



การคัดกรองและการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไกลดิ้งที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย
Screening and Identification of Marine Gliding Bacteria Producing Antibacterial
Compounds

ธนวิวรรณ ชื่นอารมณฺ์
Thaniwan Cheun-Arom

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดกรองและการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไกลดิงที่ผลิตสารยับยั้ง
แบคทีเรีย
ผู้เขียน นางสาวธนวิวรรณ ชื่นอารมณ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาส)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทรี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาส)

.....
(ดร.ศุภศิลา มณีรัตน์)

.....กรรมการ
(ดร.ศุภศิลา มณีรัตน์)

.....
(ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์)

.....กรรมการ
(ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรกนก อิงคนินันท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองและการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไกลดิงที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย
ผู้เขียน	นางสาวธนวิวรรณ ชื่นอารมณ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

การแยกและทำบริสุทธิ์เชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากตัวอย่าง ได้แก่ ฟองน้ำ กัดปังกา สำหรับขายเศษไม้ เศษเชือก ซากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และฟิล์มชีวภาพ บริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี แยกเชื้อได้ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียไกลดิงส่วนใหญ่ที่แยกได้จำนวน 14 สายพันธุ์มีความใกล้เคียงกับ *Alphaproteobacterium* ในช่วงร้อยละ 96-100 (796/825 bp) และ 4 สายพันธุ์มีความใกล้เคียงกับ *Tenacibaculum mesophilum* ในช่วงร้อยละ 98-100 (832/844 bp) ส่วนอีก 1 สายพันธุ์มีความใกล้เคียงกับ *Flexibacter echinocida* ร้อยละ 99 (836/842 bp) เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียไกลดิงที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียโดยเลี้ยงในอาหารเหลว 4 สูตร ได้แก่ RL1, SK, CY และ VY/2 ซึ่งเตรียมจากน้ำทะเลที่เติม 2% XAD-16 resin เพื่อดูดซับสาร secondary metabolites และจากการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบทั้งจากแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากเกาะเต่าและสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิงที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการจำนวน 227 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 303 ตัวอย่าง ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella* Typhi (clinical strain) และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ด้วยวิธี AlamarBlue microdilution broth assay พบว่ามีสารสกัดหยาบจำนวน 15 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยให้ค่า MIC ต่ำกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *Rapidithrix thailandica* ซึ่งแยกได้จากเศษเชือก มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยเฉพาะแบคทีเรียคือยาสายพันธุ์ MRSA และ VRE ให้ค่า MIC เท่ากับ 9.38 และ 18.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า การเลี้ยงเชื้อ *R. thailandica* ในอาหาร RL1 และ VY/2 ที่มีสารอาหารแตกต่างกัน ส่งผลให้ได้สารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์ด้วย TLC และ HPLC จึงยืนยันได้ว่า องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิของแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล (3)

Thesis Title	Screening and Identification of Marine Gliding Bacteria Producing Antibacterial Compounds
Author	Miss Thaniwan Cheun-Arom
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2007

ABSTRACT

Marine gliding bacteria were isolated and purified from marine specimens such as sponge, sea fan, seaweed, rope, invertebrate and biofilms collected from Tao Island, Surat Thani province. We isolated and purified a total of 19 marine gliding bacteria isolates. The identification of all isolates by 16S rDNA sequence analysis indicated that 14 isolates were related to *Alphaproteobacterium* showed similarity values were between 96-100% (796/825 bp), 4 isolates were related to *Tenacibaculum mesophilum* showed similarity values were between 98-100% (832/844 bp) and 1 isolate was related to *Flexibacter echinocida* showed similarity values at 98% (836/842 bp). Each isolate was cultivated in four different liquid media including RL1, SK, CY and VY/2 containing seawater and 2% amberlite XAD-16 resin for secondary metabolites absorption. The total crude extracts of 303 sample (227 sample has been in laboratory) detected by colorimetric microdilution broth assay with AlamarBlue as an indicator was used to screen for antibacterial activity of the crude extracts against five pathogenic bacteria i.e. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella* Typhi (clinical strain) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Fifteen crude extracts showed antibacterial activity with the MIC values lower than 150 µg/mL. *Rapidithrix thailandica* isolated from rope inhibited growth of five pathogenic bacteria especially, MRSA and VRE with the MIC value of 9.38 and 18.75 µg/ml, respectively. Cultivation of *R. thailandica* in different culture media (RL1 and VY/2) yielded crude extracts with different chemical composition detected by TLC and HPLC methods. The composition of cultivation media, therefore, play important roles in secondary metabolites production by marine gliding bacteria.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.อักรวิทย์ กาญจนโอภาส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้รวมถึงแนวทางในการดำเนินชีวิตและโอกาสดีๆ ที่อาจารย์มอบให้ และขอขอบพระคุณ ดร.วัลภา อรุณไพโรจน์และ ดร.ศุภศิลป์ มณีรัตน์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทรีศรี ประธานกรรมการ และรองศาสตราจารย์ ดร.กรกนก อิงคนินันท์ กรรมการสอบผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ศูนย์จุลินทรีย์ (Bangkok MIRCEN) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้การสนับสนุนสายพันธุ์จุลินทรีย์ทดสอบและเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ขอขอบคุณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจและโอกาสในการศึกษามาโดยตลอด นักศึกษาและเจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับกำลังใจและแรงบันดาลใจที่มีให้เสมอมา ตลอดจนทุกท่านที่มีได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ธนวิวรรณ ชื่นอารมณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(8)
รายการภาพ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	32
2. อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	33
อุปกรณ์	35
วิธีการ	36
3. ผลและวิจารณ์	
3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล	48
3.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไกลดิงโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA	54
3.3 การคัดกรองสารสกัดหยาบของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ	60
3.4 การคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ	70
3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ	74
4. สรุปผลการทดลอง	86
เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก ก	94

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข	98
ภาคผนวก ค	99
ภาคผนวก ง	100
ภาคผนวก จ	113
ภาคผนวก ฉ	134
ประวัติผู้เขียน	139

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แหล่งที่พบ Myxobacteria	10
2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล	11
3. อนุกรมวิธานแบคทีเรียไกลดิง	14
4. สูตรเคมีและน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งแยกได้จากแบคทีเรียไกลดิง	27
5. รายละเอียดการเก็บตัวอย่าง	49
6. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ	52
7. ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียไกลดิงโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA	55
8. รายละเอียดของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์อื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้	58
9. ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี colorimetric microdilution broth assay	62
10. ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียเมื่อทดสอบโดยวิธี colorimetric microdilution broth assay	65
11. จำนวนสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงในอาหารชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย	74
12. ผลการทดสอบชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย	78
13. ผลการคัดกรองสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิงที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	84
14. ผลการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดหยาบทั้งหมด 303 ตัวอย่าง	100

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. รูปร่างลักษณะของเซลล์ Myxobacteria แบบต่างๆ	4
2. วัฏจักรเซลล์ของ myxobacteria: <i>Stigmatella aurantiaca</i>	5
3. การสร้าง fruiting body ของ <i>Myxococcus xanthus</i> ที่เวลา 0, 7, 12, 31, 61 และ 72 ชม. ของการเจริญ	5
4. ลักษณะโคโลนีแบบต่างๆ ของ Myxobacteria	6
5. ลักษณะ fruiting body ของ Myxobacteria แบบต่างๆ	7
6. ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เรียกลิดดิงใน Order Cytophagales	8
7. เพลอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่พบจากผิวของซากปะการัง	12
8. แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อกลุ่ม α -Proteobacterium, γ -Proteobacterium และ CFB	13
9. กลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะ	17
10. โครงสร้างทางเคมีของ Myxovirescin	18
11. โครงสร้างทางเคมีของ Corallopyronin	19
12. โครงสร้างทางเคมีของ Apicularen A และ B	19
13. โครงสร้างทางเคมีของ Myxothiazol	20
14. โครงสร้างทางเคมีของ Stigmatellin	20
15. โครงสร้างทางเคมีของ Ambruticin	21
16. โครงสร้างทางเคมีของ Chondrochlorens A และ B	21
17. โครงสร้างทางเคมีของ TAN-1057 A-D	22
18. โครงสร้างทางเคมีของ Katanosin A และ Katanosin B	23
19. โครงสร้างทางเคมีของ Saframycin	24
20. โครงสร้างทางเคมีของ Tubulysins A, B, D และ E	24
21. โครงสร้างทางเคมีของ Soraphen A	25
22. โครงสร้างทางเคมีของ Epothilone A	25

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
23. จำนวนการตีพิมพ์และการจดสิทธิบัตรเกี่ยวกับ Epothilone A ตั้งแต่ปี ค. ศ. 1993-2002	26
24. ค่า chemical shifts ของโปรตอนในสภาพแวดล้อมต่างๆ	30
25. การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลให้บริสุทธิ์โดยใช้ micromanipulator	37
26. ร้อยละของชนิดตัวอย่างที่ใช้แยกแบคทีเรียไกลดิง	49
27. การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงโดยวิธี direct plating (A: sodium glutamate medium, B: sodium glutamate medium ที่มีเติม crystal violet)	53
28. ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไกลดิง (A: <i>Tenacibaculum mesophilum</i> , B: <i>Alphaproteobacterium</i>)	53
29. เซลล์ของแบคทีเรียไกลดิงบนผิวหน้าอาหาร SAP2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase-contrast ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดย A) <i>Tenacibaculum mesophilum</i> B) <i>Flexibacteria echinocida</i> C) and D) <i>Alphaproteobacterium</i>	54
30. แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล	56
31. การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ด้วย microtitreplate (A: ก่อนบ่มเชื้อและ, B: หลังบ่มเชื้อ 15 ชม.)	64
32. ร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ	71
33. ร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด	73
34. Thin Layer Chromatogram ของสารสกัดหยาบ 23GB CY, 66GB VY, 89GB CY, TISTR1710 SK, TISTR1712 SK, TISTR1712 CY, TISTR1736 RL และ TISTR1736 VY ที่ทดสอบด้วย Wagner's reagent (A, B: alkaloid detection), Vanillin ใน H ₂ SO ₄ (C, D: terpenes detection) และ Ninhydrin reagent (E, F: peptides detection)	76

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
35. Thin Layer Chromatogram ของสารสกัดหยาบ 52GB CY, 52GB VY, 96GB CY, GB086 CY, GB097 CY, GB102 CY และ GB111 CY ที่ทดสอบด้วย Wagner's reagent (A, B: alkaloid detection), Vanillin ใน H ₂ SO ₄ (C, D: terpenes detection) และ Ninhydrin reagent (E, F: peptides detection)	77
36. โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ TISTR1712 CY ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)	80
37. โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ TISTR1712 SK ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)	80
38. โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ GB102 CY ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)	81
39. โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ 89GB CY ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)	81
40. โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ GB086 CY ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)	82

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัญหาจากเชื้อดื้อยามักเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาอื่นๆในการรักษาโรคติดเชื้อตามมาอีกมาก เช่น ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลและอัตราการเสียชีวิตสูงขึ้น ทำให้ต้องใช้ยาที่มีราคาแพงขึ้น รวมไปถึงผู้ป่วยต้องพักรักษาในโรงพยาบาลนานขึ้นอีกด้วย แบคทีเรียที่ดื้อยาด้านจุลินทรีย์ทำให้เกิดความยากลำบากแก่แพทย์ในการรักษาผู้ป่วย เนื่องจากยาส่วนใหญ่ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียไม่ได้ผล ยาที่ใช้รักษาเชื้อแบคทีเรียคือยาที่มีอยู่ในปัจจุบันเช่น vancomycin เริ่มพบว่ามีเชื้อที่ดื้อยาเพิ่มขึ้นเป็นลำดับอย่างรวดเร็ว

จากผลการศึกษาและเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติ พบว่าเชื้อ Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จากเดิมที่พบการดื้อยาเพียง 24% ในปี 2541 ได้เพิ่มสูงขึ้นเป็น 32% ในปี 2546 (เชื้อแบคทีเรียดื้อยา เป็นปัญหาสาธารณสุขระดับชาติ, 2000) โดยพบการติดเชื้อดังกล่าวที่ผิวหนัง กระดูก โลหิต ปอด และอวัยวะอื่นๆ และยังพบอีกว่าเชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติในการดื้อยาปฏิชีวนะได้มากกว่า 1 ชนิด (multidrug-resistant) เช่น methicillin, oxacillin หรือ nafcillin

ในขณะที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญทางการแพทย์นั้นส่วนใหญ่จะเป็นสารที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ เช่น antibacterials, antifungals และ antivirals (Grabley and Thiericke, 1999; Strohl, 1997) โดยแหล่งที่มาของสารดังกล่าวนี้ส่วนใหญ่จะมาจากธรรมชาติหรือสิ่งมีชีวิตที่พบในธรรมชาติ (natural products) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชหรือจุลินทรีย์ที่พบในดินเป็นส่วนใหญ่ แต่พบว่าในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา มีรายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นและมีศักยภาพที่สามารถพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ยาชนิดใหม่ได้ (Faulkner, 2000a,b; Schwartsmann *et al.*, 2001) ทั้งนี้เนื่องจากทะเลเป็นระบบนิเวศน์ขนาดใหญ่ มีพื้นที่ประมาณร้อยละ 70 ของพื้นผิวโลก (Haefner, 2003) และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก เนื่องมาจากปัจจัยทางกายภาพในทะเล เช่น อุณหภูมิ ความดัน แสงสว่าง ความเค็ม ความขุ่น พีเอช และชนิดและปริมาณของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทะเล (Bull *et al.*, 2005) มีอิทธิพลต่อการปรับตัวและการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในทะเลทำให้เกิดวิวัฒนาการทางสรีระและทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆเพื่อปรับตัวให้สามารถอยู่รอดได้ในระบบนิเวศน์ที่มี

ความหลากหลายดังกล่าว ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีการสังเคราะห์หรือผลิตสารเมตาบอไลต์ชนิดใหม่ๆ ที่ต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จากสิ่งมีชีวิตที่อยู่บนบก (Fenical *et al.*, 2003) โดยมีรายงานว่า การวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลนั้นมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในทะเลยังคงมีการจำกัดอยู่ในสิ่งมีชีวิตเพียงบางกลุ่ม เช่น เชื้อราหรือ แอคติโนมัยสีท เป็นต้น ยังมีจุลินทรีย์อีกมากมายที่ยังไม่ถูกค้นพบหรือนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Ravenschlag *et al.*, 1999; Stach *et al.*, 2003)

การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียคือยาสายพันธุ์ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) เนื่องจากมีรายงานว่าแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่มของ Myxobacteria สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้มากมายหลายชนิด แต่การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียไกลดิงในทะเลและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีอยู่น้อยมาก

บทตรวจเอกสาร

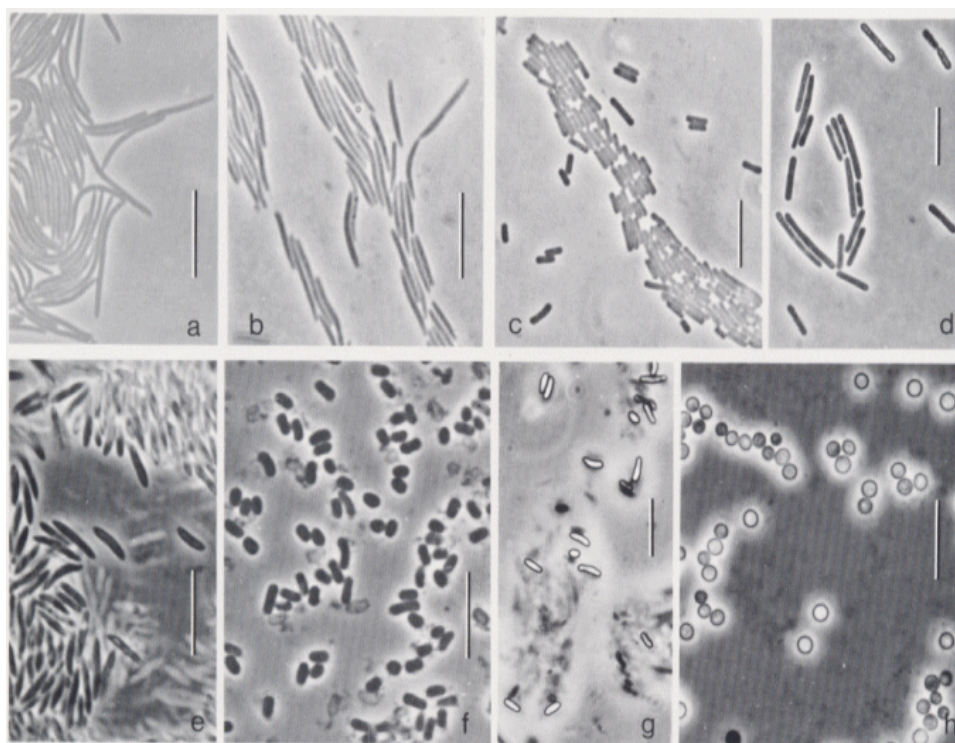
แบคทีเรียไกลดิง (Gliding bacteria)

1. ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียไกลดิง

แบคทีเรียไกลดิง (Gliding bacteria) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีลักษณะเฉพาะตัว คือการเคลื่อนที่แบบคืบคลาน (gliding) บนพื้นผิวที่แข็งโดยไม่อาศัยแฟลกเจลลา แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกันไปตามแต่ชนิด เช่น ลักษณะเป็นท่อน (rod) เส้นสาย (filament) หรือเป็นเกลียว (spiral) ดังแสดงในภาพที่ 1

แบคทีเรียไกลดิงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่สร้าง fruiting body และกลุ่มที่ไม่สร้าง fruiting body (Gaspari *et al.*, 2005; Iizuka *et al.*, 1998) ตัวอย่างแบคทีเรียไกลดิงกลุ่มที่สร้าง fruiting body ได้แก่ Myxobacteria ซึ่งจัดอยู่ใน Order Myxococcales ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 มีลักษณะโคโลนีเป็น swarm colony คล้ายแผ่นฟิล์มบางกระจายอยู่บนแผ่นวุ้น ดังแสดงในภาพที่ 4 เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในกลุ่มที่สร้าง fruiting body เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยที่เซลล์จะรวมตัวกันและยกสูงขึ้นเป็น fruiting body ซึ่งมีขนาดระหว่าง 50-500 μm สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใน fruiting body ที่มีการเจริญเต็มที่แล้ว จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ให้มีขนาดสั้นลงจนมีลักษณะเป็นรูปกลม ที่เรียกว่า myxospore ดังแสดงในภาพที่ 5 (Reichenbach and Dworkin, 1992; Dworkin, 1996)

Myxobacteria สามารถพบได้ในดิน เปลือกไม้ ซากต้นไม้ที่ผุพัง มูลของสัตว์กินพืช เช่น กระต่าย แพะ และ กวาง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า Myxobacteria สามารถเจริญได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เช่น ในน้ำทะเลและตะกอนดินที่บริเวณชายฝั่งทะเล แต่ที่ผ่านมายังมีการศึกษาเพื่อแยก Myxobacteria จากตะกอนดินในทะเลไม่มากนัก (Iizuka *et al.*, 1998) สำหรับแบคทีเรียไกลดิงชนิดที่ไม่สร้าง fruiting body ได้แก่ แบคทีเรียใน Sub-Order และ Order ต่างๆ ดังนี้ คือ Sub-Order Chlorobiinae (Green Sulfur Bacteria), Order Beggiatoales (Sulfur Bacteria), Order Leucotrichales (Organoheterotrophic Bacteria) และ Order Cytophagales ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่มนี้บางครั้งจะมีลักษณะคล้ายกับรากของต้นไม้ ดังแสดงในภาพที่ 6 โคโลนีของ Cytophagale จะมีสีต่างๆ เช่น สีเหลือง สีส้ม และสีแดงอิฐ อันเนื่องมาจากรงควัตถุในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ เป็นต้น แบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ในดินที่มีพีเอชเป็นกลาง ซากพืชเน่าเปื่อย มูลสัตว์กินพืช หรือแม้แต่ในทะเล เช่น ซากสาหร่ายทะเล ตะกอนดิน ซากสัตว์ทะเล เป็นต้น

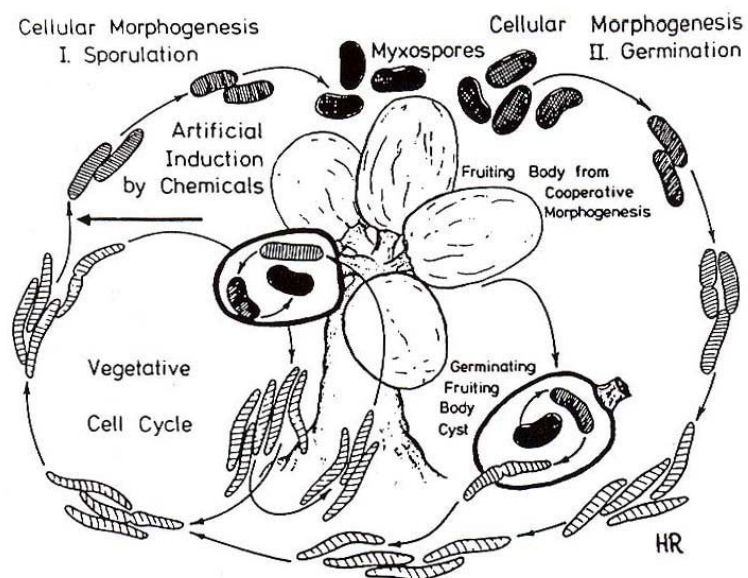


- (a) *Cystobacter ferrugineus*, cells from a liquid culture
- (b) *Stigmatella aurantiaca*, cells in situ on agar surface in a chamber culture
- (c) *Chondromyces crocatus* in a chamber culture
- (d) *Sorangium compositum* in a chamber culture
- (e) Myxospores of *Cystobacter ferrugineus*, from a crushed, degenerated
- (f) Myxospores of *Cystobacter velatus* from a crushed fruiting body sporangiole
- (g) Experimentally induced myxospores of *Stigmatella aurantiaca* on the agar surface in a chamber culture
- (h) Myxospores from a *Myxococcus xanthus* fruiting body

