

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ในทะเลในประเทศไทย
(Bioactive Compounds from Marine Microorganisms in Thailand)

โดย ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาส
เมษายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ในทะเลในประเทศไทย
(Bioactive Compounds from Marine Microorganisms in Thailand)

คณะผู้วิจัย

- ดร.อัศวิน ภาณุอนิโภาส
- รศ.ดร.พูนสุข ประเสริฐธรรม

สังกัด

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาถึงวิธีการได้มาซึ่งจุลินทรีย์จากทะเลที่มีความสามารถในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยในระยะแรกจะอาศัยการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคหรือที่เกี่ยวข้อง จากการวิจัยพบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียในกลุ่มต่างๆจากตัวอย่างในทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทย อาทิเช่น สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง พืชทะเล ตะกอนดิน ฟิล์มชีวภาพ และน้ำทะเล จากบริเวณภาคใต้ฝั่งตะวันตกในจังหวัด ตรัง กระบี่ พังงา ภูเก็ต และ สตูล และภาคใต้ฝั่งตะวันออกในเขตจังหวัด ชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลาและ ปัตตานี ได้ประมาณ 400 isolates โดยแบ่งออกเป็นแบคทีเรียทั่วไป ร้อยละ 76.1 แบคทีเรียแอคทีโนไมซีต ร้อยละ 12.5 และ แบคทีเรียกลุ่ม gliding ร้อยละ 11.4

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แก่ *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella sonei* โดยอาศัยวิธี Colorimetric microdilution broth assay ที่มี Alamar Blue เป็นอินดิเคเตอร์พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียแต่ละกลุ่มจะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันไป โดยที่ชนิดและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ได้ หากจำแนกตามประเภทของสารสกัดพบว่าประมาณร้อยละ 10 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียในทะเลทั่วไปและแบคทีเรียกลุ่ม gliding สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ ในขณะที่ร้อยละ 30 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียแอคทีโนไมซีตสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มเดียวกันนี้

Abstract

This research was focused on the isolation of marine microorganisms in Southern Thailand seas which can produce bioactive compounds i.e. antimicrobial compounds. Microorganisms obtained in this research were isolated from various specimens i.e. marine invertebrates, plants, sediment, biofilm and seawater collected from marine environments in different places and locations throughout the southern part of Thailand. We obtained over 400 of isolates including bacteria (76.1 %), actinomycetes (12.5%) and gliding bacteria (11.4%).

The crude extracts obtained from cultivation of marine bacterial isolates in various media were tested for antimicrobial activities against *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Salmonella sonei* using a colorimetric microdilution broth assay with AlamarBlue as an indicator. It was found that 10 percent of bacterial and gliding bacterial extract were active against tested microorganisms whereas 30 percent of actinomycetes extracts was active against the same tested microorganisms.

โครงการโดยสรุป (Executive Summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ผลิตภัณฑ์ยาโรคและสารเคมีในอุตสาหกรรมเกษตรหลายชนิดได้พัฒนามาจากสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกมาจากจุลินทรีย์ที่พบในดินเป็นส่วนใหญ่ ปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาสืบเนื่องจากการลดลงของจำนวนสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งดังกล่าว ในขณะที่ความต้องการยาโรคชนิดใหม่เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค และความต้องการสารหรือผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่แตกต่างไปจากสารที่แยกได้จากจุลินทรีย์ในดินนั้นมีความสำคัญมากขึ้นเป็นลำดับ ดังนั้นการแสวงหาแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทะเลมีความสามารถในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับจุลินทรีย์ที่พบในดิน และข้อมูลเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทะเลนั้นมีจำกัด โครงการวิจัยนี้มุ่งที่จะเน้นศึกษาถึงการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากทะเลโดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งมีอาณาเขตติดต่อกับทะเลมากเป็นที่สุดในประเทศ แต่ยังขาดการสำรวจศักยภาพและความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีชีวภาพ ผลของการวิจัยนี้คาดว่าจะนำไปสู่การศึกษาเกี่ยวกับชนิด ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในทะเลซึ่งจะมีผลต่อการสร้างฐานความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลของประเทศต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

1. แยกและจัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย
2. พัฒนาการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค
3. คัดเลือกจุลินทรีย์จากทะเลที่มีความสามารถในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค

3. ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 การแยกจุลินทรีย์จากทะเล

ขั้นตอน

- การเก็บตัวอย่างจากทะเล
- การแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างในทะเล
- การจัดจำแนกและจัดเก็บสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเล

วิธีการ

3.1.1 การเก็บตัวอย่างจากทะเล

ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตจากทะเล อาทิเช่น ฟองน้ำ ปะการัง, สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ อย่าวะของสัตว์ทะเลที่มีกระดูกสันหลัง เช่น เหงือก คิวหนิง และเยื่อหุ้ม ลำไส้และระบบทางเดินอาหารของปลา พืชทะเลรวมทั้งสิ่งที่ไม่มีชีวิตอื่นๆ ในทะเล เช่น ตะกอนดิน น้ำทะเล เศษซากพืชและซากสัตว์น้ำที่ปรากฏในทะเล เป็นต้น ตัวอย่างบางชนิดเช่น สัตว์หรือพืชทะเลอาจต้องอาศัยการดำน้ำ ในกรณีที่ตัวอย่างนั้นเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีคุณค่าทางนิเวศวิทยา อาทิเช่น ฟองน้ำ ปะการัง หรือสัตว์ทะเลอื่น การเก็บตัวอย่างจะกระทำโดยวิธีที่ก่อให้เกิด

ผลกระทบคือสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ และระบบนิเวศน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ และเนื่องจากการเก็บตัวอย่างเพื่อแยกจุลินทรีย์ ปริมาณของตัวอย่างที่ต้องการจะค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาในด้านอื่นๆ ตัวอย่างที่เก็บได้จะมีการจัดจำแนกตามชนิดและสถานที่ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิค่าเพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอก จนกว่าจะทำการแยกจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่อไป สถานที่ในการเก็บตัวอย่างจะอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลและเกาะต่างๆ ในภาคใต้ทั้งฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

3.1.2 การแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างในทะเล

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการแยกจุลินทรีย์จากทะเลจะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารอาหารต่ำ (low nutrient media) และมีองค์ประกอบของอาหารที่มาจากทะเล อาทิเช่น สาหร่ายทะเล กระดองสัตว์ทะเล บดหยาบ และน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบหลักเพื่อจำลองชนิดและปริมาณสารอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติในทะเลให้มากที่สุด

ตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติจะผ่านการล้างด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรองเพื่อลดปริมาณของจุลินทรีย์ที่ปะปนอยู่ในน้ำทะเลที่เก็บรักษาตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงแยกจุลินทรีย์โดยวางตัวอย่างประมาณ 3-4 ตัวอย่างต่อ 1 จานเพาะเชื้อ (direct plating technique) บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C จนสามารถสังเกตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์รอบๆ ตัวอย่าง แยกจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการถ่ายเชื้อสู่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ (subculture technique) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในหลอดทดลอง (agar slant) โดยวิธีปราศจากเชื้อ

3.1.3 การจัดจำแนกและจัดเก็บสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเล

ประเภทของจุลินทรีย์ที่จัดจำแนกในโครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

- แบคทีเรีย
- ยีสต์ และรา
- Actinomycetes

การเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้จะแตกต่างกันไปตามประเภทของจุลินทรีย์ ในกรณีของแบคทีเรีย เชื้อบริสุทธิ์จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำทะเลเป็นหลักจนกระทั่งสามารถสังเกตการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวได้ด้วยตาเปล่า ถ่ายเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตรลงในหลอดเก็บรักษาเชื้อที่มีสารละลายกลีเซอรอลในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายกลีเซอรอลและเชื้อจุลินทรีย์เข้ากันดี ก่อนนำไปเก็บรักษาโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C ในกรณีของเชื้อราและ actinomycetes ส่วนที่นำมาเก็บรักษานำมาจากสายใยของเชื้อ (mycelium) โดยคัดเลือกเฉพาะส่วนที่อยู่ขอบของโคโลนีซึ่งมีอัตราการเจริญสูง มาเก็บในสารละลาย 50% กลีเซอรอลในหลอดเก็บรักษาเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งเช่นเดียวกับแบคทีเรีย

ระยะเวลา

ขั้นตอนการแยกจุลินทรีย์จากทะเลนี้จะใช้ระยะเวลา 3-4 เดือนโดยประมาณ

3.2 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในโครงการนี้จะมุ่งเน้นที่วิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคทั้งชนิดที่เป็นแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

