สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดหอมที่เลี้ยงในอาหารเหลวต่อเชื้อก่อโรคท้องร่วงและข้ออักเสบในสุกร

Antibacterial activity of extracts of *Lentinula edodes* mycelium grown in liquid media on bacteria causing diarrhea and arthritis in swine

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2553

จำนวนเงิน 140,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวเรือนแก้ว ประพฤติ

ผู้ร่วมโครงการ นายวศิน เจริญตัณธนกุล

งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

1 กรกฎาคม 2554

คำนิยม

โครงการวิจัยฯ นี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2553 ผ่านคณะกรรมการการวิจัยและสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ทางผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ ดร.กัญญ์ฤทัย วงศ์ษาวรรณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ผู้วิจัย

1 กรกฎคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
อุปกรณ์และวิธีการ	4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	12
สรุป	25
บรรณานุกรม	26

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	15
2	บริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบในเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* และ *S.suis*	16
3	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มทดสอบ กับเชื้อ *E.coli* และ *S. suis*	22

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลผลิตเส้นใยเห็ดหอม (*L.edodes*) เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม supplement ชนิดต่าง ๆ	12
2	ลักษณะสารสกัดหยาบของเส้นใย *L.edodes* ที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม,เมทธานอล, เอทธิล อะซีเตต	15
3	Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *E.coli* ของสารสกัดหยาบเมทธานอล	17
4	Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *E.coli* ของสารสกัดหยาบเอทธิลอะซีเตท	17
5	Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *E.coli* ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม	18
6	Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 15.2 ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม	19
7	Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 7.2 ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม	19
8	Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 4.5 ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม	20
9	การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มทดสอบกับเชื้อ *E.coli* ด้วยวิธี colorimetric micro-dilution technique	22
10	การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 4.5 ด้วยวิธี colorimetric micro-dilution technique	23
11	การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 7.2 ด้วยวิธี colorimetric micro-dilution technique	23
12	การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 15.2 ด้วยวิธี colorimetric micro-dilution technique	24

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดหอมที่เลี้ยงในอาหารเหลวต่อเชื้อก่อโรคท้องร่วงและข้ออักเสบในสุกร

Antibacterial activity of Crude Extract from *Lentinula edodes* mycelium grown in liquid media on *Escherichia coli* and *Streptococcus suis*

เรือนแก้ว ประพฤติ[1] วศิน เจริญตัณฑนกุล[2*]

Rueankaew Praphruet Wasin Charerntantanakul

[1]สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

[2]สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดของเส้นใยเห็ดหอมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Streptococcus suis* งานวิจัยแบ่งออกเป็นสองส่วน ได้แก่ ส่วนแรกศึกษาชนิดของอาหารเสริม (supplement) ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในสภาวะอาหารเหลวและส่วนที่สอง ได้แก่ การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบที่เตรียมจากเส้นใยเห็ดหอม จากการทดลองเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลวที่เติมอาหารเสริมต่างชนิดกันจำนวน 3 สูตร พบว่า อาหารสูตร YEM+1%รำข้าว ให้ปริมาณผลผลิตเส้นใยมากที่สุด รองลงมาคือสูตร YEM+1%กากน้ำตาลและสูตร YEM+1%ขี้เลื่อย ตามลำดับ นำเส้นใยเห็ดหอมที่เพาะในอาหารสูตร YEM+1%รำข้าวมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทธานอล เอทธิลอะซีเตตและคลอโรฟอร์ม และนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกับเชื้อ *E.coli* และ *S. suis* ด้วยวิธี disc diffusion assay พบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยสารสกัดหยาบเมทธานอลมีฤทธิ์มากที่สุดในเชื้อ *E.coli* ตามด้วยสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มและเอทธิลอะซีเตต ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์มากที่สุดในเชื้อ *S. suis* ตามด้วยสารสกัดหยาบเมทธานอลและเอทธิลอะซีเตต งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าเส้นใยเห็ดหอมมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. suis*

คำสำคัญ: เห็ดหอม สารสกัดหยาบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* *Streptococcus suis*

Abstract

This study evaluated the potential of crude *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler mycelial extract to inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Streptotoccus suis*. The study comprised two parts: the first part studied the effect of dietary supplement on *L. edodes* mycelial yield, and the second part tested the antibacterial effects of crude *L. edodes* mycelial extract on *E. coli* and *S. suis*. Among three types of dietary supplements, the yeast-extract-malt (YEM) broth supplemented with 1% rice bran showed highest efficiency in producing *L. edodes* mycelial yield, followed by YEM supplemented with 1% molasses and with 1% sawdust, respectively. After obtaining sufficient amounts of *L. edodes* mycelia (from appropriate YEM+1% rice bran formula), the mycelia were extracted with three different solvents, *i.e.* methanol, ethyl acetate, and chloroform. The crude methanolic extract of *L. edodes* manifested highest potential in inhibiting *E. coli* growth as determined by the disc diffusion assay. The inhibitory potential of the extracts was also observed with less activity in chloroform and ethyl acetate extraction, respectively. On the other hand, the crude chloroform extract of *L. edodes* showed highest potential in inhibiting *S.suis*, followed by the potentials of crude methanolic and ethyl acetate extracts, respectively. This study indicated that the *L. edodes* mycelial extract has the potential to inhibit the growth of *E. coli* and *S. suis*.

Key words: *Lentinula edodes*, Crude extract, Antibacterial activity, *Escherichai coli*, *Streptococus suis*

คำนำ

เห็ดหอม (shiitake; *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler เป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูง นอกจากจะนำมาใช้ประกอบอาหารได้หลากหลายชนิดแล้วเห็ดชนิดนี้ยังมีสรรพคุณทางยา นำมาใช้ในเป็นส่วนประกอบของยารักษาโรคโดยเฉพาะตำรับยาจีนมาตั้งแต่สมัยโบราณ รายงานผลการศึกษาฤทธิ์ของสารชีวภาพจากเห็ดหอมพบว่าสารชีวภาพมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (Maeda *et al*,1998) ต่อต้านเชื้อไวรัส (Tochikura *et al*, 1988) รวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพก่อโรคในคน (Takazawa *et al*, 1982) จากสรรพคุณที่มีประโยชน์ของสารเหล่านี้จึงได้มีการสกัดสารจากดอกเห็ดในระดับอุตสาหกรรม การเพาะเห็ดหอมต้องอาศัยสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง และการกระตุ้นเพื่อให้เกิดดอกเห็ด ใช้ระยะเวลาประมาณ 4-5 เดือน ปัจจุบันปริมาณผลผลิตทั้งในรูปดอกเห็ดสดและแห้งยังมีไม่เพียงพอต่อความต้องการทำให้เห็ดชนิดนี้มีราคาสูง ได้มีการพัฒนาเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดชนิดนี้ในอาหารเหลวและสกัดสารสำคัญจากเส้นใยแทนการสกัดจากส่วนของดอกเห็ด เพราะคุณค่าทางอาหารและองค์ประกอบของสารที่สำคัญที่พบในเส้นใยไม่แตกต่างจากส่วนของดอกเห็ด อีกทั้งกระบวนการผลิตเส้นใยสามารถควบคุมได้ ช่วยลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงให้สั้นลง Hassegawa และคณะ (2005) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว Yeast Extract Malt (YEM) ที่เติมวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหลาย ๆ ชนิดลงไปในอาหารด้วย อาทิเช่น รำข้าว กากน้ำตาล หางนม ขี้เลื่อยไม้ยูคาลิปตัส พบว่าสภาวะที่ให้ผลผลิตเส้นใยมากที่สุดคือ ในอาหารสูตรที่เติมรำข้าว 0.5% อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25°C ใช้ระยะเวลา 30 วัน ให้ผลผลิตเส้นใยน้ำหนักแห้ง 3.24 มก./มล. และเพิ่มขึ้นเป็น 5.0 มก./มล. เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่า ในเวลา 24 วัน ระดับ pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 3.0 -5.5 เมื่อนำอาหารมากรองผ่านแผ่นกรองมาทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้