ภาพที่ 1 รูปร่างลักษณะของเซลล์ Myxobacteria แบบต่างๆ

Figure 1. Morphological characteristics of myxobacteria

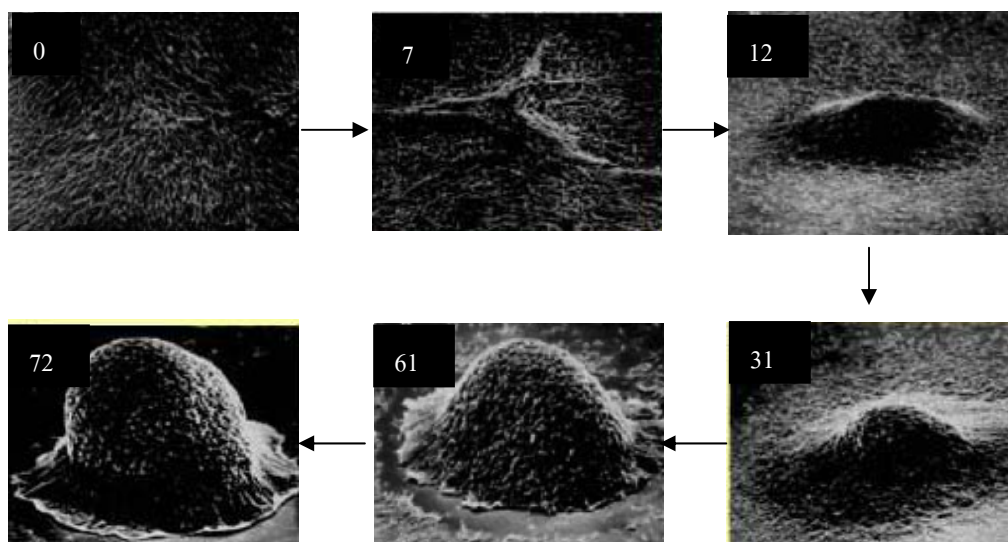
ที่มา: Balows และคณะ (1992)



ภาพที่ 2 วัฏจักรเซลล์ของ myxobacteria: *Stigmatella aurantiaca*

Figure 2. Cellular morphogenesis of myxobacteria shown by the example of *Stigmatella aurantiaca*

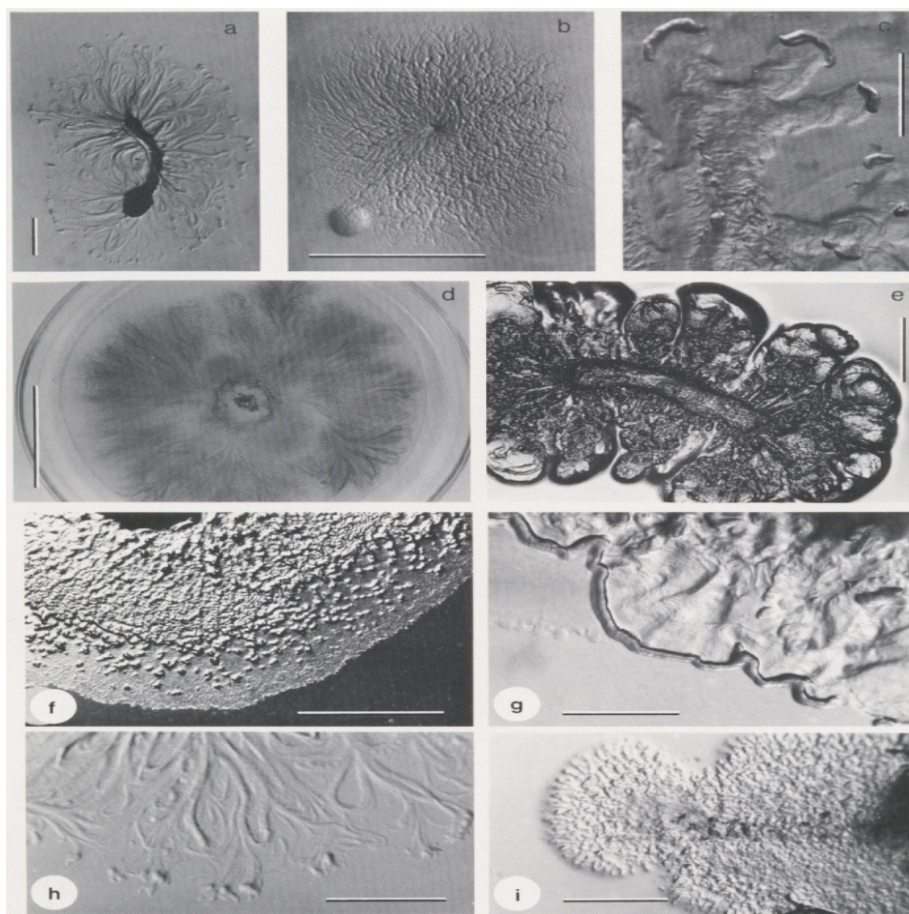
ที่มา : Gerth และ Reichenbach (1978)



ภาพที่ 3 การสร้าง fruiting body ของ *Myxococcus xanthus* ที่เวลา 0, 7, 12, 31, 61 และ 72 ชม. ของการเจริญ

Figure 3. Fruiting body formation of *Myxococcus xanthus* at 0, 7, 12, 31, 61 and 72 h of growth

ที่มา : Kuner และ Kaiser (1982)

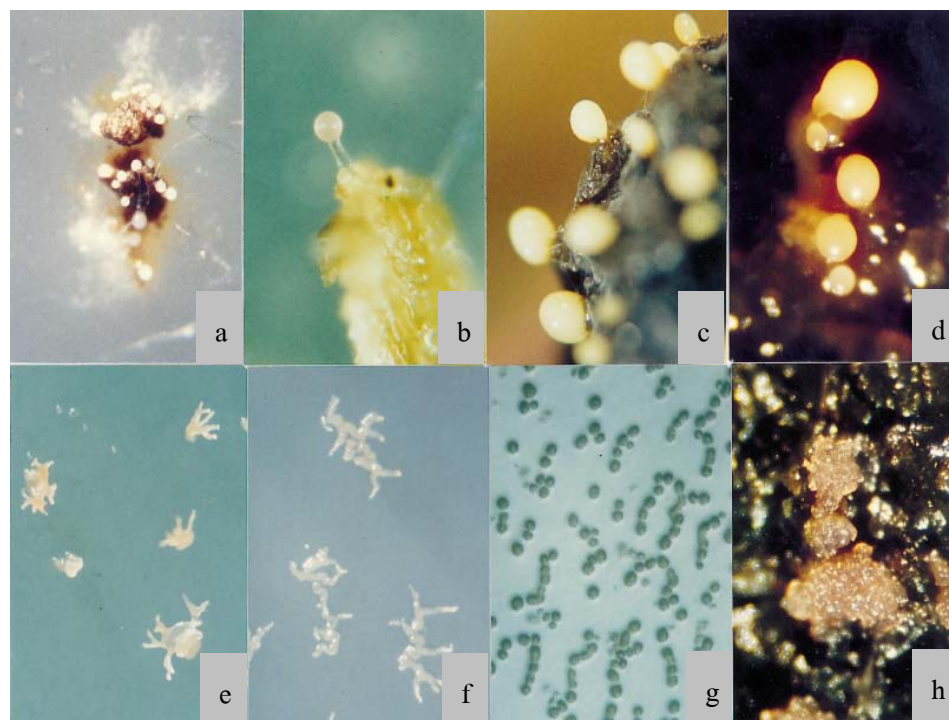


- (a) *Stigmatella erecta* บนอาหารวุ้นCY
 (b) *Myxobacteria xanthus* บนอาหารวุ้นคาซิโตน (Casitone)
 (c) *Polyagium* sp. บนแผ่นวุ้น
 (d) *Cysyobacter violaceus* บนแผ่นวุ้น VY/2
 (e) *Nannocystis exedens* บนอาหารเลี้ยงเชื้อคาซิโตน (Casitone)
 (f) *Corallocooccus coralloides* บนอาหารวุ้นคาซิโตน (Casitone)
 (g) *Polyangium* sp. บนแผ่นวุ้นเลี้ยง *E. coli*
 (h) *Stigmatella erecta* บนอาหารวุ้นคาซิโตน (Casitone)
 (i) *Nannocystis exedens* บนแผ่นวุ้นเลี้ยง *Micrococcus luteus*

ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีแบบต่างๆของ Myxobacteria

Figure 4. Colony characteristics of myxobacteria

ที่มา: Balows และคณะ (1992)

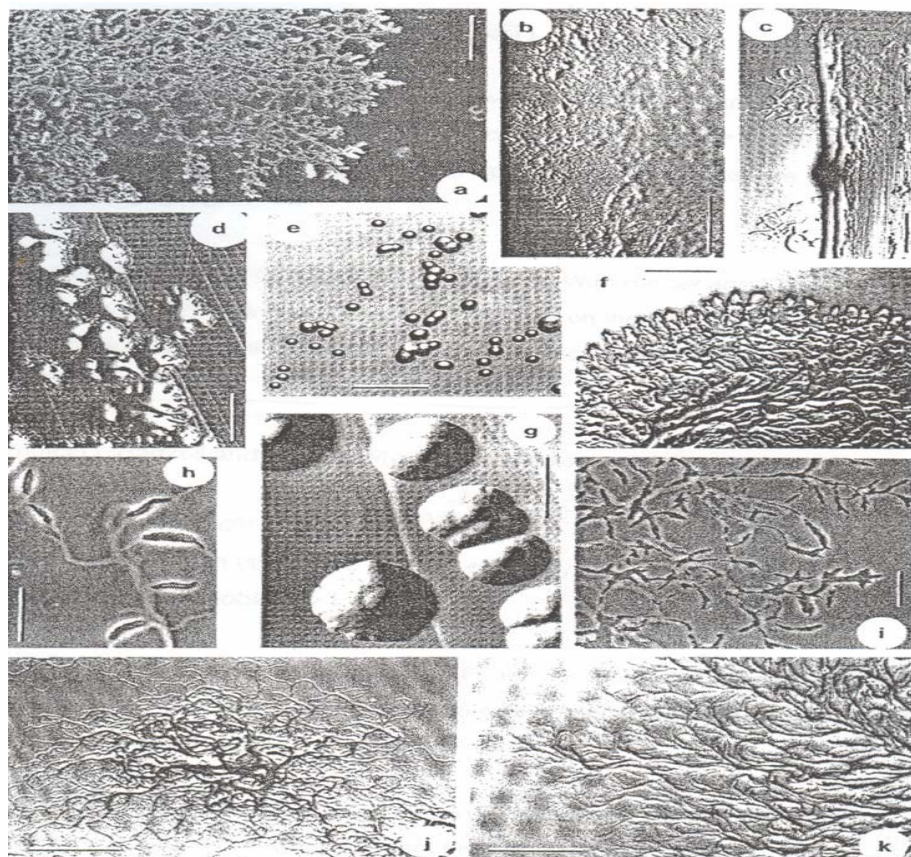


- (a) *Myxococcus fulvus*, on soil crumbs on coli-spot agar, China
 (b) *Myxococcus stipitatus*, on wood particles of a soil sample, Hait
 (c) *Myxococcus virescens*, on rabbit dung as bait, Illinois
 (d) *Myxococcus xanthus*, on peat particles, Belgium
 (e) *Corallocooccus coralloides*, on coli-spot agar, Malawi
 (f) *Corallocooccus exiguus*, on coli-spot agar, France
 (g) *Angiococcus disciformis*, on vy/2 agar, Zaire
 (h) *Archangium gephyra*, on rabbit dung as bait, Cyprus

ภาพที่ 5 ลักษณะ fruiting body ของ Myxobacteria แบบต่างๆ

Figure 5. Fruiting body characteristics of myxobacteria

ที่มา: Dawid (2000)



- (a), (c) โคลินีของ *Cytophaga-like bacteria* ที่แยกได้จากดิน
- (b) ลักษณะ โคลินีของ *Flexibacter filiformis* บนแผ่นอาหารวุ้น
- (d) ลักษณะ โคลินีของ *F. filiformis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อย โคลินีจะมีขนาดค่อนข้างใหญ่และมีการกระจายตัว
- (e) ลักษณะ โคลินีของ *F. filiformis* บนอาหารที่มีสารอาหารมาก โคลินีจะมีขนาดเล็ก และกระจุกตัวกันอยู่แน่น
- (f) ลักษณะ โคลินีของ *Cytophaga-like bacteria* บนอาหารวุ้น CY
- (g) ลักษณะ โคลินีของ *Cytophaga flevensis* ที่ทำการแยกเชื้อจากแหล่งน้ำจืด
- (h) ลักษณะ โคลินีของ *F. filiformis* กลุ่มเซลล์อยู่อย่างหนาแน่นบริเวณส่วนปลายของสายเมือก
- (i), (k) ลักษณะ โคลินีของ *Cytophaga columnaris* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในปลาน้ำจืด

ภาพที่ 6 ลักษณะ โคลินีของแบคทีเรียไกลดิงใน Order Cytophagales

Figure 6. Colony of gliding bacteria in the Order Cytophagales

ที่มา: Balows และคณะ (1992)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิง

จากการสำรวจเอกสารงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียไกลดิงส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของ Myxobacteria ที่แยกได้จากดิน เนื่องจากลักษณะเด่นของ Myxobacteria ที่สร้าง fruiting body ทำให้สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้ง่าย แต่การแยกเชื้ออาจไม่ประสบผลสำเร็จหากเทคนิคที่ใช้แยกไม่เหมาะสมเช่น การเจือจางเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีนี้จะไม่พบเชื้อ Myxobacteria เนื่องจากเชื้อจะสร้างเมือกทำให้เซลล์ไม่กระจายตัว เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่พบการเจริญของเชื้อ หรือแม้แต่องค์ประกอบของอาหารที่ใช้แยกเชื้อก็มีความสำคัญ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียไกลดิงเจริญช้ากว่าแบคทีเรียอื่นๆ หากใช้อาหารที่มีความสมบูรณ์ เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่โตเร็วกว่าหรือเชื้อราที่จะเจริญทับโคลนินของแบคทีเรียไกลดิง ทำให้ถูกมองข้ามได้โดยง่าย จากรายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่ม Myxobacteria สามารถพบได้จากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน มูลสัตว์กินพืช และเปลือกไม้ ดังแสดงในตารางที่ 1 และจากการสำรวจพบว่าคณะนักวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียไกลดิงได้เสนอแนะวิธีการแยกเชื้อ Myxobacteria จากดินไว้ดังนี้ (Gaspari *et al.*, 2005; Reichenbach and Dworkin, 1992)

1. การแยกโดยใช้มูลกระต่ายเป็นเหยื่อล่อ นำตัวอย่างดินที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดใหญ่ และนำมูลกระต่ายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยความร้อนใส่ลงบนดินแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องจนสามารถสังเกตเห็น โคลนินของ Myxobacteria จะเจริญอยู่บนมูลกระต่ายจนเกิดการพัฒนาและสร้าง fruiting body ที่สามารถสังเกตได้โดยง่าย

2. การแยกโดยใช้ *Escherichia coli* เป็นเหยื่อล่อ จากคุณสมบัติของแบคทีเรียไกลดิงชนิด Myxobacteria ที่สามารถย่อยสลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ ทำให้สามารถนำคุณสมบัติดังกล่าวนี้มาแยกเชื้อโดยการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* เป็นเหยื่อล่อซึ่งมีวิธีโดยสรุปดังนี้ เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ในอาหารเหลว แล้วนำไปหมუნเหวียงเพื่อแยกเซลล์ก่อนละลายในน้ำกลั่นที่เติม cyclohexamide 100 µg/mL เพื่อช่วยยับยั้งเชื้อรา นำเชื้อ *E. coli* ที่ได้มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงแล้ววางตัวอย่างดินที่ใช้แยกเชื้อซึ่งชุ่มด้วยน้ำกลั่นขนาดเท่าเมล็ดถั่วตรงกลางจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะ swarm colony และ fruiting body หลังจาก 1-3 สัปดาห์

3. การแยกจากวัสดุธรรมชาติ นำเปลือกไม้จากต้นไม้ที่ตายแล้วหรือยังมีชีวิตอยู่ เนื้อไม้ที่ผุพัง หรือมูลสัตว์ก้อนเล็กๆ ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดใหญ่ วางลงบนกระดาษกรองที่เติมน้ำกลั่นผสม cyclohexamide 100 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิห้อง fruiting body จะเจริญบนตัวอย่างและบนกระดาษกรอง สังเกตการเจริญของเชื้อทุกวัน โดยเฉพาะในช่วง 10 วันแรก

ตารางที่ 1 แหล่งที่พบ Myxobacteria

Table 1. Sources of Myxobacteria

Substrate	Myxobacterial species typically found
Soil	<i>Nannocystis exedens</i> , <i>Sorangium cellulosum</i> , <i>Archangium serpens</i> , <i>Corallocooccus coralloides</i> , <i>Polyangium</i> spp., <i>Cystobacter</i> spp., <i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Mx. Virescens</i> , <i>Mx. stipilatus</i>
Dung of herbivores	<i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Corallocooccus coralloides</i> , <i>Mx. Virescens</i> <i>Cystobacter fuscus</i> , <i>Cb. ferrugineus</i> , <i>Archangium serpens</i> , <i>Nannocystis exedens</i> , <i>Cb. velatus</i>
Bark and rotting wood	<i>Stigmatella aurantiaca</i> , <i>Chondromyces apiculatus</i> , <i>Sorangium</i> <i>cellulosum</i> , <i>Corallocooccus coralloides</i> , <i>Myxococcus fulvus</i> , <i>Cm. pediculatus</i> , <i>Haploangium</i> spp.