ขั้นตอนและวิธีการ

การตรวจสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะอาศัยวิธีการ Colorimetric Microdilution Broth Assay ซึ่งจะอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในกรณีที่มีการเจริญของเชื้อเนื่องจากปฏิกิริยารีดักชันที่เกิดขึ้นจากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ โดยการทดสอบจะกระทำในงานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม ซึ่งสามารถทดสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากในเวลาเดียวกัน วิธีการดังกล่าวนี้จะใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย (< 1 มิลลิกรัม) ซึ่งเหมาะสมกับการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่มาจากจุลินทรีย์ทำให้สามารถลดขั้นตอนและปริมาณงานในการคัดกรองสาร อันจะนำไปสู่การปรับปรุงประสิทธิภาพและโอกาสในการค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพให้เพิ่มมากขึ้น

ชนิดของจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces* sp., *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* และ *Aspergillus fumigatus* เป็นต้น

วิธีการวัดผลในวิธี Colorimetric Microdilution Broth Assay จะกระทำโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue อินดิเคเตอร์ ในกรณีที่ไม่มีมีการเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นแดง แสดงถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบโดยสารสกัด หากมีการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์จากน้ำเงินเป็นแดง แสดงว่าสารสกัดนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ ในกรณีที่มีเครื่อง microplate reader ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วงของความยาวคลื่น 500-650 nm ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจะสามารถรายงานได้ในรูปของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent of inhibition) ซึ่งจะคำนวณได้จากสมการที่เกี่ยวข้อง

$$\% \text{ การยับยั้งการเจริญ} = 100 - \left[\frac{\text{Cred Test Well}}{\text{Cox Negative Control Well}} \times 100 \right]$$

เมื่อ Cred = ความเข้มข้นของ Alamar Blue อินดิเคเตอร์ในรูปของ reduced form

Cox = ความเข้มข้นของ Alamar Blue อินดิเคเตอร์ในรูป oxidized form

นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์โดยสารสกัดที่ทดสอบด้วยวิธีการ Colorimetric microdilution broth assay ยังสามารถที่จะรายงานได้ในรูปแบบของ ค่า MIC (minimum inhibitory concentration) ซึ่งจะเป็นค่านี้ที่ใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่ทดสอบ

ระยะเวลา

ขั้นตอนการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคจะใช้เวลาประมาณ 2 เดือน

3.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์จากทะเลมีความสามารถในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

- ขั้นตอน**
- การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ
 - การสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ
 - การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากจุลินทรีย์

วิธีการ

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ

การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เก็บรักษาโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบหลัก (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) จนเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญอย่างสังเกตได้ชัดเจน ทั้งนี้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นหัวเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดและอัตราการเจริญของจุลินทรีย์

การเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเหลวลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตร อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีองค์ประกอบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการเลี้ยง โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะประกอบด้วย น้ำทะเลเป็นองค์ประกอบหลักและมีสารอาหารชนิดอื่นในปริมาณต่ำ อาทิเช่น สาหร่ายทะเล เปลือกหอยหรือกระดูกสัตว์ทะเล อาทิเช่น กุ้ง ปู ปลาป่น และสารอาหารอื่นๆที่จำเป็น เช่น ยีสต์สกัด หรือ peptone เป็นต้น ในกรณีของแบคทีเรีย และ actinomycetes สภาพในการเลี้ยงเชื้อจะต้องมีการให้อากาศโดยใช้เครื่องเขย่า (shaker) สำหรับกรณีของการเลี้ยงเชื้อเราจะทำการเลี้ยงในสภาวะปกติที่ไม่มีการเขย่าให้อากาศ (static) ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจะขึ้นอยู่กับชนิดและอัตราการเจริญของเชื้อ โดยทั่วไปแล้วจะใช้เวลา 1-2 สัปดาห์ สำหรับแบคทีเรีย และ 3-4 สัปดาห์ สำหรับเชื้อรา

การสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ของจุลินทรีย์ ได้แก่ ethylacetate, dichloromethane และ methanol ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพขั้ว (polarity) ของสารที่ต้องการสกัด หลังจากการสกัดด้วยตัวทำละลายแล้ว ส่วนของสารผสม (mixture) ที่เป็นเซลล์ของจุลินทรีย์ และส่วนของน้ำที่มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกแยกออกโดยการกรองและกรวยแยก (separatory funnel) ตามลำดับ

ส่วนของตัวทำละลายที่มีสารสกัดอยู่จะถูกนำไประเหยตัวทำละลายออกไปโดยใช้เครื่องทำระเหยชนิดสุญญากาศ (rotary evaporator) สารสกัดที่ได้จะนำมาทำให้ละลายใหม่ในความเข้มข้น 25.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย สารตัวอย่างที่สกัดได้จะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากจุลินทรีย์

สารตัวอย่างที่สกัดได้ในรูปของสารละลายที่มี DMSO เป็นตัวทำละลายจะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อาทิเช่น *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Candida albicans* และ *Aspergillus fumigatus* ในการทดสอบ

ขั้นตอน

- การทดสอบในระดับ Primary Screening
- การทดสอบในระดับ Secondary Screening

วิธีการ

การทดสอบในระดับ Primary Screening

ขั้นตอนนี้จะวัดคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยใช้สารสกัดจากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธีการ Colorimetric Microdilution Broth Assay ในจานเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุม ซึ่งจะทำให้สามารถทดสอบตัวอย่างได้มากถึง 96 ตัวอย่างต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ สารสกัดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบขั้นนี้ จะถูกนำมาทดสอบต่อไปในขั้นตอนของ Secondary Screening

การทดสอบในระดับ Secondary Screening

ในขั้นตอนนี้สารสกัดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในการทดสอบจะถูกนำมาทดสอบซ้ำ โดยวิธีการ Colorimetric microdilution broth assay เช่นเดียวกับวิธีการในขั้นตอนของ Primary Screening แต่จะใช้วิธีการในการเจือจางสารสกัดลงตามลำดับ (serial dilution) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดแต่ละตัวอย่างในจานเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุม โดยจะสามารถทดสอบสารสกัดได้ถึง 10 ตัวอย่างต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ และจากค่า MIC ของสารสกัดแต่ละตัวอย่างจะบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ และสามารถนำค่าดังกล่าวมาจัดลำดับความสำคัญของสารสกัดเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวในขั้นต่อไป

ระยะเวลา

ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลในระดับห้องปฏิบัติการและสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจะใช้เวลาประมาณ 8-10 เดือน สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน

4.แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

เดือนที่ 1-6 (พ.ค.-ค.ค. 2545)

- แยกและจำแนกจุลินทรีย์จากทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย
- พัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค
- การคัดเลือกจุลินทรีย์จากทะเลที่มีความสามารถในการสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค

เนื้อหางานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างจากทะเล

ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตจากทะเลอาทิเช่น ฟองน้ำ ปะการัง, สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ อยัวะของ สัตว์ทะเลที่มีกระดูกสันหลัง เช่น เหยือก ผิวน้ำ และเยื่อหุ้ม ถ้าได้และระบบทางเดินอาหารของปลา พืชทะเล รวมทั้งสิ่งที่ไม่มีชีวิตอื่นๆ ในทะเล เช่น ตะกอนดิน น้ำทะเล เศษจากพืช ซากสัตว์น้ำที่ปรากฏในทะเลเป็นต้น ตัวอย่างบางชนิดเช่น สัตว์หรือพืชทะเลอาจต้องอาศัยการดำน้ำ ในกรณีที่ตัวอย่างนั้นเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีคุณค่าทาง นิเวศวิทยา อาทิเช่น ฟองน้ำ ปะการัง หรือสัตว์ทะเลอื่น การเก็บตัวอย่างจะกระทำโดยวิธีที่ก่อให้เกิดผลกระทบ ค่อนข้างมีขีดจำกัดนั้นๆ และระบบนิเวศน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ และเนื่องจากการเก็บตัวอย่างเพื่อแยก จุลินทรีย์ ปริมาณของตัวอย่างที่ต้องการจะค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาในด้านอื่นตัวอย่าง ที่เก็บได้จะมีการจัดจำแนกตามชนิดและสถานที่ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ ภายนอก จนกว่าจะทำการแยกจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่อไป สถานที่ในการเก็บตัวอย่างจะอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเล และเกาะต่างๆ ในภาคใต้ทั้งฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน

1.1 การแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างในทะเล

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการแยกจุลินทรีย์จากทะเลจะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารอาหารต่ำ (low nutrient media) และมีองค์ประกอบของอาหารที่มาจากทะเล อาทิเช่น สาหร่ายทะเล กระดองสัตว์ทะเลบดหยาบ และน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบหลักเพื่อจำลองชนิดและปริมาณสารอาหารเลี้ยงเชื้อให้ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติ ในทะเลให้มากที่สุด ตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติจะผ่านการล้างด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีการกรองเพื่อ ลดปริมาณของจุลินทรีย์ที่ปะปนอยู่ในน้ำทะเลที่เก็บรักษาดังกล่าว หลังจากนั้นจึงแยกจุลินทรีย์โดยวางตัวอย่าง ประมาณ 3-4 ตัวอย่างต่อ 1 จานเพาะเชื้อ (direct plating technique) บ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C จนสามารถ สังเกตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์รอบตัวอย่าง แยกจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีการถ่ายเชื้อ สู่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ (subculture technique) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในหลอดทดลอง (agar slant) โดยวิธี การปราศจากเชื้อ

การจัดจำแนกและจัดเก็บสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเล

ประเภทของจุลินทรีย์ที่จัดจำแนกในโครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

- แบคทีเรีย
- ยีสต์ และรา
- Actinomycetes

การเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แยกได้จะแตกต่างกันไปตามประเภทของจุลินทรีย์ในกรณีของแบคทีเรียเชื้อ บริสุทธิ์ จะนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำทะเลเป็นหลักจนกระทั่งสามารถสังเกตการเจริญของ เชื้อในอาหารเหลวได้ด้วยตาเปล่า ถ่ายเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตรลงในหลอดเก็บรักษาเชื้อที่มีสารละลายกลีเซอรอล อยู่ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายกลีเซอรอลและเชื้อจุลินทรีย์เข้ากันดี ก่อนนำไปเก็บรักษาโดยการแช่ แข็งที่อุณหภูมิ -70°C ในกรณีของเชื้อราและ actinomycetes ส่วนที่นำมาเก็บรักษาจะนำมาจาก สายใยของเชื้อ (mycelium) โดยคัดเลือกเอาเฉพาะส่วนที่อยู่ขอบของโคโลนีซึ่งมีอัตราการเจริญสูง มาเก็บในสารละลาย 50% กลี เซอรอลในหลอดเก็บรักษาเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งเช่นเดียวกับแบคทีเรีย

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในโครงการนี้จะมุ่งเน้นที่วิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคทั้งชนิดที่เป็นแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

ขั้นตอนและวิธีการ

การตรวจสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะอาศัยวิธีการ Colorimetric Microdilution Broth Assay ซึ่งจะอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในกรณีที่มีการเจริญของเชื้อเนื่องจากปฏิกิริยารีดักชันที่เกิดขึ้นจากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ โดยการทดสอบจะกระทำในงานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม ซึ่งสามารถทดสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากในเวลาเดียวกัน วิธีการดังกล่าวนี้จะใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย (< 1 มิลลิกรัม) ซึ่งเหมาะสมกับการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่มาจากจุลินทรีย์ทำให้สามารถลดขั้นตอนและปริมาณงานในการคัดเลือกลำดับสาร อันจะนำไปสู่การปรับปรุงประสิทธิภาพและโอกาสในการค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพให้เพิ่มมากขึ้น

ชนิดของจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวภาพได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces* sp., *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* และ *Aspergillus fumigatus*

วิธีการวัดผลในวิธี Colorimetric Microdilution Broth Assay จะกระทำโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของ Alamar Blue อินดิเคเตอร์ ในกรณีที่ไม่มีมีการเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นแดง แสดงถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบโดยสารสกัด หากมีการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์จากน้ำเงินเป็นแดง แสดงว่าสารสกัดนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ ในกรณีที่ไม่มีเครื่อง microplate reader ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วงของความยาวคลื่น 500-650 nm ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจะสามารถรายงานได้ในรูปของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent of inhibition) ซึ่งจะคำนวณได้จากสมการที่เกี่ยวข้อง

$$\% \text{ การยับยั้งการเจริญ} = 100 - \left[\frac{\text{Cred Test Well}}{\text{Cox Negative Control Well}} \times 100 \right]$$

เมื่อ Cred = ความเข้มข้นของ Alamar Blue อินดิเคเตอร์ในรูปของ reduced form

Cox = ความเข้มข้นของ Alamar Blue อินดิเคเตอร์ในรูป oxidized form

นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์โดยสารสกัดที่ทดสอบด้วยวิธีการ Colorimetric microdilution broth assay ยังสามารถที่จะรายงานได้ในรูปแบบของ ค่า MIC (minimum inhibitory concentration) ซึ่งจะเป็นดัชนีที่ใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่ทดสอบ

3. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากทะเลมีความสามารถในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

- ขั้นตอน
- การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ
 - การสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ
 - การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากจุลินทรีย์

วิธีการ

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ

การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เก็บรักษาโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) จนเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญอย่างสังเกตได้ชัดเจน ทั้งนี้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นหัวเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดและอัตราการเจริญของจุลินทรีย์

การเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อที่เตรียมในอาหารเหลวลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตร อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจะมีองค์ประกอบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการเลี้ยง โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะประกอบด้วย น้ำทะเลเป็นองค์ประกอบหลักและมีสารอาหารชนิดอื่นในปริมาณต่ำ อาทิเช่น สาหร่ายทะเล เปลือกหอยหรือกระดูกสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง ปู ปลาป่น และสารอาหารอื่นๆที่จำเป็น เช่น ยีสต์สกัด peptone เป็นต้น ในกรณีของแบคทีเรีย และ actinomycetes สภาพในการเลี้ยงเชื้อจะต้องมีการให้อากาศโดยการใช้เครื่องเขย่า (shaker) สำหรับกรณีของการเลี้ยงเชื้อเราจะทำการเลี้ยงในสภาวะปกติที่ไม่มีการเขย่าให้อากาศ (static) ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจะขึ้นอยู่กับชนิดและอัตราการเจริญของเชื้อ โดยทั่วไปแล้วจะใช้เวลา 1-2 สัปดาห์ สำหรับแบคทีเรีย และ 3-4 สัปดาห์สำหรับเชื้อรา

การสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ของจุลินทรีย์ ได้แก่ ethylacetate, dichloromethane และ methanol ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพขั้ว (polarity) ของสารที่ต้องการสกัด ภายหลังจากการสกัดด้วยตัวทำละลายแล้ว ส่วนของสารผสม (mixture) ที่เป็นเซลล์ของจุลินทรีย์ และส่วนของน้ำที่มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกแยกออกโดยการกรองและกรวยแยก (separatory funnel) ตามลำดับ

ส่วนของตัวทำละลายที่มีสารสกัดอยู่จะถูกนำไประเหยตัวทำละลายออกไปโดยใช้เครื่องทำระเหยชนิดสูญญากาศ (rotary evaporator) สารสกัดที่ได้จะนำมาทำให้ละลายใหม่ในความเข้มข้น 25.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย สารตัวอย่างที่สกัดได้จะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากจุลินทรีย์

สารตัวอย่างที่สกัดได้ในรูปของสารละลายที่มี DMSO เป็นตัวทำละลายจะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อาทิเช่น *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Candida albicans* และ *Aspergillus fumigatus* ในการทดสอบ

ขั้นตอน

- การทดสอบในระดับ Primary Screening
- การทดสอบในระดับ Secondary Screening

วิธีการ

การทดสอบในระดับ Primary Screening

ขั้นตอนนี้จะวัดคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยใช้สารสกัดจากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลที่ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธีการ Colorimetric Microdilution Broth Assay ในจานเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุม ซึ่งจะทำให้สามารถทดสอบตัวอย่างได้มากถึง 96 ตัวอย่างต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ สารสกัดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบขั้นนี้ จะถูกนำมาทดสอบต่อไปในขั้นตอนของ Secondary Screening

การทดสอบในระดับ Secondary Screening

ในขั้นตอนนี้สารสกัดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในการทดสอบจะถูกนำมาทดสอบซ้ำ โดยวิธีการ Colorimetric microdilution broth assay เช่นเดียวกันกับวิธีการในขั้นตอนของ Primary Screening แต่จะใช้วิธีการในการเจือจางสารสกัดลงตามลำดับ (serial dilution) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดแต่ละตัวอย่างในจานเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุม โดยจะสามารถทดสอบสารสกัดได้ถึง 10 ตัวอย่างต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ และจากค่า MIC ของสารสกัดแต่ละตัวอย่างจะบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ และสามารถนำค่าดังกล่าวมาจัดลำดับความสำคัญของสารสกัดเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาคุณลักษณะทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวในขั้นต่อไป