Ishikawa และคณะ (2001) ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมจำนวน 35 ไอโซเลต (isolate) ในอาหารเหลว malt extract broth พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือที่ 25°C ในสภาวะนิ่งไม่มีการเขย่า หลังจากเลี้ยงครบ 30 วัน สกัดเส้นใยด้วยเอทธิล อะซีเตท (ethyl acetate) และน้ำ นำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบกับเชื้อก่อโรคในคนและเชื้อที่มักพบว่ามีการปนเปื้อนในอาหารบ่อย พบว่าสารสกัดหยาบจาก *L.edodes* isolate Le1 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 8 ชนิด จากจำนวน 20 ชนิด โดยมีประสิทธิภาพดีกับ

แบคทีเรียแกรมบวก เช่น *B.cereus, B.subtilis, Listeria innocuo, L.monocytogenes, Staphylococcus aureus,* และ *S. epidermidis*

โรคท้องเสียที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* และโรคข้ออักเสบที่เกิดจากเชื้อ *Streptococcus suis* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในสุกร การป้องกันและรักษาใช้ยาปฏิชีวนะอาจทำให้เชื้อเกิดการดื้อต่อยาที่ใช้กันมาเป็นระยะเวลานาน สารปฏิชีวนะที่ใช้อาจตกค้างในเนื้อและผลิตภัณฑ์แปรรูปซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ปัจจุบันมีการตระหนักถึงความปลอดภัยของอาหาร ผู้บริโภคหันมาบริโภคผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมากขึ้น ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะนำสารสกัดจากเห็ดหอมมาใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิด ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งจะช่วยลดการนำเข้ายาปฏิชีวนะ ลดปัญหาเรื่องสารตกค้างและส่งเสริมการเลี้ยงสุกรแบบอินทรีย์

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลวจากนั้นจะนำเส้นใยที่เพาะเลี้ยงมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E.coli* และ *S.suis* ที่ก่อโรคในสุกร

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ
2. ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเส้นใย
3. ตู้เลี้ยงเซลล์ภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
4. เครื่องระเหยแห้ง evaporator
5. เครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ
6. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
7. ตู้อบลมร้อน
8. จานอาหารเพาะเลี้ยง
9. หลอดทดลองขนาด 16 x 10 มม.
10. กระดาษกรองเบอร์ 3 , 4
11. ปั๊มดูดอากาศ
12. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.
13. separating funnel ขนาด 100 มล.
14. pH meter

15. ไม้พันสำลี

16. หลอดฉีดยา

17. แผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร

สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใย Yeast Extract Malt (YEM)

1. yeast extract
2. $CaSO_4$
3. peptone
4. glucose
5. น้ำต้มมันฝรั่ง
6. รำข้าว, กากน้ำตาล, ขี้เลื่อยไม้ยางพารา
7. 37% hydrochloric

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. Nutrient agar
2. Muller Hinton Agar
3. Muller Hinton Broth
4. Tryptic Soy Broth
5. Blood agar

เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

1. *E. coli* TISTR 780 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. *S. suis* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.กัญญ์ฤทัย วงศ์ษาวรรณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เส้นใยเห็ดหอม (Shiitake mushroom; *Lentinus edodes*);

RK – Lotus– 26-03-52 จากห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วิธีการวิจัย

1. ศึกษา supplement ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลว

เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลว 3 สูตร แต่ละสูตรมีองค์ประกอบหลักเหมือนกันในปริมาตร 1 ลิตรประกอบด้วย yeast extract 2 กรัม, แคลเซียมซัลเฟต 1 กรัม, เปบโตน 5 กรัม, กลูโคส 10 กรัม และน้ำต้มมันฝรั่ง 200 มิลลิลิตร อาหารแต่ละสูตรเติม supplement ต่างชนิดกัน ดังนี้ สูตรที่ 1 เติมรำข้าว สูตรที่ 2 เติมกากน้ำตาลและสูตรที่ 3 เติมขี้เลื่อยไม้ยางพารา อย่างละ 1% (ปริมาตร/น้ำหนัก) ตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้เท่ากับ 4.5 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 150 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเย็นที่อุณหภูมิห้อง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงในบนเส้นใยเห็ดหอมเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar เลี้ยงเส้นใย 7-10 วัน ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นส่วนอาหารที่มีเส้นใยติดอยู่มาวางให้ลอยบนผิวหน้าอาหารเหลว จำนวน 6 ชิ้นต่อขวด โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปเพาะเลี้ยงขวดอาหารไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25°C

บ่มเลี้ยงเส้นใยครบ 30 วัน ทำการเก็บส่วนของเส้นใยซึ่งลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลว นำมาล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์ฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง วางแผ่นเส้นใยลงบนกระดาษกรองเบอร์ 4 ดูดเอาน้ำออกให้มากที่สุดด้วยปั๊มดูดอากาศ นำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ชั่งจดบันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใย ส่วนของเหลว (supernatant) นำมากรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่ 4°C จนกว่าจะนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7-10 วัน

↓

เจาะเส้นใยด้วย cork borer ย้ายเส้นใยมาเลี้ยงในอาหารเหลว

↓

บ่มเพาะเลี้ยงเส้นใยที่ 25°C เป็นเวลา 30 วัน

↓

แยกส่วน supernatant และเส้นใยออกจากกัน

↓

Supernatant	Mycelial
↓	↓
กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร	ล้างด้วยน้ำกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
↓	↓
เก็บที่ 4°C จนกระทั่งใช้ทดสอบ	ดูดเอาน้ำออกด้วยปั๊มดูดอากาศ ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4
	↓
	อบเส้นใยที่ 50°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งเส้นใยจากอาหารแต่ละสูตร

2. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำเส้นใยที่อบแห้งแล้วมาบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย มีขั้นตอนดังแผนภูมิต่อไปนี้

ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบ

ชั่งผงเส้นใยบดละเอียด 50 กรัม ใส่ใน separating funnel ขนาด 100 มล.

↓

เติมตัวทำละลาย ได้แก่เมทธานอล, เอธิลอะซีเตตและคลอโรฟอร์ม ชนิดละ 60 มล.

↓

เขย่าด้วยมืออย่างต่อเนื่องนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน

↓

แยกกากและของเหลวโดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ด้วยปั๊มดูดอากาศเก็บส่วนใส

↓

นำส่วนใสไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ตั้งอุณหภูมิ 50°C ความเร็ว 80 รอบต่อนาที จนกระทั่งปริมาตรของสารลดลง 10 เท่า แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 2 มล.