ที่มา : ดัดแปลงจาก Reichenbach และ Dworkin (1992)

Reichenbach และ Dworkin (1992 อ้างโดย Li *et al.*, 2002) ได้ศึกษาการแยกแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่ม Myxobacteria จากตัวอย่าง เช่น น้ำทะเล ทราาย และตะกอนดินในทะเล โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด water agar (WAT agar) ที่ดัดแปลงโดยการละลายวุ้น 1.5% และ CaCl₂ 0.05% ลงในน้ำทะเล นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำการ smear เชื้อ *Escherichia coli* บนผิวหน้าอาหาร WAT agar ก่อนนำทราายหรือตะกอนดินที่ผ่านการอบให้แห้งจำนวน 0.2 กรัม มาเติมลงบนเชื้อ *E. coli* โดยตรง ส่วนตัวอย่างน้ำทะเลนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.3 μm แล้วนำตะกอนบนกระดาษกรองมาเติมลงบน *E. coli* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบลักษณะของ fruiting body ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ แล้วเขียน fruiting body มาเลี้ยงในอาหาร Vy/2 สังเกตการเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ จัดจำแนกเชื้อ โดยดูลักษณะของ vegetative cell, fruiting body, myxospore และ swarms colony ดังแสดงในตารางที่ 2

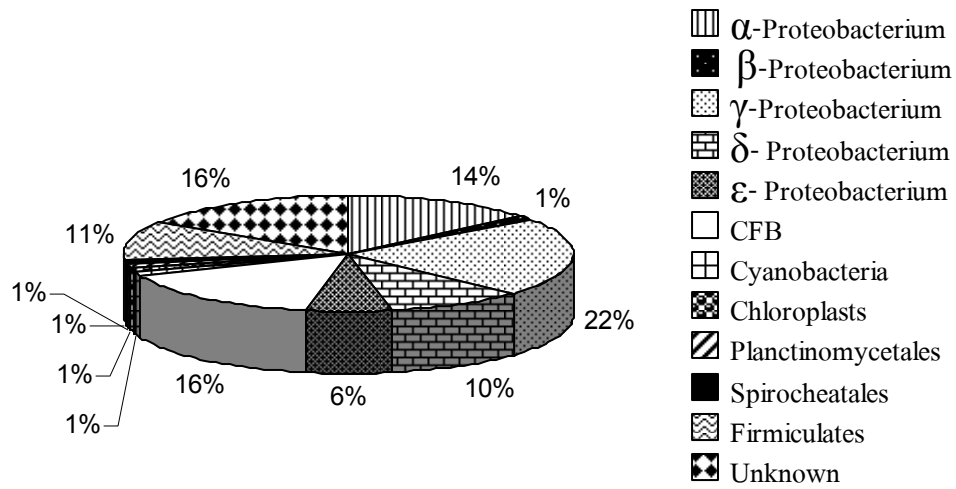
ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล

Table 2. Morphology characteristics of marine gliding bacteria

Samples	Taxonomy	Vegetative size of cells (μm)	Fruiting bodies characteristics
seawater	<i>Myxococcus</i>	6-9 \times 0.6-0.8	bright yellow, \varnothing =100-150 μm
seawater	<i>Myxococcus</i>	4-6 \times 0.8-1.0	yellow, rigid, irregular
sand	<i>Myxococcus</i>	4-6 \times 0.8-1.0	violet, \varnothing =30-50 μm
sand	<i>Corallocooccus</i>	4-6 \times 0.8-1.0	light red, irregular
sand	<i>Cystobacter</i>	8-10 \times 0.6-0.8	black, \varnothing =20-50 μm
sand	<i>Myxococcus</i>	5-7 \times 0.8-1.0	dark brown, \varnothing =20-40 μm
soil	<i>Myxococcus</i>	6-8 \times 0.8-1.0	light red, \varnothing = 80-100 μm
oyster	<i>Myxococcus</i>	4-6 \times 0.8-1.0	light yellow, \varnothing = 100-150 μm
echinus	<i>Angiococcus</i>	4-6 \times 0.8-1.0	light brown, \varnothing = 10-30 μm
seagrass	<i>Myxococcus</i>	4-6 \times 0.8-1.0	brown, \varnothing = 50-100 μm

ที่มา: คัดแปลงจาก Li และคณะ (2002)

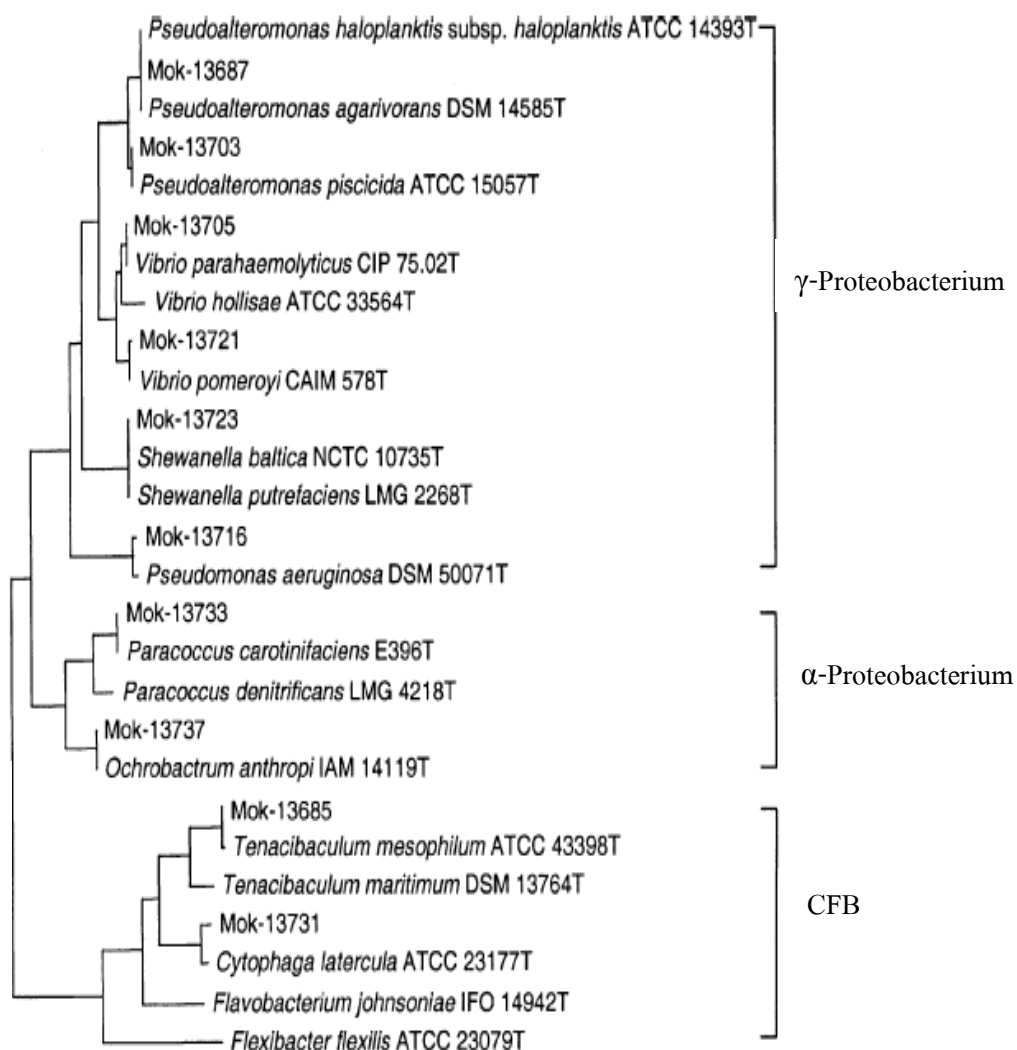
Frias-Lopez และคณะ (2002) ได้รายงานความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวของซากปะการังพบว่าเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่คือ γ -Proteobacterium รองลงมาคือ *Cytophaga-flavobacterium-Bacteriodes* (CFB) ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียไกลดิงและ α -Proteobacterium ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7 โดยแบคทีเรียกลุ่ม Proteobacterium นั้นเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เป็น dominant ในสิ่งแวดล้อมที่มีคุณสมบัติเป็นผู้ล่า (predator) แบ่งออกเป็น 5 subunits ได้แก่ α -Proteobacterium, β -Proteobacterium, γ -Proteobacterium, δ -Proteobacterium และ ϵ -Proteobacterium และเมื่อเปรียบเทียบความใกล้ชิดของแบคทีเรียในกลุ่ม Proteobacteria และ CFB พบว่าค่อนข้างใกล้ชิดกัน โดยที่แบคทีเรียไกลดิงจะจัดอยู่ในกลุ่ม δ -Proteobacterium ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่พบจากผิวของซากปะการัง

Figure 7. Percentage of bacteria isolated from dead coral surface

ที่มา : Frias-Lopez และคณะ (2002)



ภาพที่ 8 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อกลุ่ม α-Proteobacterium, γ-Proteobacterium และ CFB

Figure 8. Phylogenetic tree of α-Proteobacterium, γ-Proteobacterium and CFB

ที่มา : Lee และคณะ (2003)

3. การจัดจำแนกแบคทีเรียไกลดิง (Classification of gliding bacteria)

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไกลดิง ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากนั้นทำได้ค่อนข้างยากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เชื่อกันว่าไม่มีการสร้าง fruiting body ต่อมาเมื่อเทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล เช่น 16S rDNA sequencing และ DNA-DNA hybridization ได้พัฒนามากขึ้นทำให้การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไกลดิงมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น อนุกรมวิธานของแบคทีเรียไกลดิงโดยทั่วไปแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียไกลดิง

Table 3. Taxonomy of gliding bacteria

Class	Order	Suborder	Families	Genera		
Proteobacteriae	Myxococcales	Cystobacterineae	Myxococcaceae	<i>Myxococcus</i> , <i>Corallococcus</i> (formerly <i>Chondrococcus</i>) <i>Pyxicoccus</i> nov.gen		
			Cytobacteraceae	<i>Archangium</i> , <i>Cystobacter</i> <i>Melittangium</i> , <i>Stigmatella</i> <i>Hyalangium</i> nov.gen		
			Sorangineae	Polyangiaceae	<i>Sorangium</i> , <i>Polyangium</i> <i>Haploangium</i> , <i>Chondromyces</i> <i>Byssophaga</i> nov.gen <i>Jahnia</i> nov.gen	
				Nannocystineae	Nannocystaceae	<i>Nannocystis</i>
		Cytophagales		Kofleriaceae		<i>Kofleria</i> nov.gen <i>Haliangium</i> nov.gen
					Cytophagaceae	<i>Cytophaga</i> , <i>Sporocytophaga</i> <i>Flexibacter</i> , <i>Microscilla</i> <i>Flexithrix</i> , <i>Capnocytophaga</i> <i>Taxeobacter</i> Unnamed <i>Cytophaga</i> -like bacteria (several genera)
				Chloroflexabiineae	Chloroflexaceae	<i>Chloroflexus</i>

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (Cont.)

Class	Order	Suborder	Families	Genera
Cyanomorphae	Beggiatoales			<i>Beggiatoa</i> , <i>Thioploca</i> , <i>Thiothrix</i> , <i>Thiospirillopsis</i> , <i>Achromatium</i>
	(sulfur bacteria)			
Cyanobacteriae				<i>Oscillatoria</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Rivularia</i> , <i>Crinalium</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Synechococcus</i>
(Blue-green bacteria)		Leuchotrichales		<i>Vitreoscilla</i> , <i>Leucothrix</i> , <i>Simonsiella</i> , <i>Alysiella</i> , <i>Saprospira</i>
			Flavobacteriaceae	<i>Aequorivita</i> , <i>Arenibacter</i> , <i>Cellulophaga</i> , <i>Croceibacter</i> , <i>Fucobacter</i> , <i>Gelidibacter</i> , <i>Mesonina</i> , <i>Muricauda</i> , <i>Polaribacter</i> , <i>Psychroflexus</i> , <i>Psychroserpens</i> , <i>Ulvibacter</i> , <i>Salegentibacter</i> , <i>Zobellia</i> , <i>Tenacibaculum</i> , <i>Vitellibacter</i> , <i>Riemerella</i> , <i>Ornithobacterium</i> , <i>Coenonia</i> , <i>Myroides</i> , <i>Empedobacter</i> , <i>Bergeyella</i> , <i>Weeksella</i>

ที่มา : ดัดแปลงจาก Reichenbach (1981), McCurdy (1989), Reichenbach และ Dworkin (1992)

4. สารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial agents)

สารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ หมายถึง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ ซึ่งอาจจะได้มาจากแหล่งธรรมชาติหรือ โดยการสังเคราะห์ทางเคมี โดยทั่วไปสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย สามารถจำแนกประเภทได้ 2 วิธีด้วยกันคือ (Hugo and Russell, 1987)

4.1 จำแนกตามวิธีการออกฤทธิ์ยับยั้ง (mode of action) ซึ่งจะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

4.1.1 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic) เช่น tetracycline และ

Chloramphenicol

4.1.2 สารที่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal) เช่น penicillin, cephalosporin,

aminoglycoside และ vancomycin

4.2 จำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์ของยา (mechanisms of action) ดังแสดงในภาพที่ 7 ซึ่งสามารถแบ่งสารออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

4.2.1 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ได้แก่

- ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactam เช่น penicillin cephalosporin
- glycopeptides เช่น vancomycin
- cycloserine
- bacitracin
- fosfomycin

4.2.2 สารที่ออกฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของเซลล์เมมเบรน ได้แก่

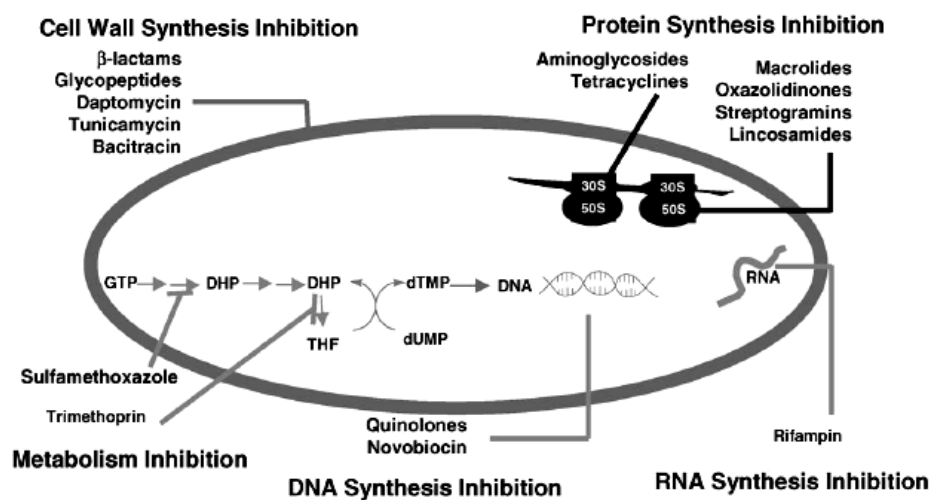
- polymyxin
- daptomycin

4.2.3 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน ได้แก่

- aminoglycosides และ spectinomycin
- tetracyclines
- chloramphenicol
- macrolide lincosamides
- fusidic acid

4.2.4 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

- ยับยั้งการสร้างสารตั้งต้น (precursor) ได้แก่ sulfonamides, trimethoprim
- ยับยั้ง DNA replication ได้แก่ quinolones
- ยับยั้ง RNA polymerase ได้แก่ rifampin



ภาพที่ 9 กลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะ

Figure 9. Mechanisms of action of antimicrobial drugs

ที่มา: Singh และ Barrett (2006)

การดื้อยาของแบคทีเรียก่อโรค (Mims *et al.*, 1993)

แบคทีเรียคือยาอาจมีอยู่ในธรรมชาติ โดยที่แบคทีเรานั้นไม่จำเป็นต้องได้รับยาต้านแบคทีเรียชนิดนั้นมาก่อนเลย แต่อาจคือตัวยางกลุ่มได้ เนื่องจากไม่มีองค์ประกอบของเซลล์ที่เป็นเป้าหมายของยา หรืออาจเกิดจากการที่ยาไม่สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดที่เคยไวต่อยาชนิดใดชนิดหนึ่งก็อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้ดื้อยานั้นได้โดยกระบวนการต่างๆ เช่น

1. การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครโมโซม เกิดยีนดื้อยา (resistant gene) ขึ้น การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติมีอัตราการเกิดที่ค่อนข้างต่ำประมาณ 10^{-8} ถึง 10^{-9} โดยทั่วไปจะพบในแบคทีเรียที่ดื้อยาสเตรปโตมัยซิน แบคทีเรียที่มียีนดื้อยาเมื่อมีการแบ่งตัวจะทำให้ได้ประชากรดื้อยาเพิ่มมากขึ้น
2. แบคทีเรียได้รับยีนดื้อยาที่อยู่บนพลาสมิด หรือทรานสโปซอนจากแบคทีเรียอื่นโดยการถ่ายเทยีน (gene transfer)

กลไกการดื้อยา

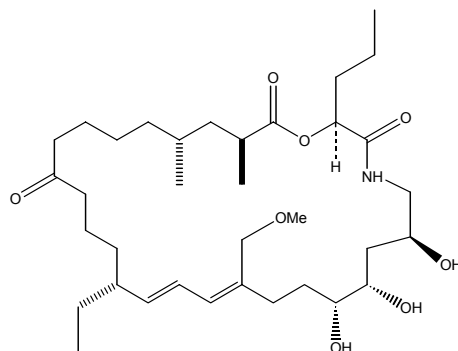
กลไกการดื้อยาเกิดจากยีนดื้อยาควบคุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ภายในเซลล์แบคทีเรีย มีผลให้เกิดการดื้อยา ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 แบบใหญ่ๆ ดังนี้ (Franklin and Snow, 1989)

1. การเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา (alteration in target site) พบในแบคทีเรียที่ดื้อยากลุ่ม macrolides, lincosamides, sulfonamides, trimethoprim และ rifampisin
2. การเปลี่ยนแปลงการนำยาเข้าสู่เซลล์ (altered uptake) อาจโดยเพิ่ม impermeability ของผนังเซลล์ หรือการขับยาออกจากเซลล์ เช่น แบคทีเรียที่ดื้อยากลุ่ม tetracycline
3. มีการสร้างเอนไซม์มาทำลายยา (drug inactivation) ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญของแบคทีเรียที่ดื้อยากลุ่ม beta-lactam โดยสร้างเอนไซม์ beta-lactamase มาช่วยพันธะในส่วนของ beta-lactam ring เกิดเป็น penicilloic acid ซึ่งไม่มีผลในการทำลายเชื้อ การดื้อยาริธีนี้สามารถถ่ายทอดผ่านทาง plasmid ได้ (Rice, 2006)

5. สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียไกลดิง

5.1 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

Myxovirescin ที่แยกได้จาก *Myxococcus virescens* มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Corynebacterium* sp., *Pasteurella* sp., *Actinomyces* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Content et al., 2003) โดยที่ Reichenbach (2001) ได้รายงานว่า myxovirescin จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในช่วงปลายของ log phase ถึง stationary phase และการผลิตสารประกอบนี้จะขึ้นอยู่กับอัตราการใช้เปปโติน และการใช้ออกซิเจนของเชื้อ โครงสร้างทางเคมีของ Myxovirescin ดังแสดงในภาพที่ 10

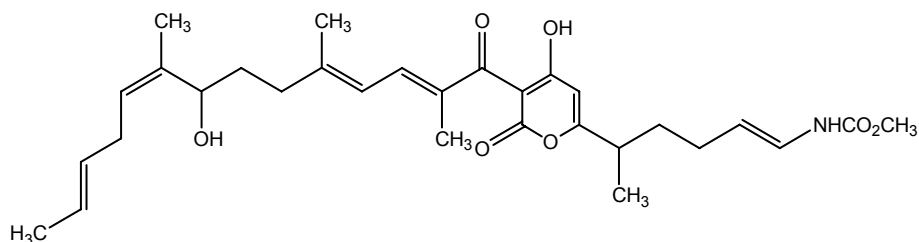


ภาพที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของ Myxovirescin

Figure 10. Chemical structure of myxovirescin

ที่มา: Content และคณะ (2003)

Corallopyronin ซึ่งแยกได้จาก *Corallocooccus coralloides* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยยับยั้งกิจกรรมของ RNA polymerase (Reichenbach, 2001) โครงสร้างทางเคมีของ Corallopyronin ดังแสดงในภาพที่ 11

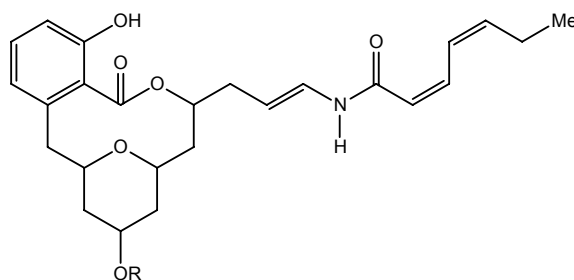


ภาพที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของ Corallopyronin

Figure 11. Chemical structure of corallopyronin

ที่มา: Alexander และคณะ (2000)

Kunze และคณะ (1998) ได้รายงานการแยกสาร Apicularens A และ B จาก *Myxobacteria Chondromyces* sp. โดยพบว่า Apicularen A สามารถละลายได้ดีในเมทานอล อะซิโตน คลอโรฟอร์ม และ เอทิลอะซิเตท มีสูตรทางเคมี คือ $C_{25}H_{31}NO_6$ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา ในขณะที่ Apicularen B ซึ่งสามารถละลายได้ดีในน้ำ มีสูตรทางเคมี คือ $C_{33}H_{44}N_2O_{11}$ ออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น โครงสร้างทางเคมีของ Apicularens A และ B ดังแสดงในภาพที่ 12



Apicularen A; R = H

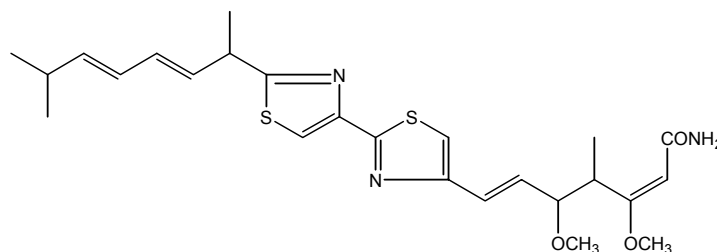
Apicularen B; R = *N*-acetyl- β -D-glucosamine

ภาพที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของ Apicularen A และ B

Figure 12. Chemical structures of apicularens A และ B

ที่มา: Kunze และคณะ (1998)

Myxothiazol ซึ่งแยกได้จาก *Myxococcus fulvus* มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยขัดขวางกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ซึ่งมีความจำเพาะกับ Complex III (bc₁-complex) ที่มีความสำคัญต่อการสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและกิจกรรมอื่นๆของเชื้อรา (Reichenbach, 2001) โครงสร้างทางเคมีของ Myxothiazol ดังแสดงในภาพที่ 13

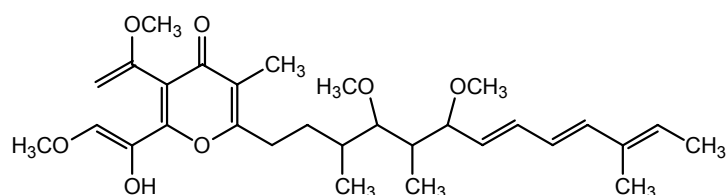


ภาพที่ 13 โครงสร้างทางเคมีของ Myxothiazol

Figure 13. Chemical structure of myxothiazol

ที่มา: Reichenbach และคณะ (2001)

Stigmatellin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่แยกได้จาก *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 โดยมีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับ myxothiazol คือ ยับยั้ง mitochondrial cytochrome *b-c* complex และ chloroplast cytochrome *b_f* complex (Richard, 1986) โครงสร้างทางเคมีของ Stigmatellin ดังแสดงในภาพที่ 14

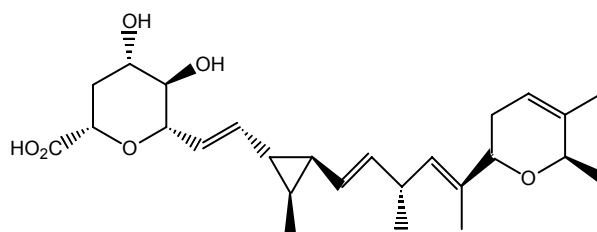


ภาพที่ 14 โครงสร้างทางเคมีของ Stigmatellin

Figure 14. Chemical structure of stigmatellin

ที่มา: Beyer และคณะ (1999)