ผลการวิจัย

1. การแยกและจำแนกจุลินทรีย์จากทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย

1.1 การแยกแบคทีเรียจากทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย

ผู้วิจัยได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งและหมู่เกาะในภาคใต้ของประเทศไทยรวมทั้งสิ้น 5 ครั้ง โดยที่จำนวนและชนิดของตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละแหล่งจะแสดงในตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่เก็บและข้อมูลในการเก็บตัวอย่างและ จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	วิธีการเก็บตัวอย่าง	ระดับความลึกที่เก็บตัวอย่าง (ฟุต)	จำนวนตัวอย่าง
เกาะเต่า และเกาะนางยวน จ.สุราษฎร์ธานี	25-28 เม.ย. 2545	อาศัยการดำน้ำ	20-70	31
ปากน้ำเทพา จ.สงขลา	8 พ.ค. 2545	เดินเก็บตัวอย่างจาก แนวชายฝั่ง	-	9
เกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี	22 พ.ค. 2545	อาศัยการดำน้ำ	50	28
เกาะโลซิน จ.ปัตตานี	15 มิ.ย. 2545	อาศัยการดำน้ำ	30-70	68
ชายฝั่งจังหวัดตรัง กระบี่ และ ภูเก็ต	8-10 ก.ค. 2545	เดินเก็บตัวอย่างจาก แนวชายฝั่ง	-	30

ตารางที่ 2 แสดงประเภทของตัวอย่างที่เก็บได้จากทะเลทั้ง 5 แหล่ง

ประเภทของตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ					รวม	ร้อยละ
	1	2	3	4	5		
ฟองน้ำ	20	-	14	38	5	77	46.4
ปะการัง	5	-	2	9	1	17	10.2
สาหร่าย	-	-	-	9	6	15	9.0
ตะกอนดิน	-	1	6	6	13	26	15.7
เปลือกหอย	4	4	2	2	2	14	8.4
ฟิล์มชีวภาพ	-	1	4	-	-	5	3.0
อื่นๆ	2	3	-	4	3	12	7.2
รวม	31	9	28	68	30	166	100.0
ร้อยละ	18.7	5.4	16.9	41.0	18.1	100.0	

หมายเหตุ แหล่งที่เก็บตัวอย่าง

- (1) เกาะเต่า และเกาะนางยวน จ.สุราษฎร์ธานี (2) ปากน้ำเทพา จ.สงขลา (3) เกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี
(4) เกาะโลซิน จ.ปัตตานี (5) ชายฝั่งจังหวัดตรัง กระบี่ และภูเก็ต

สำหรับการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างที่เก็บจากทะเลนั้นจะอาศัยวิธีการทั้งแบบ Direct plating และการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำทะเลปราศจากเชื้อก่อนนำไปเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบหลักดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียจากทะเล

อาหารเลี้ยงเชื้อ	องค์ประกอบ	
A	yeast extract	1.0 g
	peptone	1.0 g
	galactose	10.0 g
	seawater	1.0 L
	agar	15.0 g
B	yeast extract	5.0 g
	peptone	5.0 g
	seaweed meal	5.0 g
	seawater	1.0 L
	agar	15.0 g
C	NH ₄ NO ₃	0.01 g
	K ₂ HPO ₄	0.01 g
	sodium glutamate	1.0 g
	agar	13.0 g
	seawater	1.0 L
D	yeast extract	1.0 g
	peptone	5.0 g
	FeSO ₄	0.1 g
	seawater	1.0 L
	agar	15.0 g
E	yeast extract	5.0 g
	peptone	10.0 g
	mannitol	10.0 g
	seawater	1.0 L
	agar	15.0 g
F	Chitinous material (prawn shell meal)	5.0 g
	yeast extract	0.5 g
	peptone	0.5 g
	seawater	1.0 L
	cyclohexamide	0.002 g
	agar	15.0 g

หมายเหตุ การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และ 2 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A, B และ C เท่านั้นในการแยกเชื้อ
 การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ A, B, D และ E ในการแยกเชื้อ
 การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ A, D และ E ในการแยกเชื้อ
 การเก็บตัวอย่างครั้งที่ 5 ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ A, D, E และ F ในการแยกเชื้อ

โดยพบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันจะมีผลต่อจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ดังแสดงในตารางที่ 4 ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้	ร้อยละ
A	83	27.12
B	26	8.49
C	33	10.78
D	91	29.74
E	62	20.26
F	11	3.59
รวม	306	100.0

1.2 การแยกแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสจากทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย

ผู้วิจัยได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งและหมู่เกาะในภาคใต้ของประเทศไทยรวมทั้งสิ้น 5 ครั้งโดยที่จำนวนและชนิดของตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละแหล่งจะแสดงในตารางที่ 5-6

ตารางที่ 5 แสดงแหล่งที่เก็บและข้อมูลในการเก็บตัวอย่างและ จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้เพื่อแยกแบคทีเรียแอคติโนมัยซิส

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	วิธีการเก็บตัวอย่าง	ระดับความลึกที่เก็บตัวอย่าง (ฟุต)	จำนวนตัวอย่าง
เกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี	22 พ.ค. 2545	อาศัยการดำน้ำ	50	28
เกาะโลซิน จ.ปัตตานี	15 มิ.ย. 2545	อาศัยการดำน้ำ	30-70	68
ชายฝั่งจังหวัดตรัง กระบี่ และภูเก็ต	8-10 ก.ค. 2545	เดินเก็บตัวอย่างจากแนวชายฝั่ง	-	12
ชายฝั่งบริเวณปากบารา จ.สตูล	17 ธ.ค. 2545	เดินเก็บตัวอย่างจากแนวชายฝั่ง	-	10
รวม				118

ตารางที่ 6 แสดงประเภทของตัวอย่างที่เก็บได้จากทะเลทั้ง 4 แหล่งเพื่อแยกแบคทีเรียแอคติโนมัยซิส

ประเภทของ ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง						จำนวนแบคทีเรีย แอคติโนมัยซิสที่ แยกได้	ร้อยละ
	1	2	3	4	รวม	ร้อยละ		
ฟองน้ำ	14	38	-	-	52	44.1	22	44.0
ปะการัง	2	9	-	-	11	9.3	7	14.0
สาหร่าย	-	9	-	-	9	7.6	11	22.0
ตะกอนดิน	6	6	12	8	32	27.1	7	14.0
เปลือกหอย	2	2	-	2	6	5.1	3	6.0
ฟิล์มชีวภาพ	4	-	-	-	4	3.4	-	-
อื่นๆ	-	4	-	-	4	3.4	-	-
รวม	28	68	12	10	118	100.0	50	100.0
ร้อยละ	23.7	57.6	10.1	8.5	100.0			

หมายเหตุ แหล่งที่เก็บตัวอย่าง

- (1) เกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี (2) เกาะโลซิน จ.ปัตตานี (3) ชายฝั่งจังหวัดตรัง กระบี่ และภูเก็ต
(4) ชายฝั่งบริเวณปากบารา จ.สตูล

สำหรับการแยกแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสจากตัวอย่างที่เก็บจากทะเลนั้นจะอาศัยวิธีการเจือจางตัวอย่าง
ด้วยน้ำทะเลปราศจากเชื้อจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ($10^1 - 10^4$) ก่อนนำไปเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ
สูตรต่างๆที่มีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบหลักดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสจากทะเล

อาหารเลี้ยงเชื้อ	องค์ประกอบ		ใช้กับตัวอย่างจากแหล่ง
I	Soluble starch KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ Seawater Agar	10.0 g 1.0 g 1.0 g 1.0 L 15.0 g	1 และ 2
II	Peptone Ferric phosphate Seawater Agar	10.0 g 0.1 g 1.0 L 20.0 g	1,2 และ 4
III	Yeast extract Peptone Marine sediment Seawater Agar	1.0 g 1.0 g 15.0 g 1.0 L 15.0 g	1,2 และ 4
IV	Ground shrimp shell L-asparagines KH ₂ PO ₄ Seawater Agar	10.0 g 1.0 g 1.0 g 1.0 L 20.0 g	1, 2 และ 3
V	Yeast extract Peptone Ferric sulfate Ground shrimp shell Seawater Agar	1.0 g 1.0 g 0.05 g 15.0 g 1.0 L 15.0 g	3