↓

นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบเป็นผงและน้ำหนักคงที่

↓

ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ เก็บที่ -20°C นำไปใช้ทดสอบ antibacterial activity ต่อไป

a) เส้นใย *L.edodes* ในอาหารเหลวอายุ 10 วัน

b) ขั้นตอนการเก็บผลผลิตและล้างเส้นใยหลังเลี้ยงในอาหารเหลว 30 วัน

c) เส้นใยที่ผ่านการกรองและดูดเอาน้ำออก

d) เส้นใยที่ผ่านการอบที่ 50°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

e) ขั้นตอนการสกัดด้วยตัวทำละลาย

f) สารสกัดหยาบจากเส้นใย

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของ supernatant และสารสกัดหยาบด้วยวิธี disc diffusion assay (NCCLS,1999)

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

3.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* (TISTR 780)

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E.coli* จากอาหาร Nutrient agar (NA) ลงในอาหาร Muller Hinton Broth (MHB, Difco,USA) ปริมาตร 3 มล. นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำเชื้อมาเจือจางด้วย normal saline 0.85% ให้มีเชื้อปริมาณ 10^5 - 10^7 CFU/มิลลิลิตร โดยเทียบกับ McFarland's standard No. 0.5 ใช้ไม้สำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อชุบสารละลายแบคทีเรีย นำไปป้ายบนอาหาร MHA จนทั่วจานอาหาร

3.1.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. suis*

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *S.suis* จากจานอาหาร Blood agar (BA) ลงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB, Difco,USA) ปริมาตร 3 มล. นำไปบ่มที่ 37°C ที่มี CO_2 5% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำเชื้อมาเจือจางด้วย normal saline 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^5 - 10^7 CFU/มิลลิลิตร โดยเทียบกับ McFarland's standard No. 0.5 ใช้ไม้สำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อชุบสารละลายแบคทีเรีย นำไปป้ายบนอาหาร BA จนทั่วจานอาหาร

3.2 การเตรียมสารละลายสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบเมทธานอล, เอทธิล อะซีเตตและคลอโรฟอร์ม มาละลายใน 40%, 60%, 80% และ 100% dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 มก./มล. หยดสารสกัดหยาบแต่ละชนิดลงบนแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 3 ที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. ปริมาตร 15 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 1.5 มก./แผ่น) โดยมีชุดควบคุม negative control คือ DMSO และ positive control คือ ampicillin (100 มคก./มล.) ส่วนการเตรียม supernatant ให้ดูด supernatant ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มา 15 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองเช่นเดียวกัน โดยมี supernatant ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงเส้นใยเป็น negative control และมี ampicillin เป็น positive control

นำแผ่นกระดาษกรองที่หยดสารทดสอบแล้วจากข้อ 3.2 มาทดสอบกับเชื้อ *E.coli* โดยวางลงบนผิวหน้าอาหาร MHA ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรณีที่ทดสอบกับเชื้อ *S.suis* ให้นำไปวางบนอาหาร BA ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.2 บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37°C ปริมาณคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ 5%เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (1 จานอาหาร ต่อ 1 ซ้ำการทดลอง)

3.4 การอ่านผล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (inhibition zone) ด้วย digital caliper (0-150 มิลลิเมตร)

4. **การทดสอบหาค่า MIC (minimal inhibition concentration) และ MBC (minimal bactericidal concentration) โดยวิธี colorimetric micro-dilution technique (Eloff,1998)**

1) นำสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มที่ละลายด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2) เจือจางสารสกัดหยาบจากข้อ 1) แบบ 2-fold serial dilution โดยเติมอาหาร MHB ลงใน 96 wells microplate หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดหยาบ 50 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 มก./มล.) ปริมาตรรวมเท่ากับทั้งหมด 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้น-ลง เพื่อให้ผสมกัน จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ออกนำไปใส่ในหลุมถัดไป (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 มก./มล.) ทำซ้ำขั้นตอนนี้จนถึงระดับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.78 มก./มล. โดยมีชุดควบคุมคือ normal saline ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3) เตรียมสารละลายเชื้อทดสอบโดยเลี้ยงในอาหาร Muller Hilton Brath (MHB) และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ด้วยสารละลาย 0.85% normal saline

4) เติมเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากข้อ 3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในสารสกัดแต่ละความเข้มข้น นำไปบ่มที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง

5) เติมสารละลาย INT (p-iodonitrotetrazolium violet) (ความเข้มข้น 1 มก./มล.) ลงไปหลุมๆ ละ 6 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.06 มก./มล.

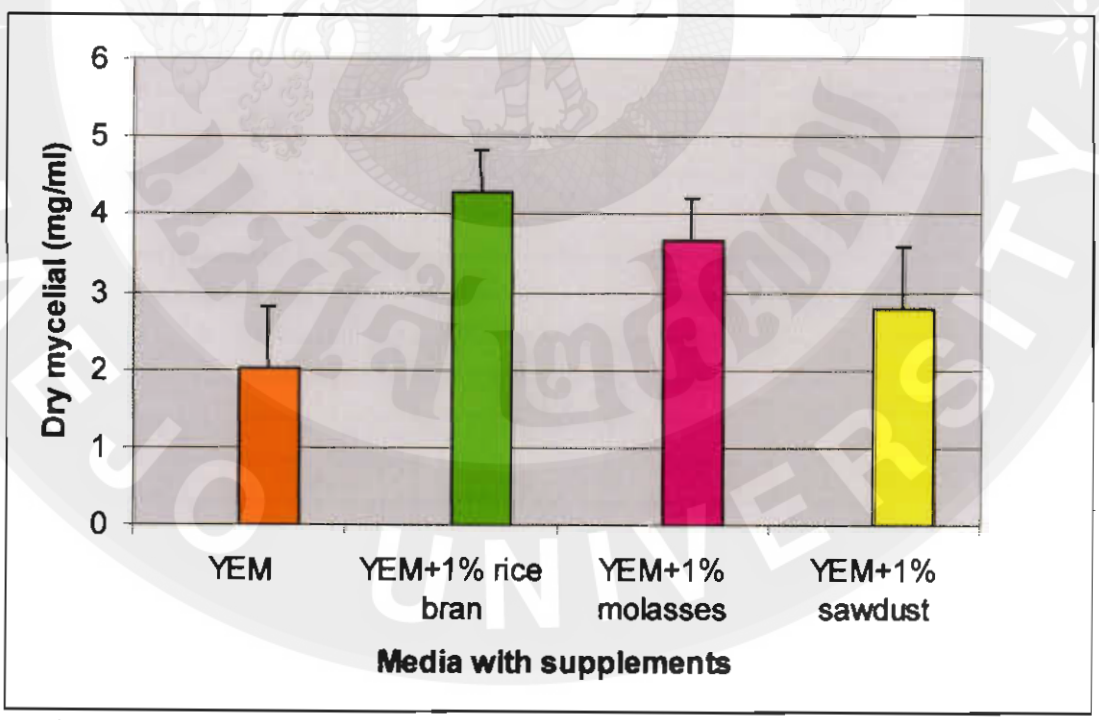
6) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัด โดย MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงของสี

7) ดูดสารละลายทั้งหมดจากหลุมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีหรือสารละลายสีใส มาหยดลงบนอาหาร Muller Hilton Agar จากนั้น spread ด้วยแท่งแก้วงอ ให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูจากจำนวนโคโลนีที่ขึ้นในจานอาหาร ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีจำนวนเชื้อขึ้นน้อยกว่า 5 โคโลนี ถือว่าเป็น MBC (Minimal Bactericidal Concentration)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ชนิดของ supplement ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลว ปริมาณผลผลิตเส้นใยในอาหารที่เติมและไม่เติม supplement

จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลว 3 สูตร แต่ละสูตรเติม supplement ต่างชนิดกันดังนี้ สูตรที่ 1 YEM+1%รำข้าว สูตรที่ 2 YEM+1% กากน้ำตาล สูตรที่ 3 YEM+1%ขี้เลื่อย บ่มเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน เก็บผลผลิตเส้นใยและชั่งน้ำหนักแห้งพบว่า อาหารทั้ง 3 สูตร ให้ผลผลิตมากกว่าชุดควบคุมหรือสูตร YEM ไม่เติม supplement เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตภายในสูตรที่เติม supplement พบว่าค่าเฉลี่ยผลผลิตเส้นใยมีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยอาหารสูตร YEM+1% รำข้าวให้ผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 4.27 มก./มล. รองลงมาคือสูตร YEM+1%กากน้ำตาลและ สูตร YEM+1%ขี้เลื่อย ให้ผลผลิต 3.65 และ 2.78 มก./มล.ตามลำดับ อาหารสูตร YEM ที่ไม่ได้เติม supplement ลงไปให้ผลผลิตเส้นใยน้อยที่สุด 2.01 มก./มล.



ภาพที่ 1 ผลผลิตเส้นใยเห็ดหอม (*L.edodes*) เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม supplement ชนิดต่าง ๆ LSD ($P \leq 0.05$)

ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมในระยะ 7 วันแรก ในอาหารทั้ง 3 สูตรไม่มีความแตกต่างกัน เริ่มเห็นการเจริญที่แตกต่างกันชัดเจนในวันที่ 12 โดยอาหารสูตรที่เติมรำข้าวเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารและเริ่มเกาะที่ผนังขวด ส่วนสูตรที่เติมกากน้ำตาลและขี้เลื่อยเส้นใยเจริญประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของผิวหน้าอาหาร ขณะที่สูตร YEM ไม่เติม supplement เส้นใยเจริญเพียง 50-60 เปอร์เซ็นเท่านั้นและเจริญเต็มผิวหน้าอาหารในวันที่ 20 ของการเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารสูตรที่เติมรำข้าวมีความหนาของชั้นเส้นใยมากที่สุด รองลงมาคือสูตรที่เติมกากน้ำตาล ขี้เลื่อย และชุดควบคุม

ผลผลิตน้ำหนักเส้นใยเชื้อรา *L.edodes* ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมกับสูตรที่ไม่เติม supplement พบว่าผลผลิตแตกต่างกันอย่างชัดเจนโดยเฉพาะในสูตรที่เติมรำข้าว ให้ผลผลิตที่แตกต่างกันมากกว่า 100% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะใน supplements มีองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *L.edodes* สูตรที่เติมรำข้าวให้ผลผลิตสูงที่สุด เพราะในรำข้าวมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน วิตามินและแร่ธาตุ ที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ในการเจริญ (Fasidi และ Kadiri,1993) และมีปริมาณสารอาหารที่มากกว่าสูตรที่เติมกากน้ำตาลและขี้เลื่อย ในกากน้ำตาลมีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสซึ่งเชื้อราสามารถนำไปใช้ในการเจริญของเส้นใยได้ (Petre และ Teodores,2009) แต่ปริมาณอาจจะน้อยกว่าที่มีในรำข้าว ขี้เลื่อยมีองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลูโลสและลิกนิน เชื้อราต้องย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนจึงจะสามารถนำไปใช้ได้ ทำให้เส้นใยเจริญได้ค่อนข้างช้า

อาหาร YEM+1% ให้ผลผลิตเส้นใยแห้งมากที่สุด (4.27 มก./มล.) ซึ่งมากกว่าสูตรที่เติมกากน้ำตาลและขี้เลื่อย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Hassegawa และคณะ (2005) ที่รายงานว่าการเติมรำข้าว 0.5% ลงในอาหารสูตร YEM ทำให้ได้ผลผลิตเส้นใยแห้ง 3.2 มก./มล ซึ่งมากกว่าผลผลิตที่ได้จากการเติม vermiculite กากน้ำตาลและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอื่นๆ อีก 14 ชนิด การทดลองนี้ใช้รำข้าว 1% ได้ผลผลิตของเส้นใยเท่ากับ 4.27 มก./มล. ขณะที่ Hassegawa ใช้รำข้าว 0.5% ได้ผลผลิตเท่ากับ 3.2 มก./มล. ผลการทดลองนี้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 1.07 มก./มล. หรือคิดเป็น 33.43% แสดงว่าการเพิ่มปริมาณรำข้าวจะทำให้ผลผลิตเส้นใยมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้น Kapoor และคณะ (2009) รายงานว่าการเติม 10% รำข้าวในอาหารแข็งทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *L.edodes* กว้างขึ้น แต่การเลี้ยงในอาหารเหลวอาจไม่จำเป็นต้องใช้ปริมาณมากเพราะในสภาวะที่เป็นของเหลวสารอาหารที่ละลายน้ำได้ จะละลายออกมาและเชื้อราสามารถนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณรำข้าวในสูตรอาหารอาจจะไม่ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลผลิตเส้นใยเสมอไป ทั้งนี้เพราะหากใช้เลี้ยงเชื้อราด้วยปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าเดิม แต่เพิ่มปริมาณรำข้าวมากจนเกินความต้องการที่เชื้อราจะใช้ใน

การเจริญเติบโตก็จะเป็นการสิ้นเปลือง การเลี้ยงเส้นใยเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์จำเป็นต้องศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเชื้อเริ่มต้นกับปริมาณรำข้าว

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion assay

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ supernatant

นำ supernatant ของอาหารทั้ง 3 สูตร หลังเพาะเลี้ยงเส้นใยเป็นเวลา 30 วัน มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion assay ทดสอบกับ *E.coli* และ *S. suis* จำนวน 3 ไอโซเลต ผลปรากฏว่าไม่พบว่า supernatant จากอาหารสูตรใดเลยที่สามารถทำให้เกิดบริเวณใส (inhibition zone) กับเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิด ขณะที่แอมพิซิลลิน (positive control) เกิดบริเวณวงใสในเชื้อ *E.coli* และเชื้อ *S. suis* เท่ากับ 11.45 มม. และ 24.23 ตามลำดับ