Ambruticin เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดแรกที่แยกได้จาก Myxobacteria สายพันธุ์ *Sorangium cellulosum* (Ringel และคณะ 1977; อ้างโดย Reichenbach และ Dworkin, 1992) สารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยเฉพาะกลุ่ม *Tricophyton* และ *Microsporium* sp., *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatididis* และ *Aspergillus* sp. (Knauth และ Reichenbach, 2000) โครงสร้างทางเคมีของ Ambruticin ดังแสดงในภาพที่ 15

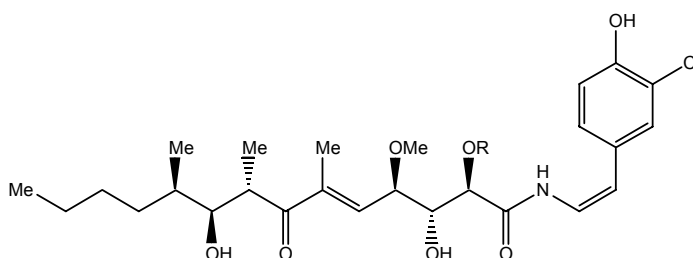


ภาพที่ 15 โครงสร้างทางเคมีของ Ambruticin

Figure 15. Chemical structure of ambruticin

ที่มา: Knauth และ Reichenbach (2000)

Jansen และคณะ (2003) รายงานการแยกและสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Chondrochlorens A และ B ซึ่งประกอบด้วย β -amino styrenes และหมู่คลอรีนที่แยกได้จาก Myxobacteria สายพันธุ์ *Chondromyces crocatus* โดยที่สารดังกล่าวจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โครงสร้างทางเคมีของ Chondrochlorens A และ B ดังแสดงในภาพที่ 16



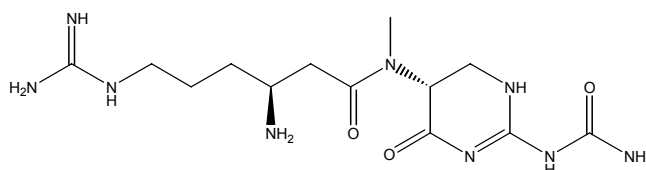
ภาพที่ 16 โครงสร้างทางเคมีของ Chondrochlorens A และ B

Figure 16. Chemical structures of chondrochlorens A และ B

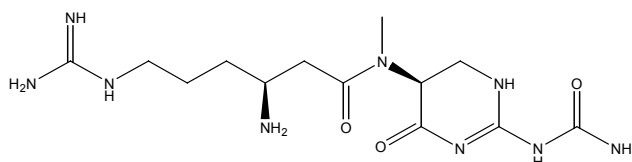
ที่มา: Jansen และคณะ (2003)

Katayama และคณะ (1993) รายงานการแยกสาร TAN-1057 A-D จาก *Flexibacter* sp. PK-74 และ PK-176 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ *Staphylococcus epidermidis* IFO3762, *Micrococcus luteus* IFO12708 และ *Staphylococcus aureus* FDA209P โครงสร้างทางเคมีของ TAN-1057 A-D ดังแสดงในภาพที่ 17

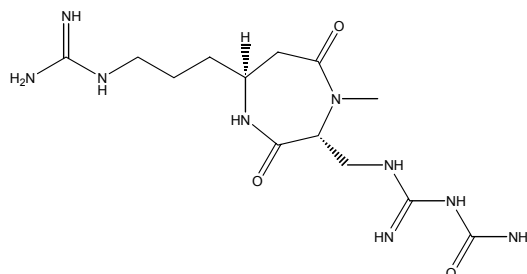
TAN-1057 A



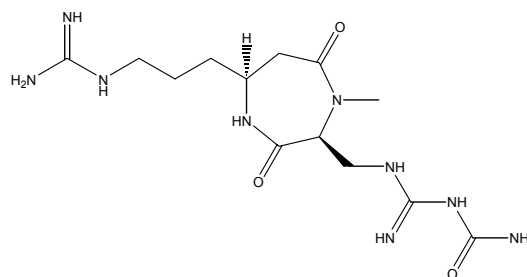
TAN-1057 B



TAN-1057 C



TAN-1057 D



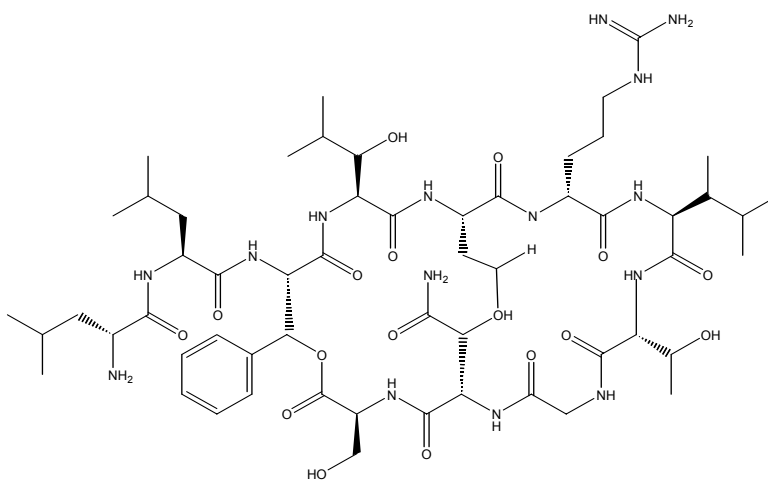
ภาพที่ 17 โครงสร้างทางเคมีของ TAN-1057 A-D

Figure 17. Chemical structures of TAN-1057 A-D

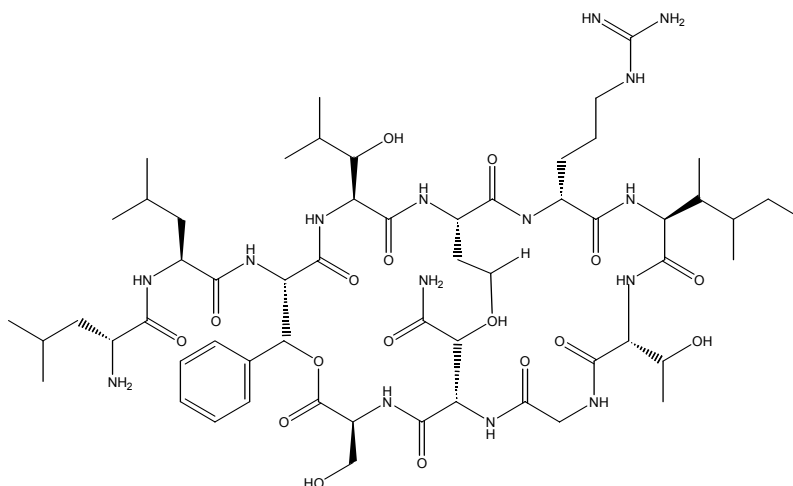
ที่มา: Katayama และคณะ (1993)

Shoji และคณะ (1988) รายงานการแยกและทำบริสุทธิ์สาร Katanosin A ($C_{57}H_{95}N_{15}O_{17}$) และ Katanosin B ($C_{58}H_{97}N_{15}O_{17}$) จากแบคทีเรียไกลดิง PBJ-5356 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* FDA JC-1, *Streptococcus pneumoniae* Type1, *Streptococcus pyrogenes* C-203 และ *Streptococcus faecalis* SR700 โครงสร้างทางเคมีของ Katanosin A และ Katanosin B ดังแสดงในภาพที่ 18

Katanosin A



Katanosin B



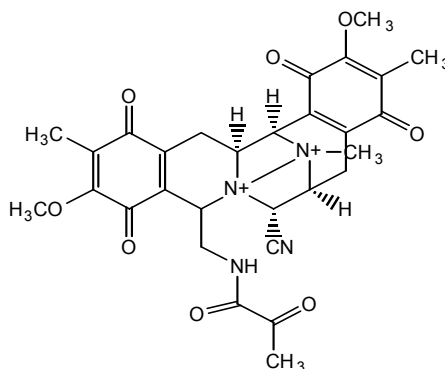
ภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีของ Katanosin A และ Katanosin B

Figure 18. Chemical structures of katanosin A และ katanosin B

ที่มา: Shoji และคณะ (1988)

5.2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

Saframycin เป็นสารกลุ่ม Isoquinoline ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งแยกได้จาก *Byssosvorax cruenta* (Myxobacteria) ที่พบในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลัง (Schmidt *et al.*, 2004) โครงสร้างทางเคมีของ Saframycin ดังแสดงในภาพที่ 19

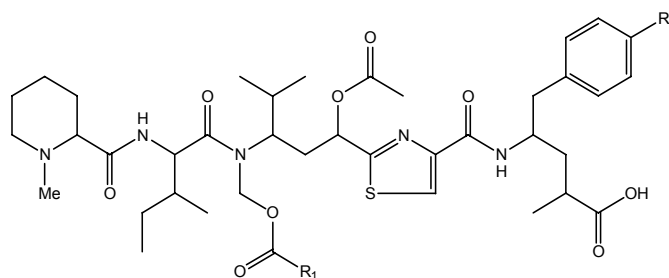


ภาพที่ 19 โครงสร้างทางเคมีของ Saframycin

Figure 19. Chemical structure of saframycin

ที่มา: Rodrigues และคณะ (2004)

Tubulysins A-E เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ที่แยกได้จาก Myxobacteria สายพันธุ์ *Archangium gephyra* และ *Angiococcus disciformis* โครงสร้างทางเคมีของ Tubulysins A, B, D และ E ดังแสดงในภาพที่ 20



Tubulysin A $R_1 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$; $R_2 = \text{OH}$; Tubulysin B $R_1 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$; $R_2 = \text{OH}$

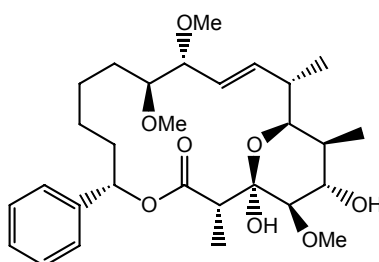
Tubulysin D $R_1 = \text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$; $R_2 = \text{H}$; Tubulysin E $R_1 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

ภาพที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของ Tubulysins A, B, D และ E

Figure 20. Chemical structures of tubulysins A, B, D และ E

ที่มา: Sasse และคณะ (2000)

Soraphen A ที่แยกได้จาก *Sorangium cellulosum* So ce26 เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งอีกชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ค่อนข้างดีและอยู่ในระหว่างการพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่เพื่อใช้รักษาโรคมะเร็ง และยังพบอีกว่าสารดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อีกด้วย (Reichenbach, 2001) โครงสร้างทางเคมีของ Soraphen A ดังแสดงในภาพที่ 21

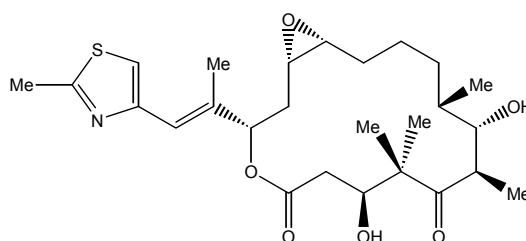


ภาพที่ 21 โครงสร้างทางเคมีของ Soraphen A

Figure 21. Chemical structure of soraphen A

ที่มา: Reichenbach (2001)

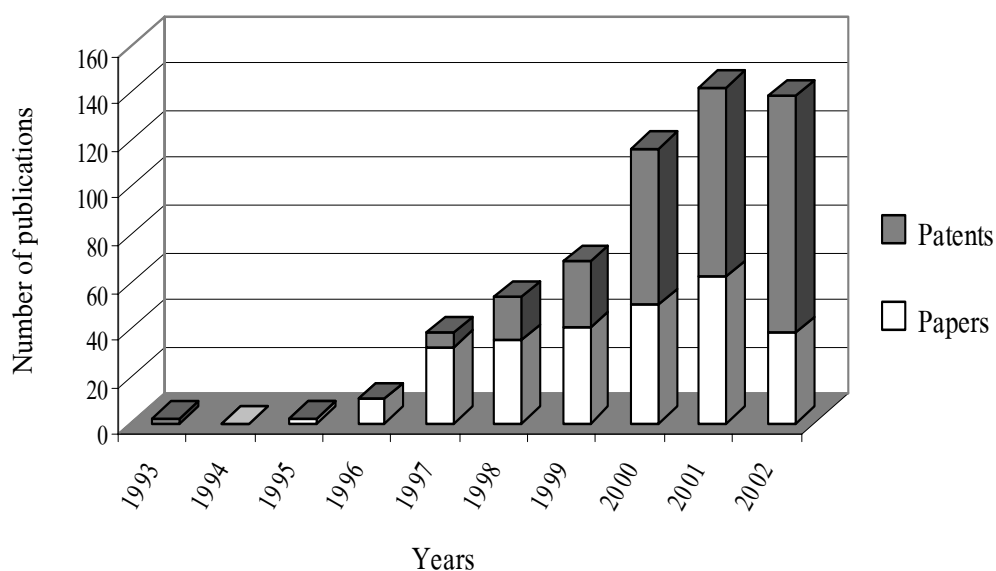
Epothilone A เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่แยกได้จาก *Sorangium cellulosum* สารประกอบชนิดนี้มีโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในภาพที่ 22 ปัจจุบัน Epothilone A อยู่ในการศึกษาขั้น Clinical trial ในระยะที่ 3 สำหรับใช้รักษาโรคมะเร็งที่ดื้อยาหลายชนิดร่วมกัน ทำให้สารประกอบชนิดนี้ได้รับความสนใจจากนักวิจัยเป็นอย่างมาก ดังจะเห็นได้จากจำนวนรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ Epothilone A ทั้งที่เป็นผลงานตีพิมพ์และสิทธิบัตรจำนวนมาก ดังแสดงในภาพที่ 23



ภาพที่ 22 โครงสร้างทางเคมีของ Epothilone A

Figure 22. Chemical structure of epothilone A

ที่มา: Reichenbach (2001)



ภาพที่ 23 จำนวนการตีพิมพ์และการจดสิทธิบัตรเกี่ยวกับ Epothilone A ตั้งแต่ ปี ค. ศ. 1993-2002

Figure 23. Numbers of publications related to epothilone A from 1993 to 2002

ที่มา : Gerth และคณะ (2003)

โดยสรุปแล้วสารเมตาบอไลต์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไกลดิงชนิดต่างๆ นั้นมีจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่ 4 แต่ส่วนใหญ่แล้วจะจำกัดอยู่แต่เฉพาะกลุ่มของ Myxobacteria ที่แยกได้จากดินเสียเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่แสดงให้เห็นว่า ศักยภาพของแบคทีเรียไกลดิงในการเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นมีไม่น้อยกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นๆ เช่น แอคติโนมัยซีทหรือเชื้อรา จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียไกลดิงชนิดใหม่ โดยเฉพาะแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลซึ่งยังมีการศึกษาอยู่ในขอบเขตที่จำกัดกล่าวคือ มีเพียงรายงานเกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลมากกว่าที่จะมุ่งเน้นการศึกษาเพื่อการใช้ประโยชน์ในการเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตารางที่ 4 สูตรเคมีและน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งแยกได้จากแบคทีเรียไกลดิ้ง

Table 4. Empirical formular and molecular weight of compounds from gliding bacteria

Compounds	Empirical Formular	Molecular weight	Sources	Biological activity	References
Althiomycin	$C_{16}H_{17}N_5O_6S_2$	439.0	<i>Myxococcus xanthus</i>	Antibacterial	Gaspari <i>et al.</i> , 2005
Saframycin	$C_{29}H_{33}N_5O_7$	563.0	Myxobacteria	Antibacterial, Cytotoxic	Schmidt <i>et al.</i> , 2004
Myxothiazol	$C_{20}H_{26}N_2O_4S_2$	422.0	<i>Myxococcus fulvus</i>	Antifungal, Cytotoxic	Reichenbach, 2001
Chondramide A	$C_{36}H_{46}N_4O_7$	646.0	Myxobacteria	Antitumor	Reichenbach, 2001
Epothilon A	$C_{26}H_{39}NO_6S$	493.0	<i>Sorangium cellulosum</i>	Cytotoxic	Reichenbach, 2001
Soraphen A	$C_{29}H_{44}O_8$	520.0	<i>Sorangium cellulosum</i>	Antifungal, Cytotoxic	Reichenbach, 2001
Apicularen A	$C_{25}H_{31}NO_6$	441.0	<i>Chondromyces</i> (Myxobacteria)	Antibacterial, Cytotoxic	Kunze <i>et al.</i> , 1998
Apicularen B	$C_{33}H_{44}N_2O_{11}$	644.0	<i>Chondromyces</i> (Myxobacteria)	Antibacterial, Cytotoxic	Kunze <i>et al.</i> , 1998
Tubulyisin A	$C_{43}H_{65}N_5O_{10}S$	843.0	<i>Archangium gephyra</i> & <i>Angiococcus disciformis</i>	Cytotoxic	Sasse <i>et al.</i> , 2000
Tubulyisin B	$C_{42}H_{63}N_5O_{10}S$	829.0	<i>Archangium gephyra</i> & <i>Angiococcus disciformis</i>	Cytotoxic	Sasse <i>et al.</i> , 2000
Tubulyisin C	$C_{43}H_5N_5O_{10}S$	767.0	<i>Archangium gephyra</i> & <i>Angiococcus disciformis</i>	Cytotoxic	Sasse <i>et al.</i> , 2000
Tubulyisin D	$C_{42}H_{63}N_5O_9S$	813.0	<i>Archangium gephyra</i> & <i>Angiococcus disciformis</i>	Cytotoxic	Sasse <i>et al.</i> , 2000
Corallopyronin	$C_{30}H_{41}NO_7$	527.0	<i>Corallocooccus coralloides</i>	Antibacterial	Alexander <i>et al.</i> , 2000

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Table 4. (Cont.)

Compounds	Empirical Formular	Molecular weight	Sources	Biological activity	References
Ambruticin S	C ₂₈ H ₄₂ O ₆	474.0	<i>Sorangium cellulosum</i>	Antifungal	Knauth and Reichenbach, 2001
Cystothiazole A	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₄ S ₂	422.0	<i>Cystobacter fuscus</i>	Antifungal	Suzuki <i>et al.</i> , 1998
Cyothiazole A	C ₂₀ H ₂₅ N ₂ O ₄ S ₂	421.0	<i>Cystobacter fuscus</i>	Antifungal	Suzuki <i>et al.</i> , 1998
Cyothiazole C	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄ S ₂	408.0	<i>Cystobacter fuscus</i>	Antifungal	Suzuki <i>et al.</i> , 1998
Cyothiazole D	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₄ S ₂	406.0	<i>Cystobacter fuscus</i>	Antifungal	Suzuki <i>et al.</i> , 1998
Cyothiazole E	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₅ S ₂	438.0	<i>Cystobacter fuscus</i>	Antifungal	Suzuki <i>et al.</i> , 1998
Chondrochloren A	C ₂₇ H ₄₀ ClNO ₇	525.45	<i>Chondromyces crocatus</i>	Antifungal	Jansen <i>et al.</i> , 2003
Chondrochloren B	C ₂₈ H ₄₂ ClNO ₇	539.45	<i>Chondromyces crocatus</i>	Antifungal	Jansen <i>et al.</i> , 2003
Argyrin	C ₄₀ H ₄₄ N ₁₀ O ₈ S	824.0	<i>Archangium gephyra</i>	Cytotoxic	Vollbrecht <i>et al.</i> , 2002
Haliangicin	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	376.0	<i>Haliangium luteum</i>	Antifungal	Fudou <i>et al.</i> , 2001
Rhizopodin	C ₃₉ H ₆₂ N ₂ O ₁₁	734.0	<i>Myxococcus stipitatus</i>	Cytotoxic	Reichenbach, 2001
Methiazole B	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₄ S ₂	420.0	<i>Archangium gephyra</i> & <i>Myxococcus stipitatus</i>	Antifungal	Sasse <i>et al.</i> , 2000
Methiazole C	C ₁₆ H ₂₁ NO ₅ S	339.0	<i>Archangium gephyra</i> & <i>Myxococcus stipitatus</i>	Antifungal	Sasse <i>et al.</i> , 2000
Methiazole D	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₄ S ₂	424.0	<i>Archangium gephyra</i> & <i>Myxococcus stipitatus</i>	Antifungal	Sasse <i>et al.</i> , 2000

6. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาร

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสาร (Identification of compound)

1. การตรวจสอบขั้นต้น (Preliminary Examination) โดยแบ่งเป็นการตรวจสอบ physical state เพื่อดูว่าสารนั้นเป็นของแข็งหรือของเหลว สีที่เปลี่ยนไปขณะหาจุดเดือด และ Ignition test ซึ่งใช้บอกชนิดและปริมาณของ hydrocarbon

2. การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (Physical property) เช่น จุดเยือกแข็ง (freezing point), ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity), ค่าดัชนีการหักเหแสง (refractive index), optical rotation และ molecular weight เป็นต้น

3. การทดสอบคุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) เป็นวิธีวิเคราะห์คุณสมบัติและสูตรโครงสร้างโดยอาศัยการวัดและวิเคราะห์รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic radiation) ซึ่งถูกสารดูดกลืนหรือเปล่งออกมาจากสาร และบันทึกข้อมูลการดูดกลืนแสงในรูปของสเปกตรัม ทั้งนี้สารจากธรรมชาติแต่ละชนิดจะมีสเปกตรัมซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัว การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารอาจทำได้โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่รู้โครงสร้างหรือที่มีรายงานไว้แล้ว สำหรับสารชนิดใหม่จะต้องอาศัยสเปกตรัมและข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น UV spectroscopy, Infrared spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy และ Mass spectrometry ประกอบกัน จึงจะสามารถวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีได้