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้	ร้อยละ
I	-	-
II	18	36
III	25	50
IV	7	14
V	-	-
รวม	50	100

1.3 การแยกแบคทีเรียกลุ่ม gliding จากทะเลในประเทศไทย

ผู้วิจัยได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งทั้งด้านอ่าวไทยและฝั่งอันดามันรวมทั้งสิ้น 3 ครั้งโดยที่จำนวนและชนิดของตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละแหล่งจะแสดงในตารางที่ 9-10

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนตัวอย่างเพื่อแยกแบคทีเรียกลุ่ม gliding จากทะเลโดยจำแนกตามแหล่งที่เก็บและประเภทของตัวอย่าง

ประเภทของ ตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ				
	แหล่งที่ 1	แหล่งที่ 2	แหล่งที่ 3	รวม	ร้อยละ
ฟิล์มชีวภาพจากหินโสโครก	4	10	14	28	13.7
ฟิล์มชีวภาพจากเปลือกหอย	4	11	-	15	7.4
ฟิล์มชีวภาพจากเศษพลาสติก	3	-	5	8	3.9
ฟิล์มชีวภาพจากแหล่งอื่นๆ	6	-	51	57	27.9
สาหร่ายทะเล	3	3	26	32	15.7
เศษไม้-ใบไม้	2	20	-	22	10.8
สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง	2	4	22	28	13.7
ทราย	5	-	-	5	2.5
ตะกอนดิน	1	2	-	3	1.5
น้ำทะเล	5	-	1	6	2.9
รวม	35	55	114	204	100
ร้อยละ	17.1	27.0	55.9	100	

หมายเหตุ แหล่งเก็บตัวอย่างที่ 1 คือแนวชายฝั่งจังหวัดชลบุรี

แหล่งเก็บตัวอย่างที่ 2 คือแนวชายฝั่งจังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี

แหล่งเก็บตัวอย่างที่ 3 คือแนวชายฝั่งจังหวัดตรัง กระบี่ และภูเก็ต

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม gliding จากทะเลที่แยกได้โดยจำแนกตามแหล่งที่เก็บและประเภทของตัวอย่าง

ประเภทของตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ				
	แหล่งที่ 1	แหล่งที่ 2	แหล่งที่ 3	รวม	ร้อยละ
ฟิล์มชีวภาพจากหินโสโครก	-	2	-	2	4.3
ฟิล์มชีวภาพจากเปลือกหอย	2	3	4	9	19.6
ฟิล์มชีวภาพจากเศษพลาสติก	-	1	-	1	2.2
ฟิล์มชีวภาพจากแหล่งอื่นๆ	4	-	1	5	10.9
สาหร่ายทะเล	3	2	8	13	28.3
เศษไม้-ใบไม้	-	2	3	5	10.9
สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง	-	1	9	10	21.6
ทราย	1	-	-	1	2.2
ตะกอนดิน	-	-	-	-	-
น้ำทะเล	-	-	-	-	-
รวม	10	11	25	46	100.0
ร้อยละ	21.7	24.0	54.3	100.0	

หมายเหตุ แหล่งเก็บตัวอย่างที่ 1 คือแนวชายฝั่งจังหวัดชลบุรี
แหล่งเก็บตัวอย่างที่ 2 คือแนวชายฝั่งจังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี
แหล่งเก็บตัวอย่างที่ 3 คือแนวชายฝั่งจังหวัดตรัง กระบี่ และภูเก็ต

จากการเก็บตัวอย่างเพื่อแยกจุลินทรีย์จากทะเลทั้งหมดพบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทย

ประเภท	จำนวน	ร้อยละ
แบคทีเรียทั่วไป	306	76.1
แบคทีเรียแอคทีโนไมซีต	50	12.5
แบคทีเรียกลุ่ม gliding	46	11.4
รวม	402	100.0

2. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

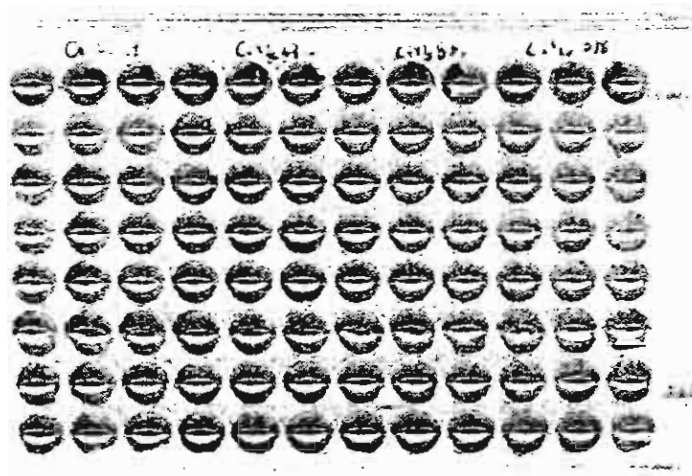
ในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* และ *Salmonella sonei* โดยเริ่มจากการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ทั้งนี้เพื่อให้สามารถสังเกตการเจริญของเชื้อและการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสารสกัดหยาบที่ทดสอบในกรณีที่สารสกัดนั้นมีคุณสมบัติดังกล่าว โดยกำหนดให้ระยะเวลาในการทดสอบอยู่ในช่วง 10-15 ชั่วโมงเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดลองศึกษาผลของ dimethyl sulfoxide ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดหยาบในการทดลองนี้ที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงผลจากการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบอันเนื่องมาจากตัวทำละลายอื่นจะส่งผลต่อการแปรผลการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของสารสกัด

สำหรับวิธีการในการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะอาศัยหลักการของการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ที่สัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของจุลินทรีย์ร่วมกับวิธีการ Microdilution broth assay ซึ่งมีข้อดีในการทดสอบคือ สามารถใช้สารสกัดในปริมาณน้อย และสามารถทดสอบตัวอย่างได้พร้อมกันหลายๆตัวอย่าง นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังสามารถประยุกต์ใช้ได้กับจุลินทรีย์แทบทุกชนิดรวมทั้งเชื้อราที่เป็นเส้นใย (filamentous fungi) การแปรผลการทดสอบก็สามารถทำได้โดยง่ายเนื่องจากสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์จากสภาวะเริ่มต้นซึ่งมีสีน้ำเงิน (oxidized form) ไปเป็นสีแดง (reduced form) ในกรณีที่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ หากสารสกัดที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ การเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ก็จะไม่เกิดขึ้น ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสารสกัดที่มีและไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้อย่างชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 1 สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแสดงในตารางที่ 11

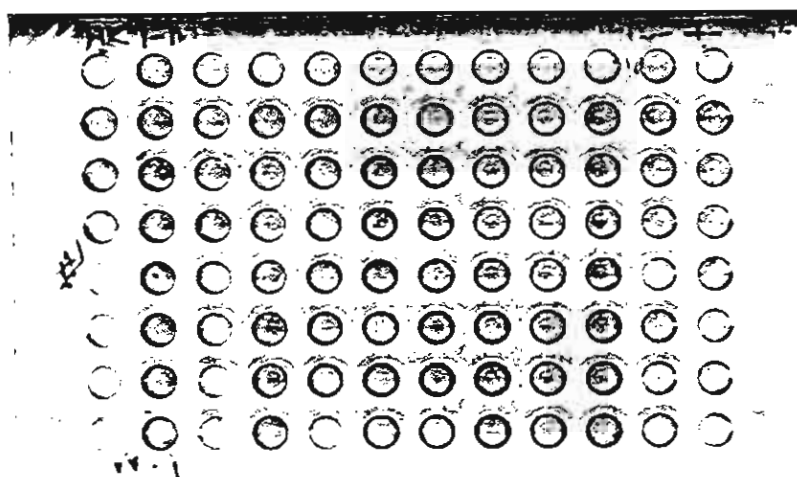
ตารางที่ 11 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

เชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เซลล์/มล.)	ระยะเวลาในการทดสอบ(ชั่วโมง)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1×10^6	24-48
<i>Candida albicans</i>	1×10^5	12-15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5×10^5	12-15
<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^5	8-10
<i>Bacillus subtilis</i>	1×10^4	8-10
<i>Streptococcus faecalis</i>	1×10^6	8-10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1×10^5	8-10
<i>Salmonella typhi</i>	1×10^5	8-10
<i>Salmonella sonei</i>	1×10^5	8-10