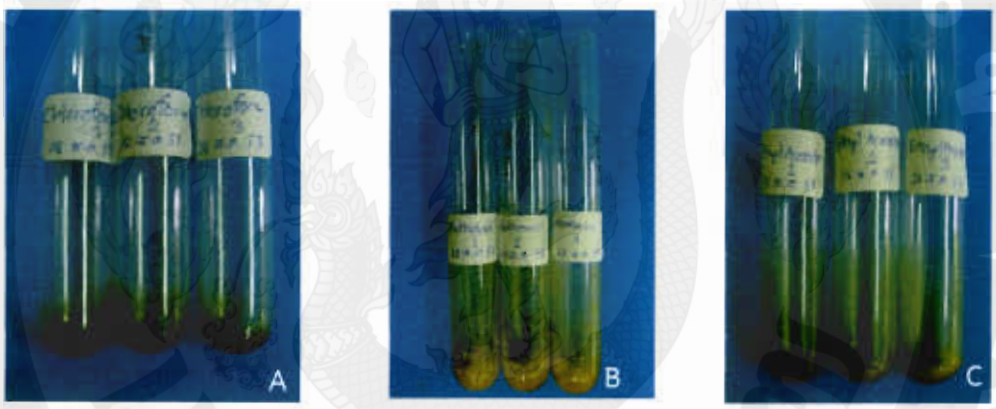
Ishikawa และคณะ (2001) นำ supernatant ที่เลี้ยงเส้นใยของ *L.edodes* มาสกัดด้วยเอทธิล อะซีเตต พบว่าสารสกัดที่ได้สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B.subtilis* สารที่สกัดได้มีความเป็นขั้วค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับรายงานของ Komemushi และคณะ (1996) ที่พบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ทำให้ความเข้มข้นมากขึ้นแสดงว่า เชื้อรา *L.edodes* สามารถสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ทั้งชนิดที่เก็บไว้ในเซลล์ (intracellular) และชนิดที่ขับออกนอกเซลล์ (extracellular) แต่การศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้นำ supernatant มาผ่านขั้นตอนการสกัดเพื่อให้สารมีความเข้มข้นก่อนที่จะนำมาทดสอบ อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่พบบริเวณยับยั้งทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าสารออกฤทธิ์มีปริมาณน้อยและค่อนข้างเจือจาง

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

เมื่อนำเส้นใยมาสกัดด้วย เมทธานอล เอทธิลอะซีเตท และ คลอโรฟอร์ม พบว่าเมทธานอลให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุด (1,713.45 มก.) รองลงมาคือคลอโรฟอร์ม (1,110.15 มก.) และเอทธิล อะซีเตทให้ปริมาณสารสกัดหยาบน้อยที่สุด (972.75 มก.) (ตาราง 1) ลักษณะของสารสกัดหยาบที่ได้จากการใช้สารเคมีทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะสีเหลืองปนน้ำตาล (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนัก (มก.) ของสารสกัดหยาบ
คลอโรฟอร์ม	1,110.15
เมทธานอล	1,713.45
เอทธิล อะซีเตต	972.75



ภาพที่ 2 ลักษณะสารสกัดหยาบของเส้นใย *L.edodes* ที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ A) สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม B) สารสกัดหยาบเมทธานอล C) สารสกัดหยาบเอทธิล อะซีเตต

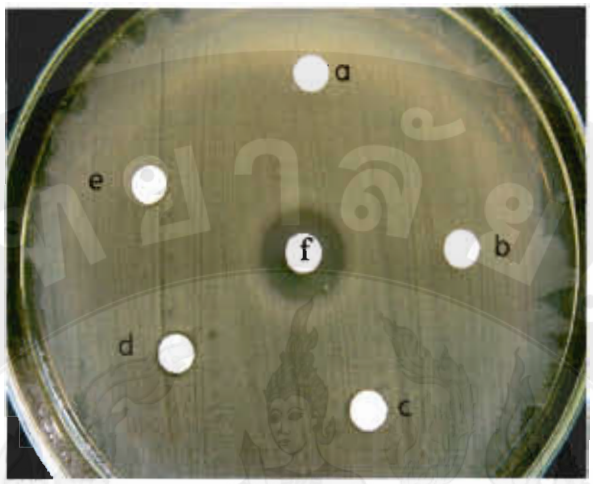
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในสุกร 2 ชนิดคือ *E.coli* และ *S. suis* จำนวน 3 ไอโซเลต โดยนำสารสกัดหยาบที่เตรียมจากการสกัดด้วยสารเคมี 3 ชนิด ได้แก่ เมทธนอล, เอทธิล อะซีเตท และคลอโรฟอร์ม นำสารสกัดหยาบไปผ่านการระเหยแห้ง ละลายด้วย 100% DMSO ให้มีความเข้มข้น 100 มก./มล. แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion assay พบว่าสารสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ชนิด สามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ สารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด สามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งในเชื้อ *E.coli* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.20 – 8.43 มม. โดยที่ขนาดของบริเวณยับยั้งของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเชื้อ *S.suis* จำนวน 3 ไอโซเลต พบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิด สามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งในทั้ง 3 ไอโซเลต สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มสามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดเท่ากับ 12.27 มม. ในไอโซเลต 15.2 และสารสกัดหยาบเอทธิล อะซีเตตทำให้เกิดบริเวณยับยั้งน้อยที่สุดเท่ากับ 6.71 มม. ในไอโซเลต 7.2 สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์ม สามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกว้างมากที่สุดในทุกๆ ไอโซเลต เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบเมทธานอลและเอทธิล อะซีเตต (ตารางที่ 3)

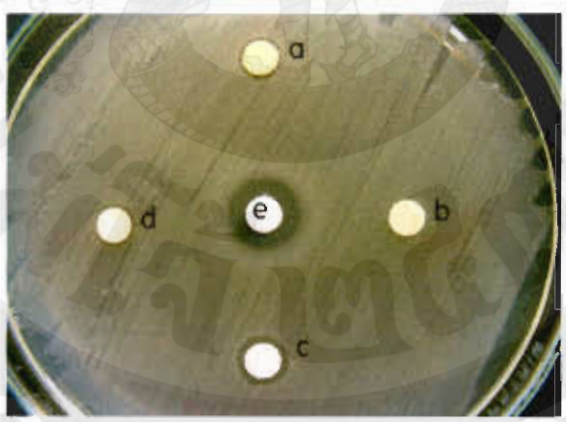
ตารางที่ 2 บริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบในเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* และ *S.suis*

ชนิดสารสกัดหยาบ	**ขนาดของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)**			
		Streptococcus suis		
	Echerichai coli	isolate 4.5	Isolate 7.2	Isolate 15.2
methanol	8.43±0.19	8.87±0.86[a]	9.61±0.41[b]	10.68±0.94[b]
ampicillin	13.01±0.24	25.78±1.66	31.75±0.86	30.41±1.58
ethyl acetate	8.20±0.67	7.95±1.08[b]	6.71±0.26[c]	9.20±0.54[b]
ampicillin	12.53±0.82	26.12±0.90	30.39±0.22	34.81±0.91
chloroform	8.26±0.54	9.38±0.27[a]	11.28±0.22[a]	12.27±1.01[a]
ampicillin	13.39±1.44	16.62±0.39	31.33±0.53	25.11±1.41