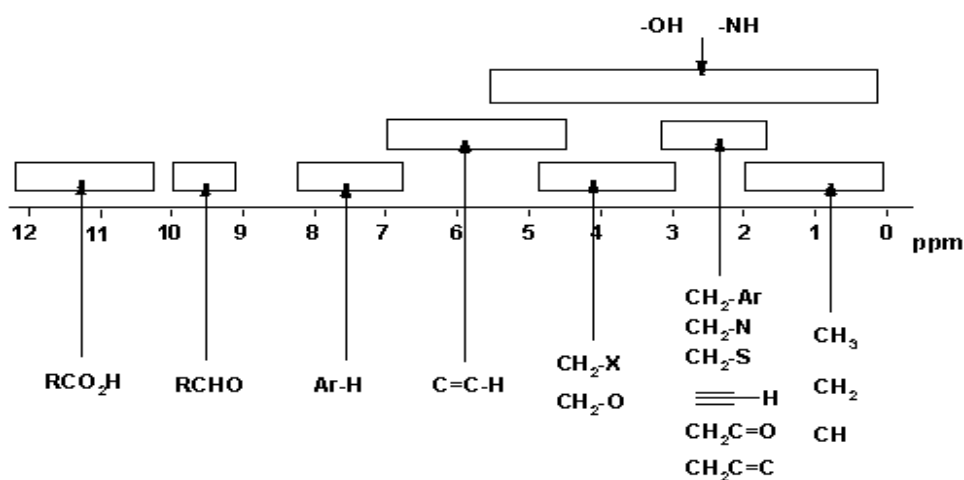
Ultraviolet spectroscopy (UV Spectroscopy) (Crew *et al.*, 1998) เป็นเทคนิคที่ใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตผ่านเข้าสู่โมเลกุลของสารอินทรีย์ ซึ่งส่วนหนึ่งของรังสีจะถูกดูดกลืนไว้ ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลนั้นเกิดทรานซิชัน กล่าวคืออิเล็กตรอนที่สถานะพื้น (ground state) จะถูกกระตุ้นให้ขึ้นไปสู่สถานะกระตุ้น (excited state) ซึ่งการทรานซิชันของอิเล็กตรอนจะใช้พลังงานสูงกว่าการสั่น และการหมุนของโมเลกุล เมื่ออิเล็กตรอนในโมเลกุลถูกกระตุ้นจึงทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการสั่น และการหมุนควบคู่ไปด้วยเสมอ

การวัดการดูดกลืนแสงของสารในสารละลายที่เจือจางในช่วงความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร (nm) สำหรับสารที่มีสี ส่วนสารที่ไม่มีสีวัดที่ 200-400 นาโนเมตร (nm) สิ่งสำคัญในการตรวจเอกลักษณ์คือ ความยาวช่วงคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุดหรือต่ำสุดของสาร และความเข้มข้นของการดูดกลืนแสง

Infrared spectroscopy (IR) (Silverstein and Webster, 1998) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ โดยศึกษาการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสาร ซึ่งเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างคลื่นอินฟราเรดและโมเลกุลของสาร โดยเมื่อสารอินทรีย์ดูดกลืนรังสีอินฟราเรด รังสีจะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานของการสั่นของโมเลกุล (energy of molecular vibration)

รังสีที่ถูกดูดกลืนจะมีค่าที่แน่นอน (quantized) ทำให้สเปกตรัมที่ได้จะปรากฏเป็นแถบดูดกลืน จาก IR สเปกตรัมสามารถบอกหมู่ฟังก์ชันและประเภทของสารได้ ทั้งนี้สารที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะต้องเป็นสารบริสุทธิ์

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) (Silverstein and Webster, 1998) เป็นการวิเคราะห์ทางสเปกโตรสโกปีของสาร โดยการวัด magnetic moment ของ H-atom เนื่องจาก H-atom ที่ติดอยู่กับหมู่ฟังก์ชันแต่ละอย่างจะมีค่า magnetic moment แตกต่างกัน เช่น CH_2 , CH_3 , NH_2 เป็นต้น จากสเปกตรัมของ NMR สามารถจะบอกจำนวนของ H และชนิดของ carbon skeleton ที่ H จับอยู่นอกจากนี้ค่า chemical shift (δ =delta) ของสารก็สามารถใช้สำหรับการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างได้เช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น สารที่เป็น saturated compound จะมีค่า δ น้อยกว่าสารที่เป็น unsaturated compound และสเปกตรัมของ NMR จะค่อนข้างซับซ้อนเนื่องจากผลของสนามแม่เหล็กที่เกิดจากอะตอมข้างเคียง ทำให้สัญญาณที่ปรากฏนั้นมีความซับซ้อน (multiplicity) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างจากข้อมูล ^1H NMR สเปกตรัม สามารถทราบหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างได้จากค่า chemical shift (δ) ดังแสดงในภาพที่ 24



ภาพที่ 24 ค่า chemical shifts ของโปรตอนในสภาพแวดล้อมต่างๆ

Figure 24. Proton chemical shifts

ที่มา : พิมพีจิต และวัชรินทร์ (2542)

Mass spectrometry (Silverstein and Webster, 1998) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารที่อาศัยการระเหยตัวอย่างในระบบที่มีความดันต่ำ ซึ่งสารจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นไอออน (ionization) ทำให้เกิดการแตกออกของโครงสร้างได้อิออนประจุบวก (positive ion) และกระจายตัว ดังนั้นจึงสามารถวัดปริมาณไอออนสัมพัทธ์ได้เป็นมวลต่อประจุ (m/z) ของไอออน ข้อมูลดังกล่าวจะใช้สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง

4. การทดสอบคุณสมบัติโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี (Chromatography) วิธีทางโครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบ ชนิดและปริมาณของสารประกอบต่างๆ ทั้งในรูปที่เป็นสารบริสุทธิ์ และสารไม่บริสุทธิ์ และใช้ในการแยกสารประกอบออกจากกัน เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติการกระจายตัวของสารในตัวทำละลายอยู่กับที่ (stationary phase) และ ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสารที่มีการกระจายตัวได้ดีในตัวทำละลายเคลื่อนที่ จะเคลื่อนที่ไปกับตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่กระจายตัวได้ดีในตัวทำละลายอยู่กับที่ ทำให้เกิดการแยกของสารขึ้น (Keese and Brandle, 2006)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ซึ่งอาศัยหลักของการดูดซับ การแลกเปลี่ยนไอออน ขนาด โมเลกุล หรือความสามารถในการละลาย แตกต่างกันไปตามชนิดของวัสดุที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ (packing material) มีตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นของเหลว HPLC สามารถบอกความแตกต่างของกลุ่มสาร โดยเปรียบเทียบจาก retention time ที่สถานะของตัวทำละลายเคลื่อนที่เหมือนกันและยังสามารถคำนวณปริมาณของสาร โดยดูจากพื้นที่ใต้พีคของสารแต่ละชนิดได้อีกด้วย

Paper Chromatography และ Thin Layer Chromatography เป็นโครมาโตกราฟีซึ่งมีตัวทำละลายอยู่กับที่เป็นกระดาษหรือซิลิกาที่เคลือบอยู่บนวัสดุชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น แก้ว อลูมิเนียม หรือพลาสติก เป็นต้น สารตัวอย่างที่มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายเคลื่อนที่สูงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายอยู่กับที่ โดยความสัมพันธ์ของระยะทางการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดจากจุดเริ่มต้นกับระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายอยู่กับที่จากจุดเริ่มต้น สามารถนำมาคำนวณเป็นค่า R_f ดังสมการข้างล่างนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}$$

โดยทั่วไปค่า R_f ของสารชนิดเดียวกันภายใต้การแยกที่สถานะเหมือนกันจะมีค่าคงที่ จึงสามารถใช้ค่า R_f ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบชนิดของสารได้โดยเปรียบเทียบกับค่า R_f ของสารอ้างอิงมาตรฐาน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดกรองสารสกัดหายของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลที่สามารถยับยั้งการเจริญของ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella* Typhi (clinical strain) และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้

2. เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลที่สามารถผลิตสารยับยั้ง Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella* Typhi (clinical strain) และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 โดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบ

จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบ ประกอบด้วยแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Salmonella Typhi* เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย ณ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

2.1 อาหารสำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล

- Na-glutamate medium
- Na-glutamate medium with crystal violet
- SAP2 agar medium

2.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล

- อาหารสูตร RL1
- อาหารสูตร SK
- อาหารสูตร CY
- อาหารสูตร VY/2

2.3 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบและใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

- Nutrient Agar (Merck)
- Nutrient Broth (Merck)
- RPMI1640 (Merck)

3. สารเคมี

- Tryptone (Difco)
- Yeast Extract (HIMEDIA)
- Peptone (HIMEDIA)
- Baker's yeast paste (Merck)
- Casitone (Difco)
- Malt Extract (HIMEDIA)
- Skim milk (HIMEDIA)
- Agar (Merck)
- Vitamin B₁₂ (Fluka)
- L-glutamic acid monosodium salt (UNIVAR, Ajax Finechem)
- NH₄NO₃ (UNIVAR, Ajax Finechem)
- K₂HPO₄ (UNIVAR, Ajax Finechem)
- MgSO₄ (UNIVAR, Ajax Finechem)
- Methanol (commercial grade) (LAB-SCAN)
- Methanol (HPLC grade) (LAB-SCAN)
- Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma)
- Alamar Blue 0.9% (Sigma)
- Crystal violet (Fluka)
- Vancomycin (Sigma)
- Wagner's reagent (UNIVAR, APS)
- Vanillin in H₂SO₄ (Fluka)
- Ninhydrin (Sigma)
- Amberlite XAD-16 resin (Fluka)
- TLC Alumina Sheets silica gel 60 F₂₅₄ (Fluka)

อุปกรณ์

- งานเพาะเชื้อ (microtitreplate)
- ปากคีบ
- มีดผ่าตัด
- ตู้ปลอดเชื้อ (Caution, Sciencetech)
- กล้องจุลทรรศน์ (Nikon)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (LA230s, Sartorius)
- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Buchi)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Atomic absorption spectrophotometer: Analyst 100 spectrometer, PerkinElmer)
- เครื่อง Analytical High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Hewlett Peckard[®] Agilent 1100, ChemStation software (version A8.01)), quaternary pump (Agilent G1311A) ตรวจวัดด้วย diode array detector (Agilent G1315A) และมี auto sampler (Agilent G1313A) เป็น injector port
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, Tomy, SS-325)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubation) รุ่น VS-8480SRN
- เครื่อง Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400

วิธีการ

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่าง (ฟองน้ำ กัลปังหา สาหร่าย ปะการัง ชันไม้ เศษเชือก เปลือกหอย เพรียงหัวหอม ซากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และฟิล์มชีวภาพ) จากทะเลทางฝั่งอันดามันและอ่าวไทย บริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี, หาดหยงหลิง, หาดยาว และท่าเรือปากเมง จังหวัดตรัง สุสานหอย 75 ล้านปี จังหวัดกระบี่ หาดสุรินทร์, หาดในยาง และหาดในหาน จังหวัดภูเก็ต เกาะกระ จังหวัดนครศรีธรรมราช หาดเจ้าสำราญ และหาดปึกเตียน จังหวัดเพชรบุรี อ่างศิลา, แหลมแท่นและสัตว์หีบ จังหวัดชลบุรี โดยแบ่งออกเป็นการเก็บตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งและบริเวณน้ำลึก การเก็บตัวอย่างบริเวณชายฝั่งกระทำโดยการสวมถุงมือแล้วหยิบตัวอย่างหรือใช้ปากกิบ คีบใส่ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิท บันทึกชื่อตัวอย่าง สถานที่เก็บ วันที่เก็บ และ หมายเลขตัวอย่างบนถุง ส่วนการเก็บตัวอย่างบริเวณน้ำลึกจะอาศัยนักประดาน้ำช่วยในการเก็บ นักประดาน้ำจะเก็บตัวอย่างใส่ถุงตาข่ายหลังจากขึ้นมาจากเรือจะนำตัวอย่างมาแยกประเภท บันทึกชื่อตัวอย่าง สถานที่เก็บ วันที่เก็บ ระดับความลึกที่เก็บ และหมายเลขตัวอย่างบนถุง เก็บรักษาตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่ให้ตัวอย่างสัมผัสกับน้ำแข็งโดยตรง เพื่อป้องกันการทำลายเชื้อจากความเย็น และทำการแยกเชื้อทันทีที่กลับถึงฝั่ง ซึ่งใช้เวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมง

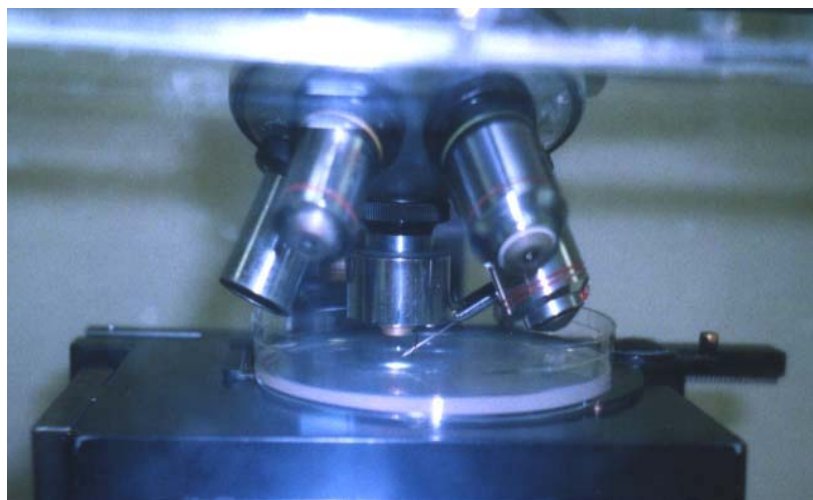
1.2 การแยกและทำให้บริสุทธิ์เชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล

นำตัวอย่างจากข้อ 1.1 มาล้างด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยเทน้ำทะเลผ่านตัวอย่างให้ทั่วบริเวณผิวตัวอย่าง เพื่อกำจัดจุลินทรีย์อื่นๆที่ปนเปื้อนอยู่ที่ผิวตัวอย่างออกไป ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร ด้วยมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อก่อนนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Na-glutamate medium และ Na-glutamate medium ที่เติม crystal violet ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและกระตุ้นการสร้าง fruiting body บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไกลดิงที่เป็น swarm colony ถ่ายเชื้อโดยตัดชิ้นวัณบริเวณขอบของ swarm colony ด้วยมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร วางบนอาหาร SAP2 agar medium ซึ่งเป็น minimum medium ที่เหมาะสมในการใช้แยกแบคทีเรียไกลดิง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียไกลดิงเจริญช้ากว่าแบคทีเรียอื่นๆ หากใช้อาหารที่มีความสมบูรณ์ เชื้อแบคทีเรียอื่นๆที่โตเร็วกว่าหรือเชื่อกว่าก็จะเจริญทับโคโลนีของแบคทีเรียไกลดิง ทำให้ไม่สามารถสังเกตลักษณะโคโลนีได้โดยง่าย ทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหาร SAP2 agar medium ข้างบนได้เชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยการย้อมแกรมและคุณลักษณะของการเคลื่อนที่ (gliding motility) (การเตรียมตัวอย่างเพื่อคุณลักษณะการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียไกลดิงด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ phase contrast มีรายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค) หากพบว่า swarm colony ที่ได้ยังคงปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์อื่น ก็จะเปลี่ยนวิธีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้ micromanipulator ตามวิธีการในข้อ 1.3 ต่อไป

1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลให้บริสุทธิ์โดยใช้ micromanipulator

นำเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่เจริญบนอาหาร SAP2 agar เป็นเวลา 2 วัน มาเขี่ยเชื้อเพื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วย microneedle ซึ่งติดอยู่กับเครื่อง micromanipulator ดังแสดงในภาพที่ 25 โดยใช้เลนส์ที่กำลังขยาย 40 เท่า เขี่ยเชื้อในรูปของเซลล์เดี่ยวๆ (single cell isolation) มาวางบนอาหาร SAP2 agar ทิ้งไว้ให้เชื้อเจริญแล้วนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยการย้อมแกรมดูรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากยังมีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์อื่น จะทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นจนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์



ภาพที่ 25 การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลให้บริสุทธิ์โดยใช้ micromanipulator

Figure 25. Purification of marine gliding bacteria by micromanipulator

2. การจัดจำแนกแบคทีเรียไกลดิงโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

นำเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี ทั้งหมด 21 ไอโซเลต มาจัดจำแนกชนิดโดยอาศัยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Nakagawa และคณะ (2001)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

สารสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลจะใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของบริษัท Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) ประเทศสหรัฐอเมริกาและวิธีการตามที่กำหนดโดยผู้ผลิตชุดสกัด ตามรายละเอียดดังนี้คือ ปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000-16000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ นำเซลล์ที่ได้จากการตกตะกอนมาละลายใน 50 mM EDTA buffer (pH 8.0) ปริมาตร 480 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม lytic enzyme (10 mg/ml lysozyme) ปริมาตร 120 ไมโครลิตร (ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที) เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ นำสารละลายใน microtube ไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13000-16000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติสารละลายที่เติม Nuclei lysis ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง) เพื่อย่อยสลายนิวเคลียส เติม RNase solution ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ผสมให้เข้ากัน นาน 2-5 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที) เพื่อย่อยสลายอาร์เอ็นเอ ทิ้งให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง เติม protein precipitation solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วนำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 20 วินาที บ่มในน้ำแข็ง 5 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000-16000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนของสารละลายมาเติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (ผสมให้เข้ากัน) เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถสังเกตเห็นสายดีเอ็นเอได้ จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000-16000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติสารละลายที่ล้างดีเอ็นเอโดยการเติม 70% ethanol เขย่าแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000-16000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติสารละลาย 70% ethanol ที่วางไว้ ethanol ระเหย เติม DNA rehydration ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA โดยวิธี PCR (Amplification of 16S rDNA gene by PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.1 มาเพิ่มปริมาณโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Nakagawa และคณะ (2001)

2.2.1 การเตรียม reaction mixture สำหรับ PCR

เติม 10 x Ex taq buffer 5 ไมโครลิตร, dNTP mixture (20 mM) 4 ไมโครลิตร, Primer BF1 (20 μ M) และ Primer BR1 (20 μ M) อย่างละ 1 ไมโครลิตร, Taq polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.25 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ปริมาตรรวม 50

ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ใน microAmp reaction tube ให้ได้ปริมาตรเท่าๆกัน เติมดีเอ็นเอที่สกัดได้ลงไป 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยมีสภาวะของการทำงานของเครื่องดังนี้

25 cycles	{	95°C, 2 min	}	Denaturing
		95°C, 30 sec		
		55°C, 30 sec	}	Annealing
		72°C, 1 min		
		72°C, 5 min	}	Extension

Forward primer คือ BF1 (5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3')

Reversed primer คือ BR1 (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3')

2.2.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของ 16S rDNA

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของ 16S rDNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของ agarose gel และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่ผ่านการแยกแล้วจะย้อมด้วย ethidium bromide solution เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณดีเอ็นเอที่จะเรืองแสงภายใต้แสง UV ทำให้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ขั้นตอนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis ทำได้โดยเตรียม 1% agarose gel ด้วย 1xTE buffer pH 8.0 รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาทีแล้วดึงหัวออกจะได้เจลที่มีช่องสำหรับ load ดีเอ็นเอ แล้วเปิด 5x dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ PCR product ที่ได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บนแผ่น parafilm เติมดีเอ็นเอลงในช่องเจล ซึ่งใช้ 1xTAE buffer เป็นอิเล็กโทรไลต์ และใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 50 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ใน ethidium bromide solution 1 นาที ล้างสีย้อมโดยแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปส่องภายใต้แสง UV ซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสง วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับ DNA marker

2.3 การทำบริสุทธิ์ของ amplified PCR products โดยใช้ GFX PCR DNA และ Gel Band Purification Kits

นำ GFX column ใส่ใน collection tube เติม capture buffer 500 ไมโครลิตร ลงไปใน GFX column ถ่าย amplified PCR products (ประมาณ 48 ไมโครลิตร) ใส่ลงใน GFX column ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต ดูดขึ้นลง 4-6 ครั้ง หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 X g นาน 30 วินาที นำส่วนที่แยกได้ในหลอด collection tube ที่ทิ้งไป ล้างตัวอย่างโดยเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน GFX column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 X g นาน 30 วินาที นำส่วนของ collection tube ที่ทิ้งไป นำส่วน GFX column ไปใส่ใน 1.5 มิลลิลิตร microtube อันใหม่ เติม TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในส่วนของ GFX column บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 X g 30 วินาที จะได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์อยู่ใน microtube

2.4 การหาลำดับเบสของ 16S rDNA (Sequencing of PCR amplified 16S rDNA)

นำ amplified PCR products ที่ทำบริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับเบสโดยการส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen Incorporation ประเทศเกาหลี ซึ่งจะใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer, Wellesley, MA)