หมายเหตุ การบ่มเชื้อในระหว่างการทดสอบจะควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ



A



B

รูปที่ 1 แสดง 96-well plates ที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากแบคทีเรียกลุ่ม *gliding* ที่เวลาเริ่มต้น (A) และที่สิ้นสุดการทดลอง (B)

ทั้งนี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญโดยสารสกัดที่จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของสารสกัดว่าได้จากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลชนิดใด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 12 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของสารสกัด

ชนิดของสารสกัด	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ
สารสกัดจากแบคทีเรียทั่วไป	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
สารสกัดจากแอคติโนไมซีต	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella sonnei</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
สารสกัดจากแบคทีเรีย <i>gliding</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

3.การคัดเลือกจุลินทรีย์จากทะเลที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค

3.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลในอาหารเหลวเพื่อทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยได้ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลทั้ง 3 กลุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆกัน ดังแสดงในตารางที่ 13 โดยที่เชื้อที่แยกได้แต่ละตัวจะทดลองเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3-4 ชนิดที่แตกต่างกัน และมีระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันออกไปตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ หลังจากสังเกตว่ามีการเจริญของเชื้อที่สมบูรณ์แล้ว จะนำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลวมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 1:1 (สกัดซ้ำ 2 ครั้ง) หลังจากระเหยตัวทำละลายออกไป นำสารสกัดแห้งที่ได้มาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนและทำละลายกลับด้วยตัวทำละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบตามวิธีการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคต่อไป

ตารางที่ 13 แสดงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

สูตรอาหาร	องค์ประกอบ	ปริมาณ
B (สำหรับแบคทีเรียทั่วไป)	Yeast extract	5.0 g
	Peptone	5.0 g
	Seaweed meal	5.0 g
	Seawater	1.0 L
E (สำหรับแบคทีเรียทั่วไป)	Yeast extract	5.0 g
	Peptone	10.0 g
	Mannitol	10.0 g
	Seawater	1.0 L
G (สำหรับแบคทีเรียทั่วไป)	Chitinous material	10.0 g
	Fish meal	10.0 g
	Seawater	1.0 L
SMYE medium (สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม gliding)	Skim milk	5.0 g
	Yeast extract	2.0 g
	MgSO ₄	1.0 g
	Seawater	1.0 L
Na-glutamate medium (สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม gliding)	L-glutamic acid monosodium salt	1.0 g
	NH ₄ NO ₃	0.01 g
	K ₂ HPO ₄	0.01 g
	Seawater	1.0 L
Glycerol medium (สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม gliding)	Glycerol	1.0 g
	NH ₄ NO ₃	0.01 g
	K ₂ HPO ₄	0.01 g
	Seawater	1.0 L
A (สำหรับแบคทีเรียแอคคิโนมายซิส)	Sediment	0.5 g
	Seaweed	0.5 g
	Chitinous material	0.5 g
	Seawater	100 ml

สูตรอาหาร	องค์ประกอบ	ปริมาณ
B (สำหรับแบคทีเรียแอคติโนมัยซิส)	Glycerol Bacto-agar Seawater	2.0 g 1.0 g 100 ml
C (สำหรับแบคทีเรียแอคติโนมัยซิส)	Polypeptone Soluble starch Yeast extract Seawater	0.6 g 0.6 g 0.1 g 100 ml
D (สำหรับแบคทีเรียแอคติโนมัยซิส)	Peptone Yeast extract Seawater	0.5 g 0.5 g 100 ml

3.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค

3.2.1 คุณสมบัติของสารสกัดจากแบคทีเรียในทะเลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลจำนวน 201 ตัวอย่างพบว่าสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตร E, B และ C จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้ดีกว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ และสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคือ *S.aureus*, *C.albicans* และ *S.cerevisiae* ได้ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 3.5, 4.0 และ 4.5 ตามลำดับ) แต่ไม่พบสารสกัดใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aueruginosa* ที่ใช้ในการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากแบคทีเรียในทะเลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนสารสกัดที่ทดสอบ	จำนวนสารสกัดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค					
		<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.albicans</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aueruginosa</i>	รวม	ร้อยละ
B	51	2	3	2	0	7	3.5
E	49	6	4	4	0	14	7.0
G	50	1	0	1	0	2	1.0
A	30	0	0	0	0	0	0
C	16	0	1	0	0	1	0.5
D	5	0	0	0	0	0	0
รวม	201	9	8	7	0	24	12.0
ร้อยละ		4.5	4.0	3.5	0	12.0	

ตารางที่ 15 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากแบคทีเรียในทะเลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค จำแนกตามตัวอย่างสารสกัด

รหัสสารสกัด จากแบคทีเรีย	คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CNB003E	+	NSA	NSA	NSA
CNB004B	+	NSA	+	NSA
CNB005E	+	NSA	NSA	NSA
CNB006E	+	NSA	+	NSA
CNB012E	+	NSA	NSA	NSA
CNB013E	+	NSA	+	NSA
CNB013B	+	NSA	NSA	NSA
CNB013G	+	NSA	NSA	NSA
CNB015E	+	NSA	+	NSA
CNB026G	NSA	NSA	+	NSA
CNB027E	NSA	+	+	NSA
CNB028E	NSA	+	+	NSA
CNB031B	NSA	+	NSA	NSA
CNB034C	NSA	+	NSA	NSA
CNB036B	NSA	+	NSA	NSA
CNB036E	NSA	+	NSA	NSA
CNB037E	NSA	+	NSA	NSA
CNB038B	NSA	+	NSA	NSA
CNB038E	NSA	+	NSA	NSA
CNB039E	NSA	+	+	NSA

หมายเหตุ + หมายถึงมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

NSA หมายถึงไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.2.2 คุณสมบัติของสารสกัดจากแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากทะเลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จาทะเลจำนวน 212 ตัวอย่างพบว่าสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสในอาหารสูตรต่างๆกันจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันออกไปดังแสดงในตารางที่ 16 โดยที่ร้อยละ 59.4 ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นนั้นพบว่า สารสกัดจากแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus faecalis* ได้คิดเป็นร้อยละ 21.8, 28.1, 28.1 และ 20.3 ของสารสกัดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ เป็นที่น่าสังเกตว่าในการศึกษานี้ไม่มีสารสกัดใดจากแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa*

ตารางที่ 16 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากแบคทีเรียแอคทีโนไมซีสที่แยกได้จากทะเลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค

รหัสสารสกัด	คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CNA001A	NSA	+	NSA	NSA	+	NSA
CNA001B	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA001C	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA001D	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA002A	+	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA002C	NSA	NSA	NSA	NSA	+	NSA
CNA002D	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA003A	+	+	NSA	+	+	NSA
CNA003B	NSA	+	NSA	+	+	NSA
CNA003C	NSA	NSA	NSA	NSA	+	NSA
CNA003D	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA004A	+	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA004B	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA004C	+	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA004D	+	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA005A	+	+	NSA	+	+	NSA
CNA005C	+	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA005D	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA006A	+	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA007A	NSA	+	NSA	+	+	NSA
CNA007B	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA007C	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA007D	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA008B	NSA	NSA	NSA	+	+	NSA
CNA009A	+	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA011D	NSA	NSA	NSA	NSA	+	NSA
CNA013C	+	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA014B	NSA	NSA	+	NSA	NSA	NSA
CNA017A	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA023A	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA025A	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA025C	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA026B	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA029D	+	NSA	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA030B	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA030C	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA030D	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA031A	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA031C	+	+	+	NSA	NSA	NSA
CNA032C	NSA	NSA	NSA	+	+	NSA
CNA032D	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA033B	NSA	NSA	NSA	NSA	+	NSA
CNA033D	NSA	NSA	NSA	NSA	+	NSA

ตารางที่ 16 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากแบคทีเรียแอคติโนไมซีสที่แยกได้จากทะเลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค (ต่อ)

รหัสสารสกัด	คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>P. aeruginosa</i>
CNA035B	NSA	NSA	NSA	+	+	NSA
CNA035D	NSA	NSA	+	NSA	NSA	NSA
CNA036B	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA036C	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA036D	NSA	+	+	NSA	NSA	NSA
CNA037B	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA038A	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA039A	NSA	+	+	NSA	NSA	NSA
CNA039B	NSA		+	NSA	NSA	NSA
CNA039C	+	+	+	NSA	NSA	NSA
CNA040A	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA040C	NSA	NSA	NSA	NSA	+	NSA
CNA040D	NSA	NSA	NSA	+	NSA	NSA
CNA047A	NSA	NSA	+	NSA	NSA	NSA
CNA048A	NSA	+	NSA	NSA	NSA	NSA
CNA048C	+	+	+	NSA	NSA	NSA
CNA052C	NSA	+		NSA	NSA	NSA
CNA053A	+	+	+	NSA	NSA	NSA
CNA053B	+	+	+	NSA	NSA	NSA
CNA053C	+	+	+	NSA	NSA	NSA
CNA053D	+	+	+	NSA	NSA	NSA
รวม	18	38	13	18	14	0
ร้อยละ	28.1	59.4	20.3	28.1	21.8	0