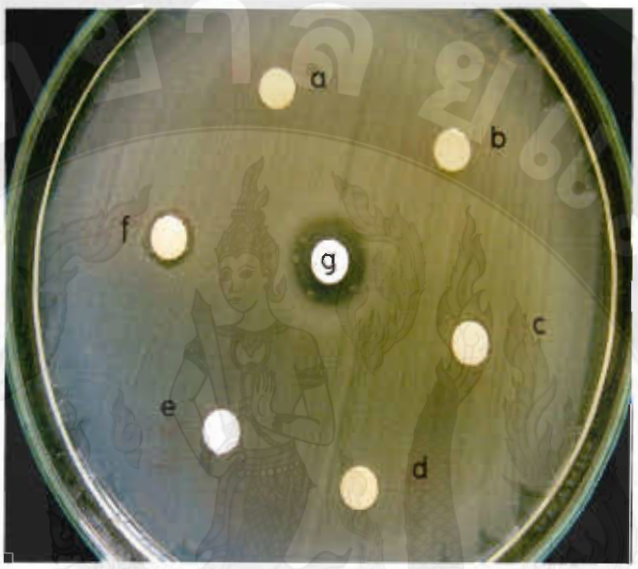
mean ± SD, n = 3, LSD 0.05



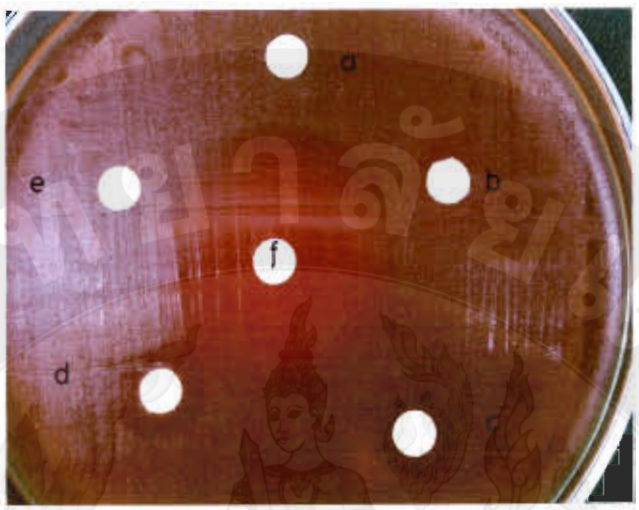
ภาพที่ 3 Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *E.coli* ของสารสกัดหยาบเมทธานอลละลายใน DMSO ความเข้มข้น a=40%,b=60%,c=80%,d=100%DMSO, e=negative cantrol DMSO, f= ampicillin (100 µg/ml)



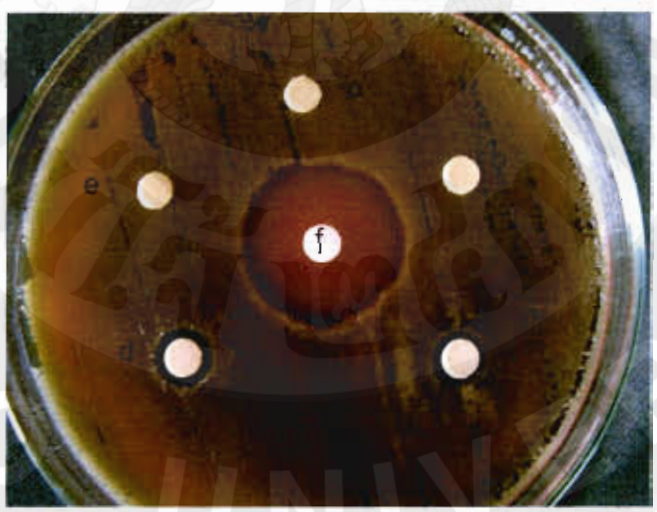
ภาพที่ 4 Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *E.coli* ของสารสกัดหยาบเอทธิล อะซีเตต ละลายใน DMSO ความเข้มข้น a=60%, b=80%, c=100% DMSO, d=negative control DMSO, e= ampicillin (100 µg/ml)



ภาพที่ 5 Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *E.coli* ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มละลายใน a=chloroform, b=negative chloroform, c=60%DMSO, d=80%DMSO, e= control DMSO, f= 100% DMSO, g= ampicillin (100 μg/ml)



ภาพที่ 6 Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 15.2 ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มละลายใน DMSO ความเข้มข้น a=40%, b=60%,c=80%, d=100%, e= negative control DMSO, f= ampicillin (100 μg/ml)



ภาพที่ 7 Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 7.2 ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มละลายด้วย DMSO ความเข้มข้น a=40%,b=60%, c=80%,d=100%, e= negative control DMSO, f= ampicillin (100 μg/ml)

ภาพที่ 8 Disc diffusion assay ทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 4.5 ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มละลายใน a=chloroform, b=negative control chloroform, c= 60%DMSO d=80% DMSO, e= 100% DMSO, f= ampicillin(100 µg/ml)

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด ต่อเชื้อ *E.coli* มีขนาดเล็กกว่าในเชื้อ *S.suis* อย่างชัดเจน แสดงว่าสารสกัดที่ได้นี้มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S.suis* ได้ดีกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างโครงสร้างและส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกันเชื้อ *E.coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบโครงสร้างผนังเซลล์มีองค์ประกอบของ phospholipids (Arias et al, 2004) ทำให้ *E.coli* ค่อนข้างทนต่อสภาวะที่ไม่มีความเหมาะสมต่อการเจริญได้ดีกว่าเชื้อ *S.suis*

เมื่อเปรียบเทียบขนาด inhibition zone ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ต่อเชื้อ *S.suis* พบว่าสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มทำให้เกิดขอบเขตของ inhibition zone กว้างที่สุดในทุกๆ ไอโซเลต รองลงมาคือสารสกัดหยาบเมทธานอล ผลของการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Hirasawa และคณะ 1998 พบว่าสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมากกว่าสารสกัดหยาบที่ใช้เอทธิลอะซีเตตและน้ำสกัด องค์ประกอบหลักของสารสกัดหยาบอาจเป็นสาร lenthionine (Morita and Kobayashi,1967) หรือสาร lentinan (Chihara et al, 1970) ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าพบสารทั้ง 2 ชนิดนี้ใน *L.edodes* ซึ่งมีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อก่อโรคในคน สัตว์เลี้ยงและเชื้อที่ปนเปื้อนในอาหาร ปริมาณสารสำคัญขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ (Ishikawa,2001) สภาวะที่เพาะเลี้ยง (Hassegawa,2005) นอกจากนี้วิธีการสกัดก็มีผลต่อปริมาณหรือชนิดของสารสำคัญนี้ ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองเปรียบเทียบสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด ต่อการเกิดบริเวณยับยั้งในแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกัน เป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่ได้เป็นละชนิดกัน แต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แสดงความมีขั้วที่แตกต่างกัน ดังนั้นควรมีการศึกษาชนิดของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มที่ให้บริเวณยับยั้งกว้างที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นสารที่มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

3. การทดสอบหาค่า Minimum Inhibition Concentration และ ค่า Minimum Bactericidal Concentration

จากการนำสารกัดหยาบคลอโรฟอร์มมาหาค่า MIC หรือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบพบว่าในเชื้อ *E. coli* มีค่าเท่ากับ 12.5 มก./มล. ส่วนใน *S.suis* ไอโวเลต 4.5, 7.2 และ 15.2 มีค่า MIC เท่ากับ 12.5, 25 และ 12.5 มก./มล. ตามลำดับ ส่วนค่า MBC หรือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ พบว่าในเชื้อ *E. coli* ไม่สามารถตรวจพบค่า MBC ในระดับความเข้มข้นที่ทดสอบได้ ส่วนเชื้อ *S.suis* ไอโซเลต 4.5, 7.2 และ 15.2 เท่ากับ 50, 25 และ 25 มก./มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