2.5 การสร้าง Phylogenetic tree

1. ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน 16S rDNA ของเชื้ออ้างอิงที่ต้องการเปรียบเทียบจากเว็บไซต์ <http://srs.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html> โดยพิมพ์ชื่อเชื้อ ชื่อสายพันธุ์ หรือ Accession number ของเชื้อที่ต้องการค้นหาลงในช่อง Keywords คลิกเลือก Accession number ของเชื้อที่ต้องการ เลือก FastaSeqs เพื่อคัดลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูป FASTA ของเชื่อนั้นๆ ทำการคัดลอกนิวคลีโอไทด์ลงในโปรแกรม Notepad โดยนำรหัสของแต่ละเชื้อใน Notepad ต้องมีเครื่องหมาย > และรหัสของเชื้อต้องไม่เกิน 30 ตัวอักษร ต้องไม่มีช่องว่างระหว่างตัวอักษร บันทึกข้อมูลเป็น*.txt

2. เปิดโปรแกรม Clustalx แล้วคลิก Load Sequences เปิด file Notepad ที่คัดลอกลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ จากนั้นคลิก Alignment แล้วคลิกเลือก Do Complete Alignment จากนั้นคลิก ALIGN รอจนกว่าโปรแกรมจะทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ละเชื้อจนเสร็จ

3. เปิดโปรแกรม Bioedit คลิก file เลือก New Alignment จากนั้นคลิกไฟล์ เลือก Import เลือก Sequences alignment file จากนั้นเปิดไฟล์ที่ผ่านการทำ alignment มาแล้วด้วยโปรแกรม clustalx version 1.83 ซึ่งจะถูกบันทึกโดยอัตโนมัติเป็น file*.aln เลื่อนเมาส์ไปที่แถบเครื่องมือของหน้าต่างข้างในคลิก Back-colored view mode จะทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวมี

สีแตกต่างกันเพื่อง่ายต่อการสังเกต เลื่อนเมาส์ไปที่ช่องว่าง mode คลิก Edit ซึ่งทำให้สามารถแก้ไขข้อมูลนิวคลีโอไทด์ได้

4. แก้ไขข้อมูลนิวคลีโอไทด์โดยลบช่องว่าง และลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นที่มีใช้ A T C และ G เช่น N M Y และอื่นๆออก ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆเหล่านี้มักถูก labeled ด้วยสีม่วง สำหรับวิธีการลบทำได้โดยเลื่อนเมาส์ไปคลิกที่ด้านบนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชือกตัวแรกสุด ตรงตำแหน่งที่ตรงกับช่องว่าง จากนั้นทำการลบโดยกด Del บันทึกข้อมูลที่ได้ทำการแก้ไขเรียบร้อยแล้วโดยคลิกไฟล์ เลือก Save as บันทึกข้อมูลเป็น file Fasta (*.fas, *.fst, *.fsa)

5. เปิดโปรแกรม clustalx คลิกไฟล์ เลือก Load Sequences เปิด Fasta file ที่ทำการบันทึกไว้ในข้อ 4 จากนั้นเลื่อนเมาส์ไปที่แถบเมนูคลิก Tree เลือก Bootstrap N-J Tree จะปรากฏหน้าต่างเล็กคลิก OK โปรแกรมจะทำการสร้าง Phylogenetic tree

6. เปิดโปรแกรม N-J plot จากนั้นคลิกไฟล์ คลิกเปิด file TreeView ที่ได้จากข้อ 5 คลิก New outgroup หน้าเชื่อมที่ต้องการจัดให้เป็น outgroup เช่น *E. coli*

7. คัดลอก Phylogenetic Tree มาแก้ไขให้สมบูรณ์ในโปรแกรม Microsoft Word หรือ Microsoft Powerpoint โดยการคลิก Edit เลือก Copy แล้วนำไปวางในโปรแกรมที่ต้องการแก้ไข

3. การคัดกรองสารสกัดหยาบของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

3.1 การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่เหมาะสม ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อทดสอบ ได้แก่ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella* Typhi และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 บนอาหาร nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อที่เจริญมา 1 loop นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร RPMI 1640 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 10^1 ถึง 10^5 เท่า ในอาหารเหลว RPMI 1640 ทำเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 นำแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาเติม AlamarBlue ในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ปิดฝาขวดและใส่ใน microtitreplate ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละระดับความเข้มข้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของ AlamarBlue แต่ละหลุม ส่วนชุดการทดลองที่ 2 นำแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ไปทำ total viable count โดยวิธี spread plate และวัดค่าการ

ดูคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมจะพิจารณาจากความ
จำนวนของเชื้อที่ทำให้ AlamarBlue เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู ที่เวลา 15 ชั่วโมง ทำการเจือจาง
เชื้อแบคทีเรียทดสอบแต่ละสายพันธุ์ให้มีค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงในตารางที่ 9 เพื่อใช้เป็นค่า
ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อทดสอบในครั้งต่อไป (สุกานันท์ แซ่ลิ้ม, 2548)

3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เลี้ยงเชื้อทดสอบ ได้แก่ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella Typhi* และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 บนอาหาร nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจี่ยเชื้อที่เจริญมา 1 loop นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร RPMI 1640 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรโดยเจือจางสารละลายเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ให้ได้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นที่เหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ MRSA เท่ากับ 1.7×10^6 CFU/ml, VRE เท่ากับ 1.3×10^7 CFU/ml, *B. subtilis* เท่ากับ 3.0×10^6 CFU/ml, *Sal. Typhi* เท่ากับ 2.1×10^6 CFU/ml และ *P.aeruginosa* เท่ากับ 2.2×10^6 CFU/ml แล้วนำมาเติมสารละลาย AlamarBlue ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของสารแขวนลอยเชื้อ ผสมให้เข้ากัน เพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบต่อไป

3.3 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 1.3 ซึ่งเจริญบน SAP2 agar medium มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร ประมาณ 10 ชิ้น ใส่ลงในพลาสติกที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด SAP2 medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อ 10% ลงในอาหารเหลว 4 สูตรที่ต่างกัน ได้แก่ RL1, SK, CY และ VY/2 (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม amberlite XAD-16 resin ปริมาตร 2 กรัม สำหรับดูดซับ secondary metabolites แล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน นำอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้วมากรองแยก resin ออก ล้าง resin ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ะสารที่อยู่ใน resin ด้วยการแช่ resin ในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร นาน 6 ชั่วโมง กรองแยก resin ออกแล้วระเหยเมทานอลออกโดย rotary evaporator นำสารสกัดหยาบที่ได้เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

การศึกษาครั้งนี้ได้นำสารสกัดหยาบที่แยกได้จากแบคทีเรียไกลดิงที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการจำนวน 227 ตัวอย่าง มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบร่วมด้วย (ตารางที่ 14 ในภาคผนวก ง)

3.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น

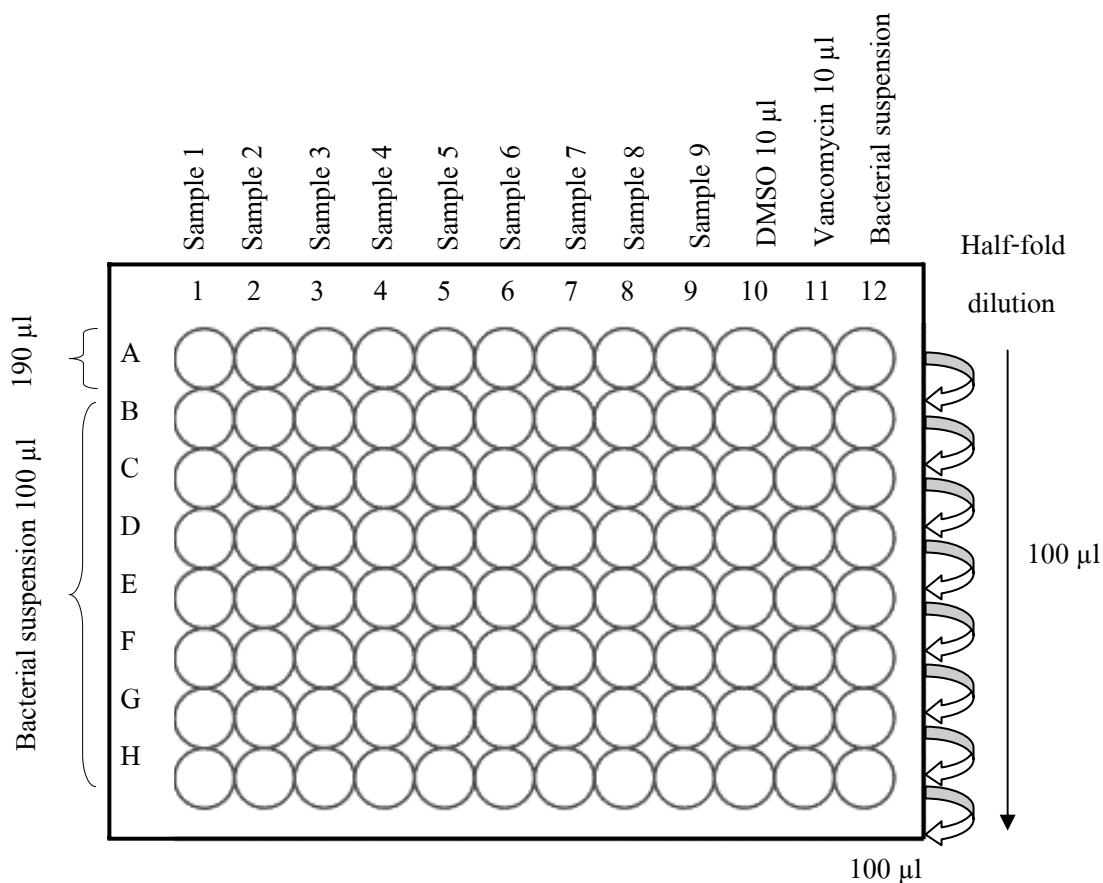
ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี colorimetric microdilution broth ซึ่งมี AlamarBlue เป็นอินดิเคเตอร์เพื่อความสะดวกในการติดตามและตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งโดยที่ AlamarBlue จะมีสีน้ำเงินเมื่ออยู่ในรูป resazurin แต่เมื่อถูกรีดิวซ์จากการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบจะเปลี่ยนเป็น resorufin ที่มีสีชมพูแดง การเปลี่ยนแปลงของสีจากปฏิกิริยารีดักชันนี้จะมี ความจำเพาะกับ NADPH/NADP, FAD, FMNH/FMN และ NADH/NAD ที่เพิ่มขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ จึงทำให้วิธีทดสอบดังกล่าวมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (Baker and Tenover, 1996; Lancaster and Fields, 1996)

นำสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายชนิดเมทานอล ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ใส่ใน microtitreplate ชนิด 96 หลุม โดยเติมสารสกัดหยาบละ 2 หลุม ของคอลัมน์ที่ 1-9 (จะสามารถทดสอบได้ ทั้งหมด 36 สารต่อ 1 microtitreplate) ตั้งทิ้งไว้จนเมทานอลระเหยหมด แล้วละลายสารสกัดหยาบด้วย DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จะทำให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบในแต่ละหลุมเท่ากับ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เหตุผลที่เลือกใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบเท่ากับ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิงที่นำมาทดสอบมีจำนวนมากและต้องการคัดเลือกให้ได้เฉพาะสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ที่ดี ให้ค่า MIC ในช่วงที่เหมาะสม จากนั้นจึงเติมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ คือ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella* Typhi และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ซึ่งผสมอยู่กับ AlamarBlue 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 90 ไมโครลิตร (เติมทุกหลุมในคอลัมน์ที่ 1-9) โดยจะใช้เชื้อทดสอบ 1 เชื้อต่อ 1 microtitreplate ผสมให้สารสกัดหยาบและสารแขวนลอยของเชื้อเข้ากัน โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงประมาณ 10-15 ครั้ง สำหรับคอลัมน์ที่ 10 นั้นจะเติม DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ร่วมกับเชื้อทดสอบที่ผสมกับ AlamarBlue ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ส่วนคอลัมน์ที่ 11 จะเติมสารละลายของ vancomycin ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเชื้อทดสอบที่ผสมกับ AlamarBlue ปริมาตร 90 ไมโครลิตร คอลัมน์ที่ 12 จะเติมเฉพาะเชื้อทดสอบที่ผสมกับ AlamarBlue หลุมละ 100

ไมโครลิตร เพื่อเป็นชุดควบคุม นำ microtitreplate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของ AlamarBlue นำตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ในเบื้องต้นไปทดสอบค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ตามวิธีการในข้อ 3.5 และ 3.6 ต่อไป (อัครวิทย์ กาญจนโอภาส, 2548)

3.5 การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี microdilution broth assay

นำสารสกัดหยาบที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นแล้วว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ในข้อ 3.4 ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร (เตรียมที่ความเข้มข้น 25 mg/ml) มาเติมลงใน microtitreplate ชนิด 96 หลุม โดยใส่เฉพาะในแถว A ของคอลัมน์ที่ 1-9 (จะสามารถทดสอบได้ 9 สารต่อ 1 microtitreplate) ตั้งทิ้งไว้จนเมทานอลระเหยหมด แล้วละลายสารสกัดหยาบด้วย DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ที่เตรียมจากข้อ 3.2 ใส่ในทุกหลุม ของคอลัมน์ที่ 1-9 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ยกเว้นในแถว A ให้ปิเปตเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 190 ไมโครลิตร จะทำให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบเท่ากับ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับในคอลัมน์ที่ 10 เติม DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อเป็นชุด ควบคุมว่า DMSO จะไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ คอลัมน์ที่ 11 เติมสารละลายของ vancomycin ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตเชื้อ แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบใส่ในทุกหลุมของคอลัมน์ที่ 10, 11 และ 12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ยกเว้น ในแถว A ให้ปิเปตเชื้อแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 190 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในแถว A ให้เข้า กัน โดยปิเปตซ้ำ 10-15 ครั้ง ด้วย multichannel pipette เจือจางสารละลายทั้งหมดลงครึ่งหนึ่ง โดยปิ เปตสารละลายในแถว A ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในแถวที่ B ผสมให้เข้ากัน ทำซ้ำในขั้นตอน ดังกล่าวจนถึงแถว H แล้วปิเปตสารละลายส่วนเกินทิ้ง 100 ไมโครลิตร ดังภาพประกอบข้างล่าง บ่ม microtitreplate ชนิด 96 หลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสี ของ AlamarBlue โดยสังเกตหลุมที่มีสีน้ำเงินเข้มของแต่ละคอลัมน์ หลุมที่มีความเข้มข้นต่ำสุดของแต่ละ คอลัมน์ที่สีของ AlamarBlue ยังคงเป็นสีน้ำเงินไม่เปลี่ยนแปลง อ่านค่าความเข้มข้นหลุมนั้น เป็นค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)



3.6 การหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

นำสารละลายในแต่ละหลุมของคอลัมน์ที่ 1-9 ในข้อ 3.5 ที่ให้ผลการยับยั้งเป็นบวก (สีของ AlamarBlue ยังคงเป็นสีน้ำเงินไม่เปลี่ยนแปลง) โดยการใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายในหลุมดังกล่าว นำมาเขี่ยเชื้อลงบนอาหาร nutrient agar นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ และเลือกค่าความเข้มข้นของสารสกัดหายที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้โดยสมบูรณ์โดยพิจารณาจากการที่ไม่มีเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเข้มข้นนั้นจัดว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหายที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้โดยสมบูรณ์หรือค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

3.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3.7.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำสารสกัดหายที่ให้ค่า MIC ต่ำกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์

เปรียบเทียบของค้ำประกอบทางเคมี เพื่อคัดเลือกเฉพาะสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ที่ดีและมีองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจ โดยการคัดเลือกเฉพาะสารสกัดหยาบที่ให้ค่า MIC ต่ำกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์เปรียบเทียบของค้ำประกอบทางเคมีโดยหยดตัวอย่างลงบนแผ่น TLC (TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F₂₅₄) ที่มี normal phase silica เป็น stationary phase แล้วใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ร่วมกับเอทิลอะซิเตท (EtOAc) ในอัตราส่วน 3:2 และ ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ร่วมกับเอทิลอะซิเตท (EtOAc) และเมทานอล (MeOH) ในอัตราส่วน 8.5:0.5:1 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำการตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ภายหลังจากการแยกโดยการส่องด้วยหลอดอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 315 นาโนเมตร จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ชนิดขององค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบที่แยกออกมาบน TLC ของสารสกัดหยาบโดยใช้ specific spraying reagents เช่น การทดสอบสารในกลุ่ม alkaloids จะใช้ Wagner's reagent (iodide solution, potassium iodide) ซึ่งหากสารสกัดหยาบมีสารกลุ่มนี้เป็นองค์ประกอบก็จะเกิดเป็นสีน้ำตาลแดง สำหรับการทดสอบสารในกลุ่ม terpenes และ terpenoids จะทำโดยใช้สารละลาย vanillin ใน H₂SO₄ ถ้าหากมีสารกลุ่ม terpenes และ terpenoids จะเกิดสีม่วงแดง ส่วนการทดสอบสารในกลุ่มเปปไทด์ ทำโดยวิธี Ninhydrin test ซึ่งหากสารตัวอย่างมีองค์ประกอบของเปปไทด์จะเกิดสีม่วงแดงเช่นเดียวกัน (Sherma และ Fried, 1996)

3.7.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและเปรียบเทียบความแตกต่างของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยเครื่อง Diode Array Detector High Performance Liquid Chromatography (DAD-HPLC)

นำตัวอย่างสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยให้ค่า MIC ต่ำกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาหาสถานะในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง DAD-HPLC ด้วยเทคนิค TLC ชนิด reversed phase และใช้ตัวทำละลายผสมของเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 75:25 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ในการแยกองค์ประกอบของสารสกัดหยาบด้วยเครื่อง HPLC นำสารสกัดหยาบที่แห้งมาเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วย DAD-HPLC โดยเติมเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายสารตัวอย่างก่อนที่จะกรองด้วย microfilter ขนาด 0.2 ไมครอน ลงในขวดตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วย DAD-HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด reversed phase C18 (Thermo Hypersil BDS C18 5µm, 4.6x250 mm) ตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเล็ตชนิด diode array โดยกำหนดความยาวคลื่นที่ 210 และ 230 นาโนเมตร ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งคือ 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของตัวทำละลายเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที เปรียบเทียบโครมาโตแกรมและ UV spectrum ของสารแต่ละชนิดเพื่อจัดกลุ่มของสารสกัดหยาบตามองค์ประกอบทางเคมี

3.7.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

นำตัวอย่างที่แห้งสนิทมาเติมตัวทำละลายสำหรับวิเคราะห์ NMR ได้แก่ Dimethylsulfoxide (DMSO-d₆) ใส่ในหลอด NMR ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จนแห้งสนิท ให้มีปริมาตรประมาณ 600 ไมโครลิตร หรือสูงจากก้นหลอด ประมาณ 3 เซนติเมตร นำไปวิเคราะห์ ¹H spectrum ด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Varian 500 MHz

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล

1.1 การเก็บตัวอย่าง

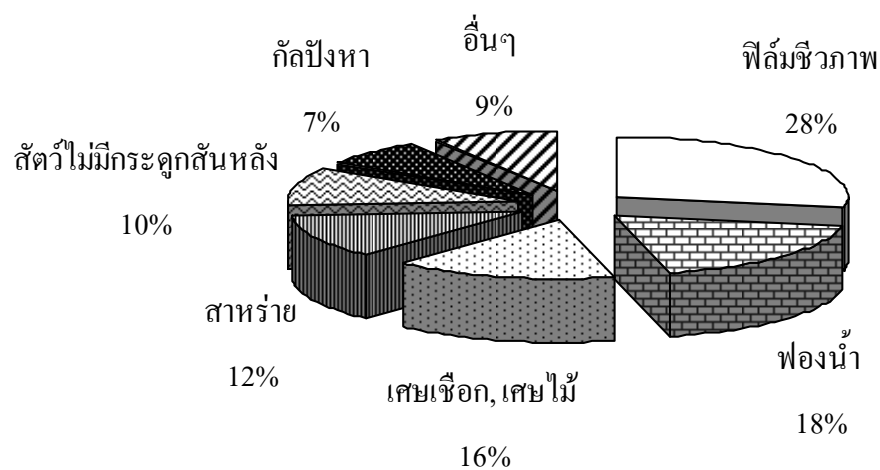
จากการเก็บตัวอย่างบริเวณเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี ระหว่างวันที่ 23-27 เดือนเมษายน พ.ศ. 2549 ทั้งหมด 7 จุด โดยเก็บตัวอย่างจากอ่าวฉลาม ที่ระดับความลึก 0-1 เมตร หินขาวที่ระดับความลึก 20 เมตร หินวง ที่ระดับความลึก 15-20 เมตร หินเขียวทูนใน ที่ระดับความลึก 20 เมตร หินเขียวทูนนอก ที่ระดับความลึก 20 เมตร กองหินข้างประการ ที่ระดับความลึก 20-25 เมตร และ กองหินข้างประการ ที่ระดับความลึก 6-9 เมตร ได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 165 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 5 บริเวณที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นหาดทรายและโขดหินในแนวน้ำขึ้นน้ำลง

จากตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 165 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ คือ ฟิล์มชีวภาพ (ร้อยละ 28) รองลงมาคือ ฟองน้ำ (ร้อยละ 18), เศษเชือกและเศษไม้ (ร้อยละ 16), สาหร่าย (ร้อยละ 12), สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (ร้อยละ 10), กัลปังหา (ร้อยละ 7) และตัวอย่างอื่นๆ (ร้อยละ 9) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 26