ตารางที่ 17 แสดงจำนวนสารสกัดจากแบคทีเรียแอคติโนไมซีสที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ(จำแนกตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนสารสกัดที่มีคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย						รวม
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
A	7	17	3	3	4	0	34
B	1	6	3	7	4	0	21
C	7	9	4	4	4	0	28
D	3	7	3	4	3	0	20

3.2.3 คุณสมบัติของสารสกัดจากแบคทีเรียกลุ่ม *gliding* ที่แยกได้จากทะเลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่ม *gliding* ที่แยกได้จากทะเลจำนวน 101 ตัวอย่างพบว่าสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตร skim milk จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้ดีกว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ และสารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคือ *S. aureus*, *C. albicans* และ *S. cerevisiae* คิดเป็นร้อยละ 9.90, 5.94 และ 3.96 ของสารสกัดทั้งหมดตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากแบคทีเรียกลุ่ม *gliding* ที่แยกได้จากทะเลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนสารสกัดที่ทดสอบ	จำนวนสารสกัดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค					
		<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.albicans</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	รวม	ร้อยละ
Skim milk	55	4	6	9	0	19	18.80
Na-glutamate	25	0	0	0	0	0	0
Glycerol	21	0	0	1	0	1	1.00
รวม	101	4	6	10	0	20	19.80
ร้อยละ		3.96	5.94	9.90	0	19.80	

ตารางที่ 19 แสดงผลการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากแบคทีเรียกลุ่ม *gliding* ที่แยกได้จากทะเลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค จำแนกตามตัวอย่างสารสกัด

รหัสสารสกัดจากแบคทีเรีย <i>gliding</i>	คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
GB005SK	NSA	+	+	NSA
GB005GLY	NSA	NSA	+	NSA
GB008SK	NSA	NSA	+	NSA
GB009SK	NSA	+	+	NSA
GB010SK	+	+	+	NSA
GB011SK	NSA	NSA	+	NSA
GB016SK	+	+	NSA	NSA
GB022SK	+	+	+	NSA
GB023SK	+	+	+	NSA
GB032SK	NSA	NSA	+	NSA
GB036SK	NSA	NSA	+	NSA

หมายเหตุ + หมายถึงมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกและจำแนกจุลินทรีย์จากทะเลในภาคใต้ของประเทศไทย

จากการเก็บตัวอย่างบริเวณชายฝั่งทะเลภาคใต้ทั้งด้านตะวันตกและตะวันออกรวมทั้งบริเวณเกาะเต่าและเกาะนางยวน ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี เกาะโลซิน จังหวัดปัตตานี สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างเพื่อแยกแบคทีเรียในทะเลได้ทั้งสิ้นจำนวน 166 ตัวอย่าง โดยสามารถจำแนกชนิดของตัวอย่างออกได้เป็นดังนี้คือ ฟองน้ำร้อยละ 46.4 ตะกอนดินร้อยละ 15.7 ปะการังร้อยละ 10.2 สาหร่ายทะเลร้อยละ 9.0 เปลือกหอยร้อยละ 8.4 फिल्मชีวภาพร้อยละ 3.0 และอื่นๆร้อยละ 7.2 และเก็บตัวอย่างสำหรับแยกแบคทีเรียแอสซีโนแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 118 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นฟองน้ำร้อยละ 44.0 ตะกอนดินร้อยละ 14.0 ปะการังร้อยละ 14.0 สาหร่ายทะเลร้อยละ 22.0 เปลือกหอยร้อยละ 6.0 ในขณะที่การเก็บตัวอย่างเพื่อแยกแบคทีเรียกลุ่ม gliding จะมีจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 204 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น फिल्मชีวภาพจากแหล่งต่างๆร้อยละ 52.9 สาหร่ายทะเลร้อยละ 15.7 เศษไม้หรือใบไม้ที่จมอยู่ใต้ทะเลร้อยละ 10.8 สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังร้อยละ 13.7 ตะกอนดินหรือทรายร้อยละ 4.0 น้ำทะเลร้อยละ 2.9 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าตัวอย่างสำหรับการแยกแบคทีเรียนอกเหนือจากกลุ่ม gliding จะได้แก่สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังเช่น ฟองน้ำและปะการังรวมทั้งสาหร่ายทะเล ในขณะที่ตัวอย่างสำหรับการแยกแบคทีเรียกลุ่ม gliding นั้นจะได้แก่ตัวอย่าง फिल्मชีวภาพจากแหล่งต่างๆเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ได้ส่วนใหญ่จะเก็บโดยอาศัยการดำน้ำที่ระดับความลึก 20-70 ฟุต ด้วยเหตุผลที่สำคัญประการหนึ่งคือตัวอย่างเหล่านี้มีรายงานอย่างแพร่หลายว่าเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ในทะเลหลายชนิด และสภาพแวดล้อมในทะเลที่ระดับความลึกดังกล่าวยังคงความเป็นสภาพที่แท้จริงของสภาวะในทะเล (marine environment) ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับบริเวณชายฝั่งหรือแนวน้ำขึ้นน้ำลง (intertidal zone) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อชนิดและลักษณะของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณดังกล่าว นอกจากนี้ยังเป็นการลดโอกาสที่จะแยกจุลินทรีย์ซึ่งพบได้ทั่วไปในดินหรือบนบก (terrestrial microorganisms) เนื่องจากสภาวะแวดล้อมในทะเลบริเวณดังกล่าวมีความแตกต่างจากสภาวะแวดล้อมบนดินค่อนข้างมาก อาทิเช่นความเค็ม ปริมาณออกซิเจน และสภาวะที่เป็น aquatic environment เป็นต้น

นอกผลของประเภทของตัวอย่างที่มีต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทะเลแล้ว ยังพบอีกว่าชนิดและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกจุลินทรีย์ก็มีผลต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้เช่นกัน โดยพบว่าอาหารที่มีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวัตถุดิบที่พบได้ในทะเลเช่น สาหร่ายทะเล เปลือกกุ้งบดละเอียดหรือตะกอนดินที่ได้จากทะเล จะมีการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อสูตรอื่นๆที่มีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่น yeast extract หรือ peptone เป็นต้น และส่งผลถึงชนิดและลักษณะของจุลินทรีย์ที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ซึ่งจะแตกต่างกันออกไป ในกรณีของการแยกเชื้อแบคทีเรียแอสซีโนแบคทีเรีย เป็นที่น่าสนใจว่าไม่มีเชื้อตัวใดสามารถเจริญได้ในสูตรอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักร่วมกับน้ำทะเลที่มีการเติมสารอาหารเช่น โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตลงไป ซึ่งต่างจากการรายงานของผู้วิจัยที่ศึกษาวิธีการแยกแบคทีเรียชนิดนี้จากตัวอย่างดินและพบว่าอาหารสูตรดังกล่าวสามารถใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียแอสซีโนแบคทีเรียได้ดี ในทางกลับกันอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ให้ผลการแยกแบคทีเรียแอสซีโนแบคทีเรียได้ดีในการวิจัยนี้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีตะกอนดินจากทะเล สารสกัดจากพืชและเปปไทด์และน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบ รองลงไปคืออาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มี เปปไทด์ และเฟอริคฟอสเฟต เป็นองค์ประกอบ ตามด้วย สารอาหารสูตรที่มี เปลือกกุ้งบด แอล-แอสพาราจีน และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่การแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม gliding นั้นจะได้ผลดีในสูตร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย โซเดียมกลูตาเมต แอมโมเนียมไนเตรท และโคโฟแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าแบคทีเรียกลุ่ม gliding ทุกตัวที่แยกได้จากการวิจัยนี้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากน้ำทะเล จึงอาจสรุปได้ในเบื้องต้นว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม gliding ที่แยกได้นี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบและเจริญได้ในทะเลเท่านั้น (obligate marine microorganisms) ทั้งนี้จะได้มีการศึกษาต่อไปในอนาคตเกี่ยวกับชนิดและลักษณะของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ตลอดจนไปถึงความแตกต่างที่เฉพาะตัวที่เกี่ยวกับความต้องการน้ำทะเลหรือความสำคัญขององค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำทะเลต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้

โดยสรุปในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยสามารถแยกแบคทีเรียชนิดต่างๆจากทะเลในภาคใต้ของประเทศไทยแบ่งตามประเภทได้ดังนี้คือ แบคทีเรียทั่วไป 306 isolates แบคทีเรียแอคติโนมัยซิส 50 isolates และแบคทีเรียกลุ่ม gliding 46 isolates รวมทั้งสิ้น 402 isolates

4.2 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

วัตถุประสงค์ที่สำคัญของการวิจัยในขั้นตอนนี้ก็เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลซึ่งที่กล่าวมาแล้วข้างต้นที่มีต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบโดยเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบจากกลุ่มต่างๆคือ เชื้อรา (*Aspergillus fumigatus*) ยีสต์ (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) และแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella sonnei*) โดยเน้นวิธีการตรวจสอบที่มีความแม่นยำ สะดวกรวดเร็ว และสามารถตรวจตัวอย่างสารสกัดในปริมาณน้อยได้ดี

จากการทดลองพบว่าวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยอาศัยหลักการของ Colorimetric microdilution broth assay ร่วมกับ AlamarBlue อินดิเคเตอร์ให้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ สามารถตรวจสอบตัวอย่างสารสกัดได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน โดยใช้สารสกัดในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับวิธีการดั้งเดิมเช่น disc diffusion assay อีกทั้งยังให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วและง่ายต่อการแปลผล เนื่องจากอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์จากผลของปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันที่เกิดจากเมตาบอลิซึมหรือการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ โดยพบว่าการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ยกเว้นเชื้อราจะใช้เวลาประมาณ 8-10 ชั่วโมง ยีสต์ประมาณ 12-15 ชั่วโมง และสำหรับเชื้อราซึ่งมีการเจริญค่อนข้างช้าเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบจะใช้เวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมงจึงจะสามารถอ่านผลได้ชัดเจน

4.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์จากทะเลที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จากทะเลที่แยกได้จากข้อ 4.1 ในอาหารสูตรต่างๆกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์โดยกำหนดให้เลี้ยงจุลินทรีย์จากทะเลที่แยกได้ในอาหาร 3 ชนิดที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยที่องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะได้แก่วัตถุดิบที่มีพบในทะเลเช่น สาหร่าย เปลือกหรือกระดูกสัตว์ทะเลบด ปลาป่น ตลอดจนไปถึงองค์ประกอบที่นิยมใช้ในการเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปเช่น นมผง สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน กรดอะมิโน เป็นต้น ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรจะมีน้ำทะเลเป็นองค์ประกอบหลัก ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของจุลินทรีย์และความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์นั้นๆในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร

โดยทั่วไปแล้วระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจะอยู่ระหว่าง 7-10 วันจึงจะสามารถสังเกตการณ์เจริญของจุลินทรีย์ที่สมบูรณ์

สารสกัดหยาบของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อซึ่งไม่ได้ผ่านการแยกเซลล์ออกจะผ่านการเตรียมให้อยู่ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ตามวิธีการข้างต้น จากการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากทะเลจำนวน 201 ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรพบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตร E, B และ G มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบคือ *S. aureus*, *C. albicans* และ *S. cerevisiae* ได้ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 3.5, 4.0 และ 4.5 ตามลำดับ) ในขณะที่สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียจากทะเลที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A, C และ D ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ เป็นที่น่าสังเกตว่าในการทดสอบนี้ไม่พบสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากทะเลจำนวน 212 ตัวอย่างพบว่ามี 65 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 30.6) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบชนิดใดชนิดหนึ่งหรือมากกว่า โดยที่ร้อยละ 59.4 ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ในขณะที่ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆจะอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 20-28 ของสารสกัดทั้งหมดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นที่น่าสังเกตว่าในการศึกษานี้ไม่มีสารสกัดจากแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เช่นเดียวกับกับสารสกัดจากแบคทีเรียทั่วไปที่แยกได้จากทะเลในข้างต้น สำหรับผลของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียแอคติโนมัยซิสพบว่าอาหารทั้ง 4 สูตรให้ผลที่ใกล้เคียงกันโดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร A และ C ซึ่งมีตะกอนดินจากทะเลและแป้งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญตามลำดับให้สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่นๆ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร B ซึ่งมีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบที่สำคัญให้สารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของ *S. typhi* มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่นๆ

ในกรณีของการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่ม gliding ที่แยกได้จากทะเลจำนวน 101 ตัวอย่างพบว่าสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตร skim milk จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้ดีกว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ และสารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคือ *S. aureus*, *C. albicans* และ *S. cerevisiae* คิดเป็นร้อยละ 9.90, 5.94 และ 3.96 ของสารสกัดทั้งหมดตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าสารสกัดหยาบของแบคทีเรียกลุ่ม gliding ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของโซเดียมกลูตาเมตเป็นองค์ประกอบนั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ใดๆทั้งสิ้นทั้งๆที่อาหารสูตรดังกล่าวเป็นอาหารสูตรเดียวที่เหมาะสมในการแยกแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว จึงเป็นที่น่าสนใจว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเจริญและสร้างสารเมตาบอไลต์ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ซึ่งจะได้มีการศึกษาต่อไป

5. ประโยชน์ที่ได้รับและแนวทางการวิจัยในอนาคต

5.1 จุลินทรีย์จากทะเลชนิดต่างๆกว่า 400 isolates ซึ่งสามารถใช้ในการศึกษาชนิดและความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่พบในทะเลของประเทศไทยโดยอาศัยวิธีการจัดจำแนกทั้งที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม gliding ซึ่งมีความเฉพาะตัวค่อนข้างสูงและยังไม่เป็นที่ศึกษามากนัก (อยู่ในระหว่างการดำเนินการวิจัย) และคาดว่าจะสามารถขยายขอบเขตไปยังจุลินทรีย์กลุ่มอื่นได้ต่อไปในอนาคต

5.2 ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับจุลินทรีย์จากทะเลที่มีศักยภาพในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคหรือเป็นดัชนีที่สำคัญในการตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สำคัญอื่นๆ นอกจากนี้ยังได้มีการขยายผลของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากจุลินทรีย์ในทะเลจากการวิจัยนี้ไปสู่การทดสอบอื่นๆเช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ และฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ acetyl choline esterase ซึ่งอยู่ในระหว่างการดำเนินการทั้งสองส่วน คาดว่าผลที่ได้จะนำไปสู่การศึกษาถึงสารที่มีฤทธิ์ต่างๆในระดับที่สามารถแยกสารบริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวได้โดยอาศัยวิธีการทางสเปกโตรสโกปี (อยู่ในระหว่างการดำเนินการ)

Output ที่ได้จากโครงการ

เนื่องจากผู้วิจัยได้กำหนดระยะเวลาในการขอทุนไว้เพียงหนึ่งปี (จากความเข้าใจเดิมว่าทุนที่ได้รับมีระยะเวลา 2 ปี) ทำให้ผลจากการวิจัยที่ได้ภายใน 1 ปียังไม่สมบูรณ์พอที่จะรวบรวมเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ อย่างไรก็ตามขณะนี้ผู้วิจัยได้ทำการขยายผลจากการวิจัยด้วยทุนวิจัยนี้ออกเป็น 3 โครงการวิจัยย่อยเพื่อให้ได้ผลการวิจัยที่สมบูรณ์แบบและสามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับนานาชาติได้ไม่น้อยกว่า 3 ฉบับ โดยที่โครงการวิจัยดังกล่าวได้แก่

1. การศึกษาความหลากหลายและการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกลุ่ม gliding ที่พบในทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทยเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (หัวหน้าโครงการวิจัย) ได้รับเงินสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 625,000 บาท ระยะเวลา 2 ปี (2547-2548)
2. สารที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและจุลินทรีย์ในทะเลจากเขตอ่าวไทยตอนล่าง (ผู้ร่วมโครงการวิจัย) ได้รับเงินทุนสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (DBG4780005) จำนวน 1,500,000 บาท ระยะเวลา 3 ปี
3. การค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสายพันธุ์แอคติโนมัยซีท์ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับเงินทุนสนับสนุนจาก โครงการ การใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพ (Bioresource Utilization Project, BUP) อยู่ระหว่างการอนุมัติ