



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 แบคทีเรียแอคทีโนไมซีส 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 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียแอคทีโนไมซีสสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มเดียวกันนี้

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 และเนื่องจากการเก็บตัวอย่าง เพื่อแยกจุลินทรีย์ ปริมาณของตัวอย่างที่ต้องการจะค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาในด้านอื่นๆ ตัวอย่างที่เก็บได้จะมีการจัดจำแนกตามชนิดและสถานที่ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิค่าเพื่อลดการปนเปื้อนจาก จุลินทรีย์ภายนอก จนกว่าจะทำการแยกจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่อไป สถานที่ในการเก็บตัวอย่างจะอยู่ในบริเวณ ชายฝั่งทะเลและเกาะต่างๆ 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 จนสามารถสังเกตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์รอบๆตัวอย่าง 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) ซึ่งเหมาะสมกับการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่มาจากจุลินทรีย์ทำให้สามารถลดขั้นตอนและปริมาณงานในการคัดเลือกลำดับ 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) ซึ่งจะเป็นดัชนีที่ใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่ทดสอบ

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 สภาวะในการเลี้ยงเชื้อจะต้องมีการให้อากาศโดยใช้เครื่องเขย่า (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 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิค่าเพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ 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