ตารางที่ 5 รายละเอียดการเก็บตัวอย่าง

Table 5. Detail information of specimens collection

Location	Date	Collecting method	Depth (m)	Number of specimen
Shark Bay	April 23, 2006	On-shore	0-1	14
White Rock	April 24, 2006	Scuba diving	20	9
Circle Rock	April 24, 2006	Scuba diving	20	11
Green Rock (inside)	April 24, 2006	Scuba diving	20	8
Green Rock (outside)	April 25, 2006	Scuba diving	15-20	43
Light House Rock	April 26, 2006	Scuba diving	20-25	45
Light House Rock	April 27, 2006	On-shore, Scuba diving	6-9	35
Total				165



ภาพที่ 26 ร้อยละของชนิดตัวอย่างที่ใช้แยกแบคทีเรียไกลดิง

Figure 26. Percentage of specimen used for the isolation of gliding bacteria

1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล

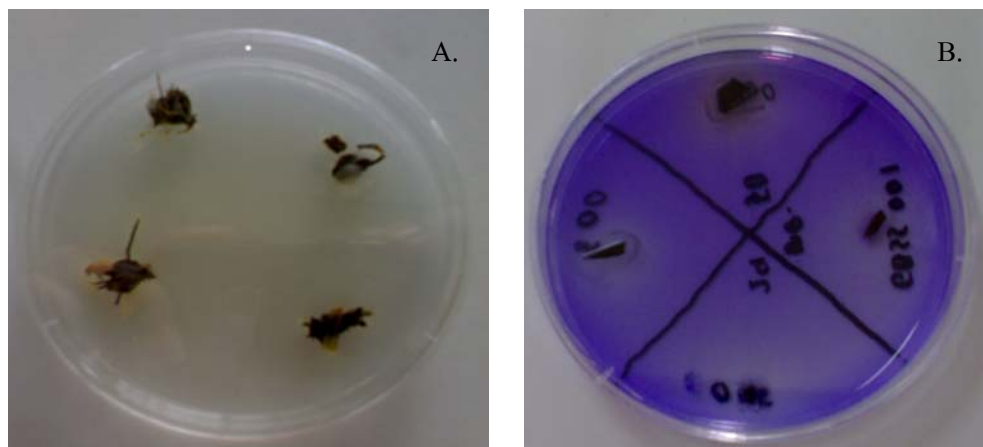
จากตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมด 165 ตัวอย่าง ในข้อ 1.1 สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลต จากตัวอย่างต่างชนิดกัน เช่น ฟิล์มชีวภาพบนพลาสติก, ฟิล์มชีวภาพบนปะการัง, ฟิล์มชีวภาพบนเปลือกหอยและเศษเชือก, ฟองน้ำ และกัลปังหา เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียไกลดิงส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการเป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) ตัวอย่างที่เลือกเก็บและสามารถแยกแบคทีเรียไกลดิงได้จึงเป็นซากสิ่งมีชีวิตรวมทั้งเศษวัสดุที่เน่าเปื่อย โดยเฉพาะฟิล์มชีวภาพบนวัตถุต่างๆ ซึ่งเป็นแหล่งของจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่ร่วมกันเป็นจำนวนมาก ทำให้แบคทีเรียไกลดิงอาศัยเป็นที่ยึดเกาะและเป็นแหล่งอาหาร ทำให้สามารถแยกแบคทีเรียไกลดิงจากฟิล์มชีวภาพได้มากกว่าในตัวอย่างอื่นๆ การแยกแบคทีเรียไกลดิงโดยวิธีการนำตัวอย่างวางบนจานเพาะเชื้อ โดยตรง บนอาหาร sodium glutamate medium ที่เติมและไม่เติม crystal violet ดังแสดงในภาพที่ 27 (A และ B) นั้นพบว่าการเติม crystal violet ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการสร้าง fruiting body เนื่องจากไม่พบแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่มของ Myxobacteria แต่ crystal violet จะส่งผลให้จำนวนของแบคทีเรียบนจานเพาะเชื้อมีน้อยลงจากการที่แบคทีเรียแกรมบวกถูกยับยั้ง ทำให้สามารถสังเกตการเจริญของแบคทีเรียไกลดิงบนจานเพาะเชื้อได้ง่ายขึ้น และเมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่คาดว่าจะเป็แบคทีเรียไกลดิงบนจานเพาะเชื้อพบว่าจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก นั่นคือ โคโลนีจะมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว ผ่องออก บางสายพันธุ์มีสีเหลือง และสีขาวขุ่น ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *Tenacibaculum mesophilum* และ *Alphaproteobacterium* ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 28 (A และ B) การจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียในกลุ่มนี้จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลร่วมด้วย โดยเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นเส้นยาว (long filamentous) ทั้งที่เป็นปลายแหลมและปลายทู่ และสามารถสังเกตการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียไกลดิงได้อย่างชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase-contrast ทั้งนี้การเคลื่อนที่แบบไกลดิงจะแตกต่างจากการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยทั่วไปที่ใช้ฟลาเจลลา กล่าวคือแบคทีเรียไกลดิงจะสร้างเมือกเพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ ขณะเคลื่อนที่จะมีการยกตัวขึ้นของเซลล์ในลักษณะโค้งงอและดันเซลล์ไปข้างหน้าทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้บนผิวหน้าอาหารแข็งแต่เมื่อเจริญอยู่ในอาหารเหลวจะไม่เคลื่อนที่ การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรียไกลดิงเพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase-contrast จะแสดงในภาคผนวก ค และจากการศึกษาพบว่ามีแบคทีเรียไกลดิงที่มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ เพียง 5 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียไกลดิงในจินัส *Tenacibaculum mesophilum* และ *Flexibacter echinica* ดังแสดงในภาพที่ 29 (A และ B) ซึ่งทุกสายพันธุ์สามารถเคลื่อนที่ได้โดยการก๊ิบคลาน (glide) โดยบางสายพันธุ์จะเคลื่อนที่เร็วในขณะที่บางสายพันธุ์จะเคลื่อนที่ช้า จากการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อทั้ง 21 ไอโซเลต คิคิแกรมลบ มี

รูปร่างทั้งเป็นแท่งสั้น (short rod) และเส้นยาว (long filamentous) รวมทั้งสามารถเคลื่อนที่โดยการไถลหรือคืบคลานได้ จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในตารางที่ 6 เป็นที่น่าสังเกตว่าการแยก การทำให้บริสุทธิ์และการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงนั้นใช้เวลาค่อนข้างนาน ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียไกลดิงนั้นค่อนข้างจะจำกัดอยู่ในวงแคบๆ ของผู้ที่มีความชำนาญหรือประสบการณ์เท่านั้น อีกทั้งยังใช้ความชำนาญและประสบการณ์มากกว่าการแยกแบคทีเรียอื่นๆ โดยทั่วไป และจากการแยกเชื้อในการวิจัยนี้ไม่พบเชื้อที่สร้าง fruiting body ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของแบคทีเรียไกลดิงในกลุ่ม Myxobacteria

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ

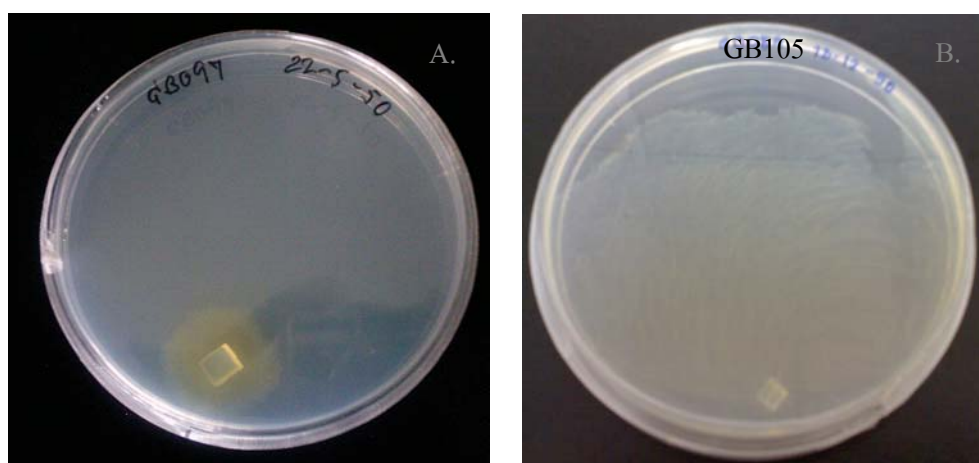
Table 6. Morphological characteristics of bacteria isolated from marine samples

Culture number	Source	Gram's staining	Shape	Gliding motility
GB 086	Biofilm on plastic	negative	Long filamentous	+
GB 088	Rope	negative	short rod	+
GB 089	Biofilm on coral	negative	long filamentous	+
GB 090	Biofilm on shell	negative	long filamentous	+
GB 091	Biofilm on shell	negative	long filamentous	+
GB 092	Biofilm on coral	negative	long filamentous	+
GB 093	Sponge	negative	long filamentous	+
GB 097	Biofilm on shell	negative	short rod	+
GB 098	Sponge	negative	long filamentous	+
GB 099	Sea fan	negative	short rod	+
GB 100	Tunicate	negative	long filamentous	+
GB 102	Red seaweed on string	negative	short rod	+
GB 103	Red seaweed on string	negative	short rod	+
GB 104	Biofilm on plastic	negative	long filamentous	+
GB 105	Biofilm on plastic	negative	long filamentous	+
GB 108	Sponge	negative	long filamentous	+
GB 110	Tunicate	negative	long filamentous	+
GB 111	Rope	negative	short rod	+
GB 121	Sponge	negative	long filamentous	+
GB 122	Sponge	negative	long filamentous	+
GB 123	Sea fan	negative	long filamentous	+



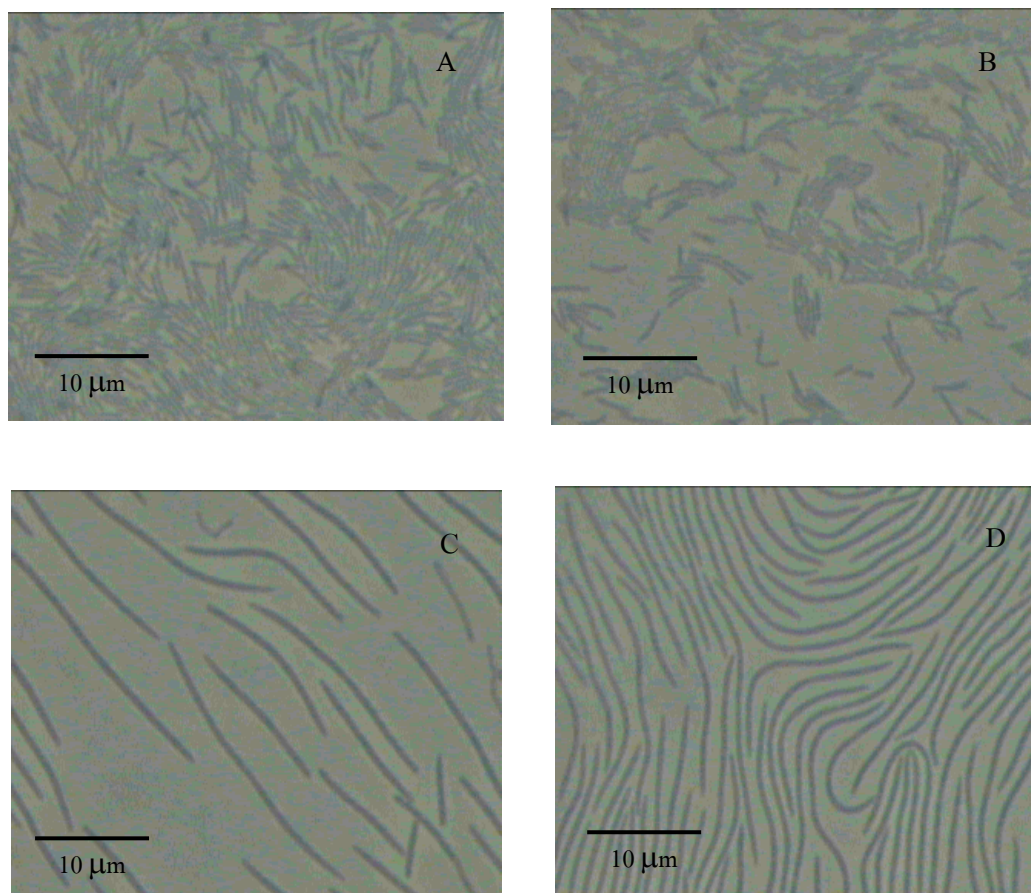
ภาพที่ 27 การแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงโดยวิธี direct plating (A: sodium glutamate medium, B: sodium glutamate medium ที่มีเติม crystal violet)

Figure 27. Isolation of gliding bacteria by direct plating method (A: sodium glutamate medium, B: sodium glutamate medium with crystal violet)



ภาพที่ 28 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียไกลดิง (A: *Tenacibaculum mesophilum*, B: *Alphaproteobacterium*)

Figure 28. Colony of gliding bacteria (A: *Tenacibaculum mesophilum*, B: *Alphaproteobacterium*)



ภาพที่ 29 เซลล์ของแบคทีเรียไกลดิงบนผิวหน้าอาหาร SAP2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase-contrast ที่กำลังขยาย 100 เท่า โดย A) *Tenacibaculum mesophilum* B) *Flexibacteria echinicida* C) และ D) *Alphaproteobacterium*

Figure 29. Gliding bacterial cells on the surface of SAP2 medium under phase-contrast microscope (X100) A) *Tenacibaculum mesophilum* B) *Flexibacteria echinicida* C) and D) *Alphaproteobacterium*

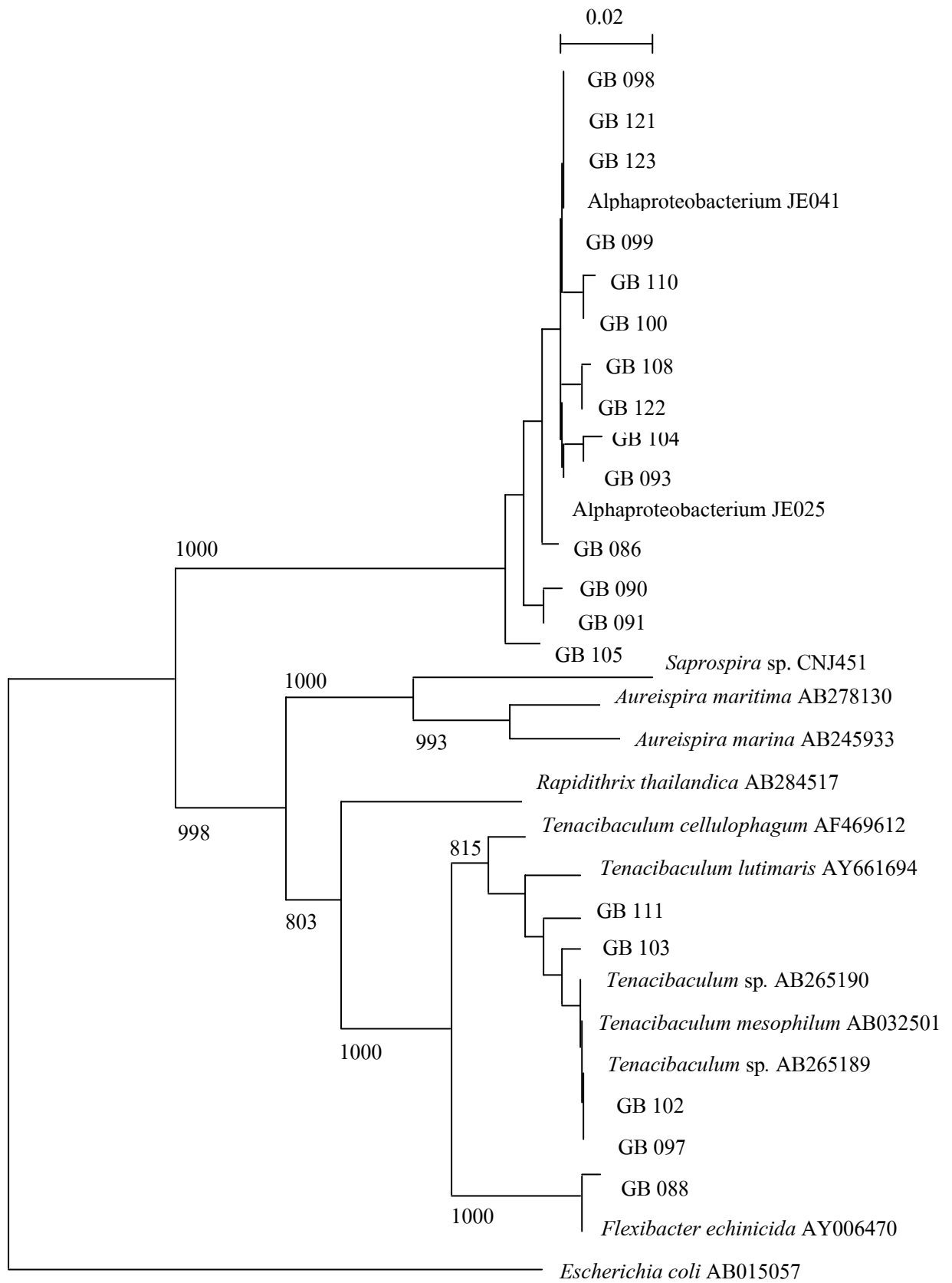
2. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียไกลดิงโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

ผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไกลดิงโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ดังแสดงในตารางที่ 7 และแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของแต่ละไอโซเลตเทียบกับแบคทีเรียไกลดิงที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Phylogenetic tree) ดังแสดงในภาพที่ 30 รวมทั้งรายละเอียดของแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์อื่นๆ ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียไกลดิงโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

Table 7. Identification results of marine gliding bacteria by 16S rDNA sequence analysis

Culture number	Closest relative strain	Similarity value (%)
GB 086	<i>Alphaproteobacterium</i>	98
GB 088	<i>Flexibacter echinica</i>	99
GB 089	Mus musculus BAC	84
GB 090	<i>Alphaproteobacterium</i>	99
GB 091	<i>Alphaproteobacterium</i>	98
GB 092	<i>Vibrio</i> sp. Y4tang	98
GB 093	<i>Alphaproteobacterium</i>	97
GB 097	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	100
GB 098	<i>Alphaproteobacterium</i>	99
GB 099	<i>Alphaproteobacterium</i>	100
GB 100	<i>Alphaproteobacterium</i>	100
GB 102	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	100
GB 103	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	99
GB 104	<i>Alphaproteobacterium</i>	100
GB 105	<i>Alphaproteobacterium</i>	96
GB 108	<i>Alphaproteobacterium</i>	99
GB 110	<i>Alphaproteobacterium</i>	99
GB 111	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	98
GB 121	<i>Alphaproteobacterium</i>	100
GB 122	<i>Alphaproteobacterium</i>	99
GB 123	<i>Alphaproteobacterium</i>	99



ภาพที่ 30 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเล

Figure 30. Phylogenetic tree of marine gliding bacteria

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงของ 16S rDNA ของแบคทีเรียไกลคิงที่แยกได้จากเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี ทั้งหมด 21 ไอโซเลต พบว่ามี 4 ไอโซเลต ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Tenacibaculum mesophilum* (Families: Flavobacteriaceae) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในช่วงร้อยละ 98-100 และมี 1 ไอโซเลต มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Flexibacter echinocida* (Families: Cytophagaceae) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ร้อยละ 99 และพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้ (14 ไอโซเลต) มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Alphaproteobacterium* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในช่วงร้อยละ 96-100 โดยแบคทีเรียกลุ่ม Proteobacterium นั้นเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เป็น dominant ในสิ่งแวดล้อมที่มีคุณสมบัติเป็นผู้ล่า (predator) ซึ่งแบคทีเรียไกลคิงจัดอยู่ในกลุ่ม δ -Proteobacterium ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้น แต่จากการรายงานของ Lee และคณะ (2003) พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม Proteobacterium และ CFB พบว่าค่อนข้างใกล้ชิดกัน จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ผลว่าแบคทีเรียไกลคิงที่แยกได้เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์ในฐานข้อมูลแล้วเป็น α -Proteobacterium นั้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่เชื้อแบคทีเรียไกลคิงที่แยกได้เป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ซึ่งไม่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ NCBI มาก่อนและเมื่อพิจารณาจากลักษณะของ Swarm colony บนจานเพาะเชื้อ และลักษณะรูปร่างเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast ก็ให้ผลที่ยืนยันและสนับสนุนว่าแบคทีเรียไกลคิงที่แยกได้ทั้งหมดนั้นเป็นแบคทีเรียไกลคิงอย่างแน่นอน

ตารางที่ 8 รายละเอียดของแบคทีเรียไกลดิ้งสายพันธุ์อื่นๆที่ใช้ในการศึกษานี้

Table 8. Detail of other gliding bacterial isolates used in this study

Isolates	Location	Sources	Gliding bacterial strains
6 GB	Pak Meng	Shell	Unidentified
23 GB	Yao beach	Cuttle bone	Unidentified
37 GB	Yongling beach	Shell	<i>Rapidithrix thailandica</i>
46 GB	Susanhoy 75 million years	Coral	Unidentified
52 GB	Susanhoy 75 million years	Seaweed	Unidentified
58 GB	Susanhoy 75 million years	Seaweed	<i>Rapidithrix thailandica</i>
64 GB	Susanhoy 75 million years	Sea grass	<i>Rapidithrix thailandica</i>
66 GB	Susanhoy 75 million years	Seaweed	<i>Rapidithrix thailandica</i>
70 GB	Susanhoy 75 million years	Sponge	Unidentified
82 GB	Susanhoy 75 million years	Seaweed	Unidentified
83 GB	Susanhoy 75 million years	Seaweed	Unidentified
89 GB	Naiyang beach	Rope	<i>Alphaproteobacterium</i>
96 GB	Surin beach	Cuttle bone	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>
106 GB	Susanhoy 75 million years	Seaweed	Unidentified
108 GB	Naihan beach	Jelly fish	Unidentified
SH 1.3.1	Sattahip	Wood	<i>Rapidithrix thailandica</i>
SH 3.6.1	Sattahip	Seaweed	<i>Cytophaga</i> sp.
SH 4.1	Sattahip	Seaweed	Unidentified
SH 4.7.1	Sattahip	Shell	<i>Cytophaga</i> sp.
SH 4.11.4	Sattahip	Shell	<i>Rapidithrix thailandica</i>
SH 4.12.2	Sattahip	Coral	Unidentified
SH 4.20.2	Sattahip	Coral	<i>Rapidithrix thailandica</i>
SH 5	Sattahip	Biofilm	<i>Rapidithrix thailandica</i>
SH 5.13.2	Sattahip	Seaweed	<i>Rapidithrix thailandica</i>
SH 6.14.3	Sattahip	Shell	<i>Rapidithrix thailandica</i>

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Table 8. (Cont.)