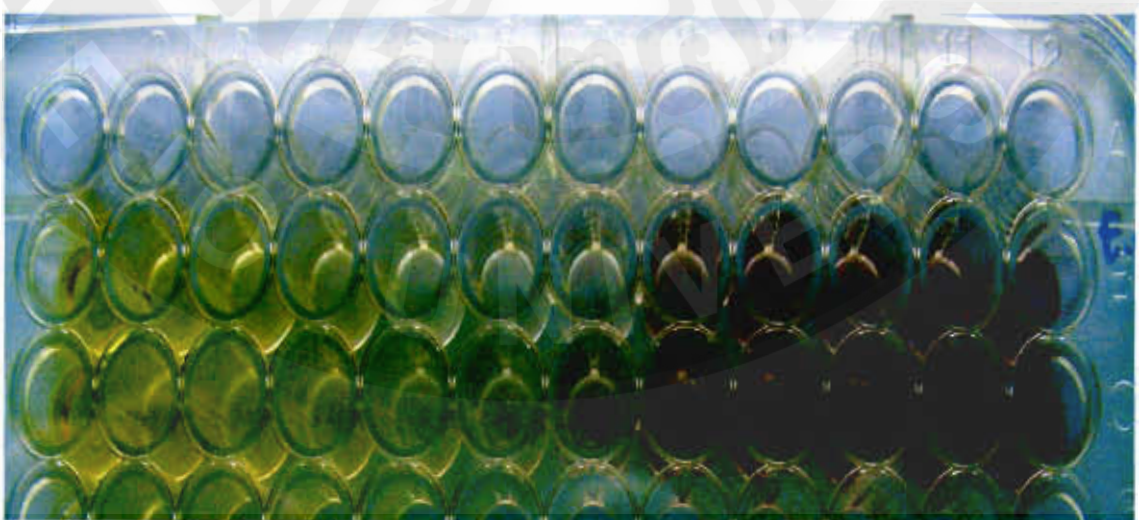
ตารางที่ 3 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มทดสอบกับเชื้อ *E.coli* และ *S. suis*

Bacterial tested	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
E.coli	6.25	ND
S.suis isolate 4.5	12.5	50
S.suis isolate 7.2	25	25
S.suis isolate 15.2	12.5	25

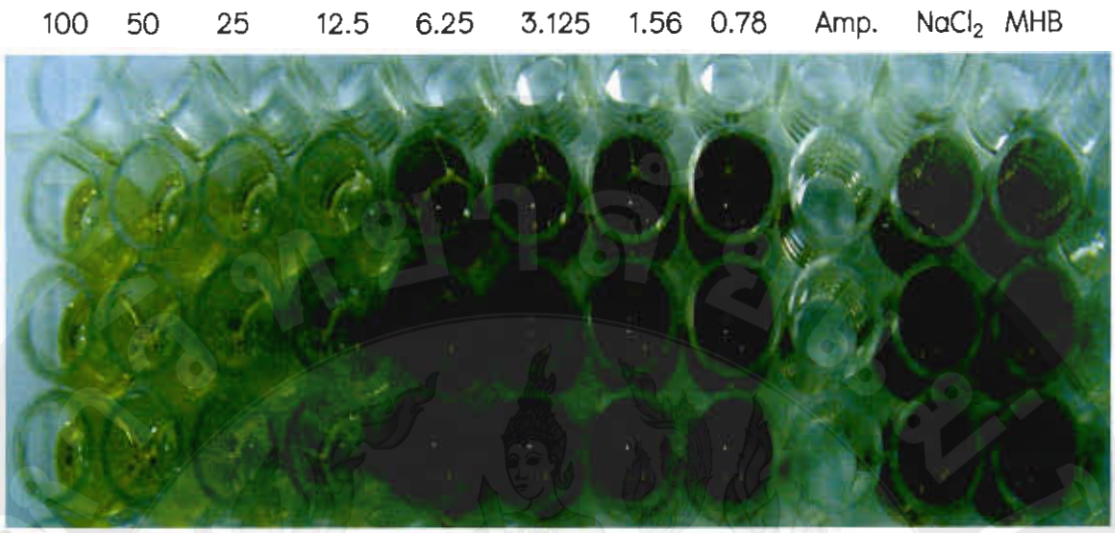
ND = not detected

สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มที่ระดับความเข้มข้น 12.5 – 25 มก./มล. มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* และเชื้อ *S.suis* จำนวน 3 ไอโซเลต แต่ต้องเพิ่มปริมาณความเข้มข้นขึ้นอีกประมาณอย่างน้อยอีกหนึ่งเท่าจึงจะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ ยกเว้นเชื้อ *E.coli* ที่คาดว่าอาจจะต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมากกว่า 100 มก./มล. จึงจะสามารถฆ่าเชื้อ *E.coli* ได้ ผลจากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E.coli* ค่อนข้างมีความทนต่อสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มได้ดีกว่าเชื้อ *S.suis* ถึงแม้ว่าที่ระดับความเข้มข้น 12.5 มก./มล. จะสามารถต้านการเจริญของเชื้อได้ แต่เมื่อนำมาทดสอบค่า MBC พบว่าสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 100 มก./มล. ซึ่งเป็นระดับสูงที่สุดที่ทดสอบก็ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *E.coli* ผลการทดลองนี้คล้ายกับ กฤตยาและคณะ (2549) ได้รายงานว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเทศไม่สามารถฆ่าเชื้อ *E.coli* ได้แต่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *S.suis*

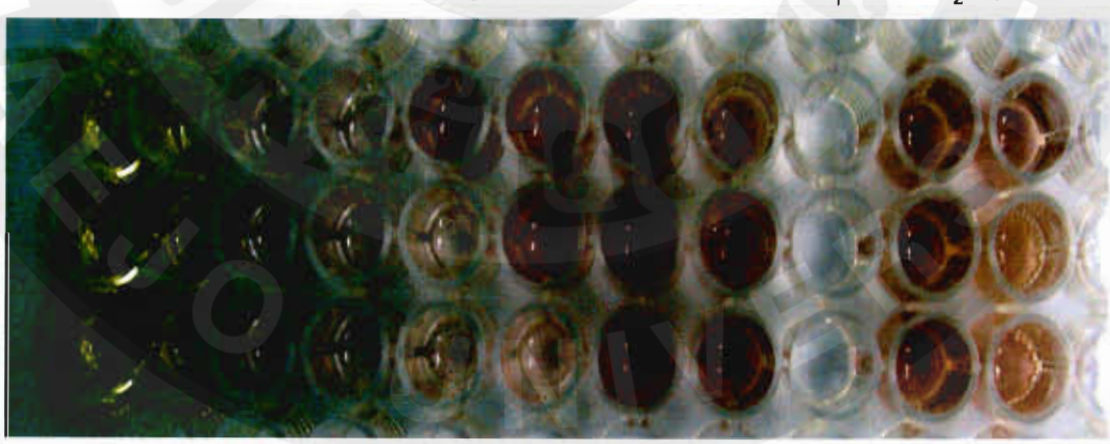
100 50 25 12.5 6.25 3.125 1.56 0.78 $NaCl_2$ $NaCl_2$ MHB MHB



