจสอบสมบัติของสารสกัดหยาบ เช่น pH ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพน้ำยาง (ตามที่ผู้วิจัยระบุว่ามีความสำคัญ) 8. ในผลการทดลองหน้าที่ 20 มีการพูดถึงการเปลี่ยนแปลงของค่า VFA No. และคุณสมบัติ น้ำยางแต่ไม่ได้นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูล รวมถึงการใช้สารสกัดหยาบ ที่มีความเข้มข้น ต่างกัน ก็ไม่ได้วิเคราะห์ผลอาจจะเกิดจากสาเหตุใด ทำไมใช้ปริมาณน้อยลง แต่น้ำยางเสีย ฆ่าลงด้วย 9. การเตรียมสารสกัดหยาบควรวัด pH และควรมีการแยกให้บริสุทธิ์เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ฆ่า เชื้อได้เพื่อนำไปศึกษาค่อยๆทดสอบต่อไป	7. ระบุจำนวนซ้ำในวิธีการวิจัยเรียบร้อยแล้ว และทำการเช็ค pH ของสารสกัดหยาบ และตัวทำละลายที่ได้แล้วพบว่าทั้งสารสกัด, สารสกัด+เมทานอล, เมทานอล, สารสกัด+เมทานอล+น้ำ มี pH ประมาณ 7 ซึ่งทำให้ทราบว่าการเสียสภาพไม่น่าเกี่ยวกับ pH ดังนั้นผู้วิจัยจึงตัดการข้อสรุปดังกล่าวออกไปเรียบร้อยแล้ว 8. -เพิ่มเติมข้อมูลเรื่องการเปลี่ยนแปลงของค่า VFA No. และคุณสมบัติ น้ำยางไว้ในผลการวิจัยหน้า 20-21 - ในการวิจัยใช้ปริมาณสารสกัดหยาบเท่ากันแต่มีวิธีการเตรียมที่แตกต่างกันซึ่งได้เพิ่มเติมนำข้อมูลเหล่านี้แล้วในผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย การเตรียมในรูปแบบที่ 2 ใช้สารสกัดปริมาณเท่าเดิม แต่ใช้น้ำยางสดมากขึ้นนั่นคือ เท่ากับทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในน้ำยางน้อยลง แต่กลับให้สามารถรักษาสภาพ น้ำยางได้ขึ้น อาจจะเนื่องจากการเติมน้ำลงในสารสกัดในครั้งแรกเป็นการเพิ่ม ปริมาณเมทานอลซึ่งมีผลทำให้เกิดการจับกันของยางเนื่องจากเกิดการสูญเสีย น้ำของโปรตีนที่หุ้มอนุภาคยาง ซึ่งได้ใส่ข้อคิดเห็นนี้ไว้ในวิจารณ์ผลการวิจัยหน้า 42 9. ทำการวัด pH ของสารสกัดเรียบร้อยแล้วพบว่าเป็นกลาง การแยกสารให้บริสุทธิ์เพื่อหาสารออกฤทธิ์อาจต้องใช้เวลาในการวิจัย แต่ด้วยระยะเวลาในการรับ ทุนวิจัยมีจำกัดดังนั้นผู้วิจัยขอเข้าไปศึกษาเพิ่มเติมในงานวิจัยครั้งต่อไป
---	---

10. ในแง่การนำไปใช้ควรหาวิธีการผลิตแบบง่ายๆ ถ้าต้องการให้ชาวสวนผลิตเองหรือมีผู้รับ
ต่อไปผลิต รวมถึงวิธีการนำไปใช้ซึ่งอาจจะต้องร่วมกับ antibiotic หรือสารอื่นจึงจะยับยั้ง
หรือยืดอายุการเสียน้ำยางได้

10. ในแง่การผลิตด้วยวิธีการง่ายๆ โดยให้ชาวสวนผลิตเองมีโอกาสเป็นไปได้ยากแต่
ถ้ามีผู้รับไปผลิตแล้วขายต่อชาวสวนในรูปของสารสกัดอาจจะมีทางเป็นไปได้
เนื่องจากการสกัดสารต้องมีเครื่องระเหยตัวทำละลาย (Evaporator) เพื่อนำตัวทำ
ละลายกลับมาใช้ใหม่เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุน ซึ่งถ้าไม่ใช่เครื่องนี้ ต้องปล่อยให้
ตัวทำละลายระเหยจะต้องใช้เวลานาน และเกิดการสูญเสียตัวทำละลายซึ่งต้นทุน
ส่วนนี้จะเพิ่มขึ้น
ได้เพิ่มเติมข้อเสนอแนะในเรื่องของการนำสารสกัดไปใช้ร่วมกับสารอื่นๆ เพื่อยืดอายุ
ของน้ำยางและลดปริมาณการใช้แอมโมเนียในวิจารณ์ผลการวิจัย