ภาพที่ 9 การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มความเข้มข้น 100-0.78 มก./มล. ทดสอบกับเชื้อ *E.coli* ด้วยวิธี colorimetric micro-dilution technique

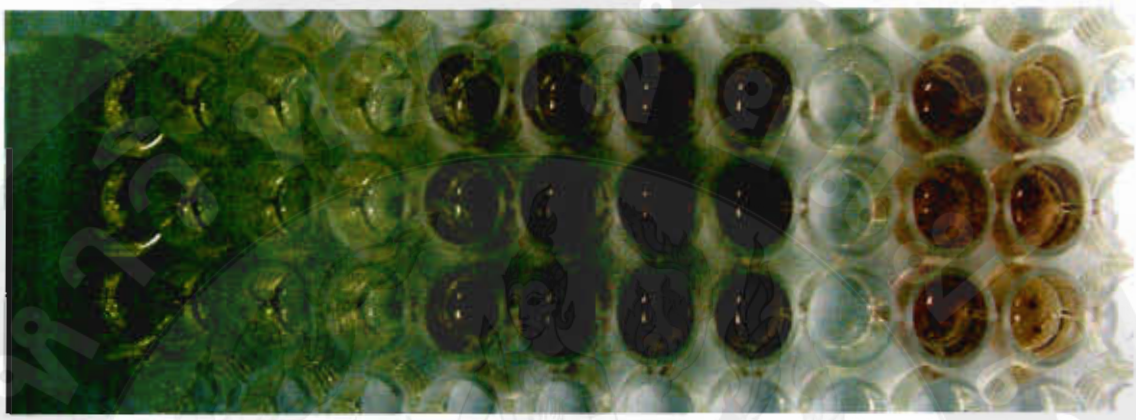


ภาพที่ 10 การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มความเข้มข้น 100-0.78 มก./มล. ทดสอบกับเชื้อ *S. suis* isolate 4.5 ด้วยวิธี colorimetric micro-dilution technique



ภาพที่ 11 การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มความเข้มข้น 100-0.78 มก./มล. ทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 7.2 ด้วยวิธี colorimetric micro-dilution technique

100 50 25 12.5 6.25 3.125 1.56 0.78 Amp. $NaCl_2$ MHB



ภาพที่ 12 การทดสอบหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มความเข้มข้น 100-0.78 มก./มล. ทดสอบกับเชื้อ *S.suis* isolate 15.2 ด้วยวิธี colorimetric micro-dilution technique

สรุปผลการวิจัย

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลว 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 YEM+1% รำข้าว สูตรที่ 2 YEM+1% กากน้ำตาล และสูตรที่ 3 YEM+1% ขี้เลื่อย พบว่าอาหารสูตร YEM+1%รำข้าว ให้ผลผลิตเส้นใยแห้งสูงที่สุดเท่ากับ 4.27 มก./มล. รองลงมาคือสูตร YEM+1% กากน้ำตาล และ YEM+1% ขี้เลื่อย ให้ผลผลิตเส้นใยเท่ากับ 3.65, 2.78 มก./มล. ตามลำดับ นำเส้นใยมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทธานอล เอธิล อะซีเตต และคลอโรฟอร์ม ได้เป็นสารสกัดหยาบแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E.coli* และ *S.suis* ด้วยวิธี disc diffusion assay พบว่า สารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดสามารถทำให้เกิดบริเวณยับยั้งในเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด โดยเชื้อ *E.coli* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดเท่ากับ 8.43±0.19 มม. ขนาดของบริเวณยับยั้งของสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S.suis* พบว่าสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกว้างมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบเมทธานอลและเอทธิล อะซีเตต ขนาดกว้างที่สุดพบในไอโซเลต 15.2 มีขนาดเท่ากับ 12.27±1.01 มม. ค่า MIC ของสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มทดสอบกับเชื้อ *E.coli* เท่ากับ 6.25 มก./มล. และไม่พบค่า MBC ในระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ เชื้อ *S.suis* มีค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 12.5-25 มก./มล.และ 25-50 มก./มล. ตามลำดับ

บรรณานุกรม

กฤตยา โทนหงษา คีราภัค เที่ยงภักดี นิรันดร์ เอกศิริและ กชกร ดิเรกศิลป์. 2549. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่สำคัญในสุกรของสารสกัดน้ำจากใบชุดเห็ดเทศ. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 32. โรงแรมแอมบาสเดอร์ 1-3 พฤศจิกายน 2549. หน้า 99-105.

Arias, M.E., J.D. Gomez, N.M. Cudmani, M.A. Vattuone and M.I. Isla. 2004. Antibacterial activity of ethanolic and aqoues extracts of Acacia aroma Gill. Ex Hook et Arn. Life sci. 75: 191-202.

Chihara, G., J. Hamuro, Y.Maeda, Y.arai and F. Fukuoka. 1970. Fraction ond Purification of the polysaccharides with marked antitumor activity especially Lentinan from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). Cancer Res. 30: 27776-27781.

Eloff, J.N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica. 64(8): 711-713.

Fasidi, I.O. and M. Kadiri. 1993. Use of Agricultural waste for the cultivation of *Lentinus subnudus* in Nigeria. Revista Biol Trop. 41: 411-415.

Hassegawa, R.H., M.C.M. Kasuya and M.C.D. Vanetti. 2005. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. Journal of Biotechnology. 8(2): 212-217.

Hirasawa, M., N. Shouji, T. Neta, K. Fukushima and K. Takada. 1999. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). International Journal of Antimicrobial Agents. 11: 151-157.

Ishikawa, N.K., M.C.M. Kasuya, and M.C. D. Venetti. 2001. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. Brazilian Journal of Microbiology. 32: 206-210.

Jong, S.C. and J.M. Birmingham. 1993. Medicinal and therapeutic value of the Shiitake mushroom. Adv Appl Microbiol. 39: 153-184.

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Kapoor, S., P.K. Khanna and P. Katyal. 2009. Effect of supplementation of Wheat straw on Growth and Linocellulolytic Enzyme Potential of *Lentinus edodes*. World Journal of Agricultural Sciences. 5(3): 328-331.

Komemushi, S., Y. Yamamoto and T.T. Fujita. 1996. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinus edodes*. Journal of Antibacterial and Antifungal Agents. 24(1): 21-25.

Lelik, L., G. Vitanyi, J. Lefler, J. Hegoczky, M. Nagy-Gasztony and G. Vereczkey. 1997. Production of the mycelium of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom and investigation of its compounds. Acta Aliment Hung. 26: 271-277.

Maeda, Y.Y., S. Takahama and H. Yonekawa. 1998. Faur dominant loci for the vascular responses by the antitumor polysaccharide, lentinan. Immunogenetics. 47(2): 159-165.

Morita, K. and S. Kobayashi. 1967. Isolation, Structure, and synthesis of lenthionine and its analags. Chem Pharma Bull. 15: 988-993.

NCCLS Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eight Informational Supplement. NCCLS document M100-S9. NCCLS, Wayne, PA 1999.

Petre, M. and A. Teodorescu. 2009. Biotechnology for in vitro growing of edible and medicinal mushraom on wood waste. Ann. For. Res. 52: 129-136.

Tochikura, T.S., H. Nakashima, Y. Ohashi and N. Yamamoto. 1988. Inhibition (in vitro) of replicatian and af the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. Med Micrabiol Immunol. 177: 235-244.