Isolates	Location	Sources	Gliding bacterial strains
SH 6.19.1	Sattahip	Shell	Unidentified
SH 6.24.1	Sattahip	Shell	<i>Rapidithrix thailandica</i>
SH 9.43.1	Sattahip	Shell	<i>Rapidithrix thailandica</i>
SH 9.47.1	Sattahip	Shell	Unidentified
SH 14.3.3	Sattahip	Biofilm	Unidentified
SH 14.4.2	Sattahip	Biofilm	Unidentified
SH 14.6.1	Sattahip	Biofilm	Unidentified
SH 14.6.2	Sattahip	Biofilm	<i>Rapidithrix thailandica</i>
11.3.4 SA	Ang sila	Sand	<i>Saprospira</i> sp.
24 SA	Yao beach	Bark	<i>Saprospira marina</i>
28.5 SA	Susanhoy 75 million years	Shell	Unidentified
35 SA	Yongling beach	Seaweed	<i>Saprospira</i> sp.
51 SA	Susanhoy 75 million years	Seaweed	<i>Saprospira</i> sp.
59 SA	Susanhoy 75 million years	Tunicate	<i>Saprospira maritima</i>
71 SA	Susanhoy 75 million years	Seaweed	<i>Saprospira marina</i>
KK 1-3	Koh Kra	Sponge	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>
KK 1-19-2	Koh Kra	Leave	<i>Rapidithrix thailandica</i>
KK 1-21-1	Koh Kra	Leave	<i>Rapidithrix thailandica</i>
KK 1-21-2	Koh Kra	Leave	<i>Rapidithrix thailandica</i>
KK 1-21-3	Koh Kra	Sponge	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>
KK 1-26	Koh Kra	Sponge	Unidentified
KK 1-42-3	Koh Kra	Crab skin	Unidentified
KK 1-42-4	Koh Kra	Shell	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>
KK 2-1	Koh Kra	Crab skin	<i>Rapidithrix thailandica</i>
KK 2-4	Koh Kra	Crab skin	Unidentified

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Table 8. (Cont.)

Isolates	Location	Sources	Gliding bacterial strains
KK 3-1-1	Koh Kra	Shell	<i>Alphaproteobacterium</i>
KK 3-12	Koh Kra	Sponge	<i>Alphaproteobacterium</i>
TISTR 1691	Ang sila	Lichen	Unidentified
TISTR 1699	Laemtang	Shell	Unidentified
TISTR 1710	Chao samran beach	Shell	<i>Rapidithrix thailandica</i>
TISTR 1711	Chao samran beach	Stone	Unidentified
TISTR 1712	Chao samran beach	Shell	Unidentified
TISTR 1714	Chao samran beach	Wood	Unidentified
TISTR 1718	Peck tien beach	Shell	Unidentified
TISTR 1736	Naiyang beach	Rope	<i>Rapidithrix thailandica</i>
TISTR 1737	Susanhoy 75 million years	Tunicate	Unidentified
TISTR 1742	Yongling beach	Seaweed	<i>Rapidithrix thailandica</i>

Unidentified คือ ไม่ได้จัดจำแนกสายพันธุ์

3. การคัดกรองสารสกัดหยาบของแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนั้นจะนำสารสกัดหยาบทั้งจากแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากเกาะเต่าและสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิงที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการจำนวน 227 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่มาจากแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Rapidithrix thailandica*, *Tenacibaculum mesophilum* และ *Saprospira* sp. ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ต่างจากแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากเกาะเต่า โดยแยกมาจากทะเลทางฝั่งอันดามันและอ่าวไทย ได้แก่ หาดหยงหลิง, หาดยาว และท่าเรือปากเมง จังหวัดตรัง สุสานหอย 75 ล้านปี จังหวัดกระบี่ หาดสุรินทร์, หาดในยาง และหาดในหาน จังหวัดภูเก็ต เกาะกระ จังหวัดนครศรีธรรมราช หาดเจ้าสำราญ และหาดปึกเตียน จังหวัดเพชรบุรี อ่างศิลา, แหลมแท่นและสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

3.1 การหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี colorimetric microdilution broth

ในการศึกษาวิจัยนี้จะทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่เลือกมาโดยวิธี colorimetric microdilution broth ซึ่งใช้ AlamarBlue เป็นอินดิเคเตอร์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาสั้นในการทดสอบและสามารถทดสอบได้ครั้งละหลายตัวอย่างพร้อมกัน อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ประหยัดเพราะใช้สารทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ จึงเหมาะกับการทดสอบสารที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ และยังสามารถเตรียมสารที่ต้องการทดสอบในรูปของสารละลายใน DMSO ที่สามารถนำสารที่ต้องการทดสอบเข้าสู่เซลล์ที่ทดสอบได้ดี จึงไม่มีข้อจำกัดในด้านคุณสมบัติของสารที่จะนำมาทดสอบ เช่น ความสามารถในการละลาย การแพร่ เช่นเดียวกับการทดสอบแบบ disc หรือ agar diffusion methods นอกจากนี้วิธี colorimetric microdilution broth ยังเป็นวิธีที่ไวต่อการทดสอบโดยสามารถทดสอบสารที่ระดับความเข้มข้น 0.02- 3.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ และมีความแปรผันอยู่ในช่วง 5-12 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Gazzano *et al.*, 1997) ข้อดีอีกประการหนึ่งของการเลือกใช้วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้ AlamarBlue เป็นอินดิเคเตอร์ คือ ความไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของ AlamarBlue โดยปกติ AlamarBlue จะมีสีน้ำเงินซึ่งอยู่ในรูป resazurin แต่เมื่อถูกรีดิวซ์จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ซึ่งอยู่ในรูป resorufin การเปลี่ยนแปลงของสีจากปฏิกิริยารีดักชันจะมีความจำเพาะกับ NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN และ NADH/NAD ที่เพิ่มขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (O'Brien *et al.*, 2000) จึงทำให้วิธีทดสอบดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบอย่างแท้จริง AlamarBlue จึงเหมาะสมใช้เป็นวิธีทดสอบ เพื่อคัดกรองสารสกัดที่มีจำนวนมาก และปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีดังกล่าว ยังสามารถสังเกตได้ง่ายด้วยตาเปล่า ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย AlamarBlue ได้แก่ จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ, ระยะเวลาในการบ่มเชื้อระหว่างการทดสอบ และความเข้มข้นของสารสกัดหยาบหรือสารบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบ ผลจากการทดลองหาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบในการศึกษานี้ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 โดยจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบจะพิจารณาจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ ระยะเวลาในการบ่มเชื้อในระหว่างการทดสอบ ซึ่งควรอยู่ในช่วง 10-15 ชั่วโมง ความไวต่อสารสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบ เนื่องจากจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มากเกินไปจะทำให้ความไวต่อการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดหยาบลดลง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการใช้ของ AlamarBlue จากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถจะสังเกตผลการยับยั้งการเจริญของสารที่ทดสอบได้อย่างแท้จริง ในขณะที่จำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดสอบน้อยเกินไปจะเกิดผล

ในทางตรงกันข้าม กล่าวคือสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบส่วนใหญ่จะมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทำให้ไม่สามารถทราบผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นจากสารสกัดหยาบอย่างแท้จริง และในการทดสอบคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีข้างต้น จะใช้สารปฏิชีวนะมาตรฐานคือ vancomycin สำหรับชุดควบคุมเนื่องจาก vancomycin เป็นยาที่ใช้รักษาเชื้อแบคทีเรียคือยาในปัจจุบัน

ตารางที่ 9 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียทดสอบที่เหมาะสมต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

โดยวิธี colorimetric microdilution broth assay

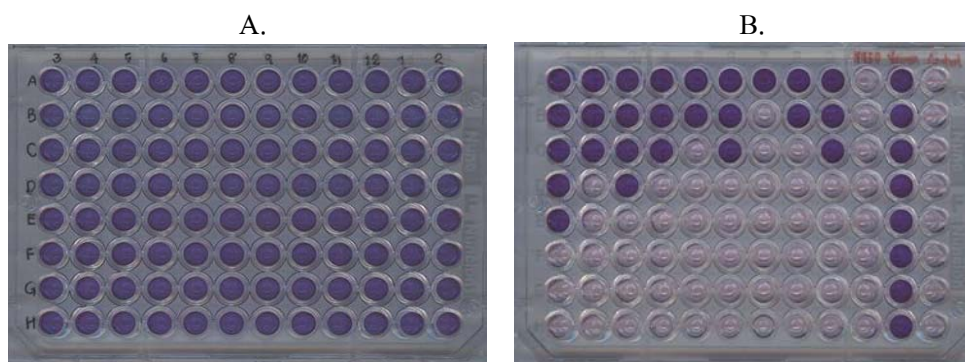
Table 9. Initial concentration of test bacteria used for determination of antibacterial activity by colorimetric microdilution broth assay

Tested bacteria	OD (600 nm)	Amount of cell (CFU/ml)	Incubation time (h)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.58	3.0×10^6	15
<i>Salmonella</i> Typhi	0.27	2.1×10^6	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.23	2.2×10^6	15
Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	0.11	1.7×10^6	15
Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	0.08	1.3×10^7	15

3.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิ้ง

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจำนวน 303 ตัวอย่าง ซึ่งมาเป็นสารสกัดหยาบที่ได้จากแบคทีเรียไกลดิ้งที่แยกจากเกาะเต่า 76 ตัวอย่างและสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิ้งที่มีในห้องปฏิบัติการ 227 ตัวอย่าง ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella* Typhi และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 แล้วนำสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งในขั้นต้นนี้มาทดสอบซ้ำโดยการ

วิเคราะห์ค่า Minimum Inhibitory Concentration พบว่ามี 58 สารสกัดหยาบที่ให้ค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 9.38-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างการวิเคราะห์ค่า MIC ก่อนบ่มเชื้อและหลังบ่มเชื้อ 15 ชม. ดังแสดงในภาพที่ 31 ซึ่งหลุมที่มีสีน้ำเงินเข้มหลังบ่มเชื้อ 15 ชม. แสดงว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบแต่หลุมที่มีสีชมพู แสดงว่าสารสกัดหยาบไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ จากการวิเคราะห์ค่า MIC พบว่ามีสารสกัดหยาบที่ยับยั้ง Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE), *Bacillus subtilis*, *Salmonella Typhi* และ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 25, 16, 20, 16 และ 10 ตัวอย่างตามลำดับ และจากค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่มีค่า MBC มากกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเพียง 5 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีค่า MBC เท่ากับ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นคือ GB 097CY, 23GB CY, 52GB VY, 89GB CY และ TISTR1736 RL ค่า MIC และ MBC จะแสดงในตารางที่ 10 ซึ่งจากข้อมูลจะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบที่แยกได้จากแบคทีเรียไกลดิงนั้นออกฤทธิ์ค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารสกัดหยาบส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งยับยั้งได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีชั้น Outer membrane ซึ่งประกอบด้วย lipopolysaccharide และ protein ซึ่งเป็นชั้นไขมันทำให้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิงที่มีขั้วสูงเมื่อดูจากผลของ TLC ทำให้ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีเหมือนกับแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียไกลดิงนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ดื้อยาได้ดี โดยสารสกัดหยาบส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อ MRSA และมีเพียงสารสกัดหยาบเดียวเท่านั้นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยเฉพาะแบคทีเรียดื้อยาสายพันธุ์ MRSA และ VRE ให้ค่า MIC เท่ากับ 9.38 และ 18.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นั่นคือ TISTR1736 RL ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบจากเชื้อแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *Rapidithrix thailandica* ที่แยกได้จากเศษเชือก บริเวณหาดในยาง จังหวัดภูเก็ต และจากการทดลองพบว่าเชื้อกลุ่ม *Alphaproteobacterium* ส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ในขณะที่ *Tenacibaculum mesophilum* และ *Rapidithrix thailandica* ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุดมาจากอาหารสูตร CY ซึ่งมี casitone เป็นองค์ประกอบหลัก เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ



ภาพที่ 31 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ด้วย microtitreplate

(A: ก่อนบ่มเชื้อและ, B: หลังบ่มเชื้อ 15 ชม.)

Figure 31. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test of MRSA in microtitreplate

(A: before incubation, B: 15 h after incubation)

ตารางที่ 10 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียเมื่อทดสอบโดยวิธี colorimetric microdilution broth assay

Table 10. MIC and MBC values of active extracts by colorimetric microdilution broth assay

Extract code	Identify	MRSA		VRE		<i>B. subtilis</i>		<i>Sal. Typhi</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
GB 086 SK	<i>Alphaproteobacterium</i>			150	>150						
GB 086 CY	<i>Alphaproteobacterium</i>	75	>150	37.5	>150	150	>150				
GB 091 SK	<i>Alphaproteobacterium</i>	150	>150								
GB 098 CY	<i>Alphaproteobacterium</i>			150	>150						
GB 098 VY	<i>Alphaproteobacterium</i>					150	>150				
GB 099 RL	<i>Alphaproteobacterium</i>					150	>150				
GB 099 CY	<i>Alphaproteobacterium</i>	150	>150								
GB 105 CY	<i>Alphaproteobacterium</i>			150	>150						
89 GB CY	<i>Alphaproteobacterium</i>	37.5	>150							18.75	150
KK 3.1.1 CY	<i>Alphaproteobacterium</i>			150	>150						
KK 3.1.1 VY	<i>Alphaproteobacterium</i>			150	>150						

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Table 10. (Cont.)

Extract code	Identify	MRSA		VRE		<i>B. subtilis</i>		<i>Sal. Typhi</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
GB 097 RL	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	150	>150					150	>150		
GB 097 SK	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	150	>150					150	>150	150	>150
GB 097 CY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	18.75	150			150	>150	18.75	150		
GB 097 VY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>							150	>150		
GB 102 SK	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	150	>150								
GB 102 CY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	75	>150			150	>150				
GB 103 SK	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>					150	>150				
GB 103 CY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>							150	>150		
GB 103 VY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>					150	>150				
GB 111 RL	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>							150	>150		
GB 111 CY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	150	>150	37.5	>150			75	>150		
GB 111 VY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>							150	>150		

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Table 10. (Cont.)

Extract code	Identify	MRSA		VRE		<i>B. subtilis</i>		<i>Sal. Typhi</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
96 GB CY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	150	>150			37.5	>150				
KK 1.3 VY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>			150	>150						
KK 1.21.3 CY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	150	>150			150	>150				
KK 1.42.4 CY	<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	150	>150								
TISTR 1710 RL	<i>Rapidithrix thailandica</i>									150	>150
TISTR 1710 SK	<i>Rapidithrix thailandica</i>	75	>150								
TISTR 1736 RL	<i>Rapidithrix thailandica</i>	9.38	150	18.75	150	75	>150	150	>150	37.5	>150
TISTR 1736 VY	<i>Rapidithrix thailandica</i>	75	>150			150	>150				
TISTR 1742 CY	<i>Rapidithrix thailandica</i>	150	>150			150	>150	150	>150		
4.20.2 VY	<i>Rapidithrix thailandica</i>							150	>150		
KK 1.21.1 CY	<i>Rapidithrix thailandica</i>			150	>150						
KK1.19.2 VY	<i>Rapidithrix thailandica</i>					150	>150				

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Table 10. (Cont.)

Extract code	Identify	MRSA		VRE		<i>B. subtilis</i>		<i>Sal. Typhi</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
66 GB VY	<i>Rapidithrix thailandica</i>	37.5	>150								
GB 088 CY	<i>Flexibacter echinicida</i>	150	>150								
35 SA VY	<i>Saprospira</i> sp.									150	>150
4.7.1 SK	<i>Cytophaga</i> sp.			150	>150	150	>150				
3.6.1 CY	<i>Cytophaga</i> sp.							150	>150		
3.6.1 VY	<i>Cytophaga</i> sp.							150	>150		
TISTR 1699 SK	Unidentified	150	>150			150	>150				
TISTR 1699 CY	Unidentified									150	>150
TISTR 1712 SK	Unidentified	150	>150			75	>150				
TISTR 1712 CY	Unidentified	150	>150			75	>150				
TISTR 1714 SK	Unidentified					75	>150				
6 GB CY	Unidentified			150	>150						

ตารางที่ 10 (ต่อ)

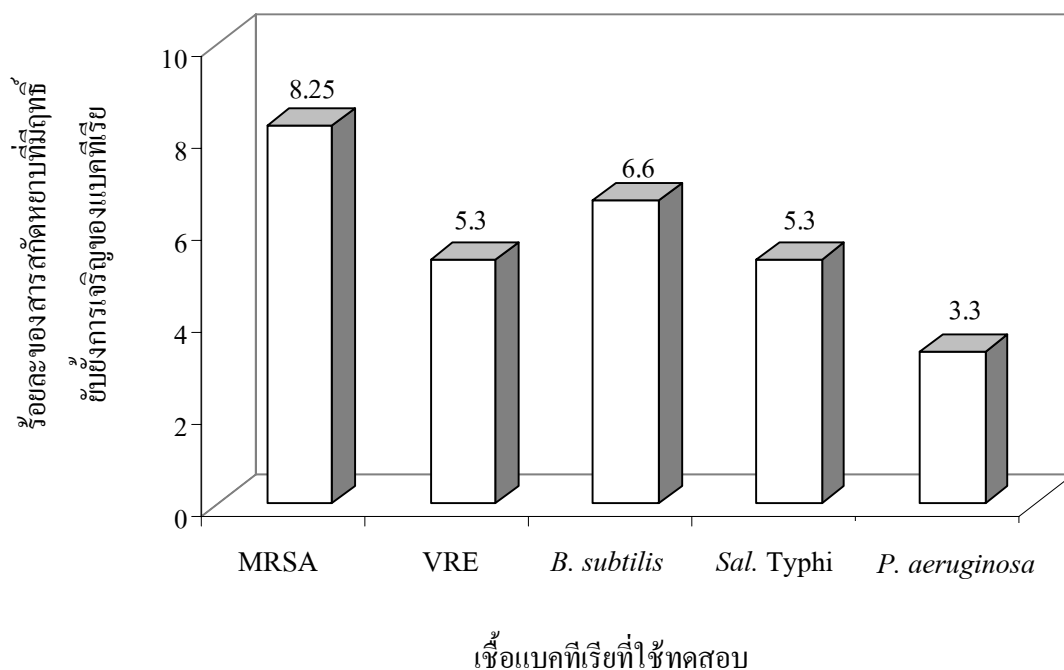
Table 10. (Cont.)

Extract code	Identify	MRSA		VRE		<i>B. subtilis</i>		<i>Sal. Typhi</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
6 GB VY	Unidentified					150	>150				
23 GB CY	Unidentified	150	>150			150	>150	150	>150	18.75	150
52 GB CY	Unidentified	75	>150			150	>150				
52 GB VY	Unidentified	18.75	150	37.5	>150						
82 GB CY	Unidentified			150	>150						
83 GB RL	Unidentified					150	>150				
106 GB RL	Unidentified			150	>150						
TISTR 1691 RL	Unidentified					150	>150			150	>150
TISTR 1691 CY	Unidentified							150	>150	150	>150
4.12.2 VY	Unidentified			150	>150					150	>150
4.1 SK	Unidentified							150	>150		

4. การคัดเลือกสารสกัดหายาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย

4.1 ผลการทดสอบสารสกัดหายาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดหายาที่ผลิตโดยแบคทีเรียไกลดิงในทะเลทั้ง 303 ตัวอย่าง จากการศึกษานี้พบว่ามีสารสกัดหายา 25 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 8.25 ของสารสกัดหายาทั้งหมด 303 ตัวอย่าง) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ Methicillin-Resistant *S. aureus* และพบว่ามีสารสกัดหายา 16 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 5.30) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ Vancomycin-Resistant *E. faecalis* และสำหรับ *B. subtilis* ถึงแม้ว่าจะไม่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อ และเป็นเชื้อที่ค่อนข้างไวต่อยาและสารเคมีต่างๆจึงนำมาทดสอบเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดหายา โดยพบว่ามีสารสกัดหายา 20 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 6.60) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* สำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในท่อน้ำเสีย โดยจากการทดสอบพบว่ามีสารสกัดเพียง 10 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 3.30) ที่สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ และสำหรับเชื้อ *Sal. Typhi* ซึ่งมักพบว่ามีกรปนเปื้อนในอาหารประเภท เนื้อสัตว์และอาหารทะเล และทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์นั้น มีสารสกัดหายา 16 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 5.30) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ ดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 32 ร้อยละของสารสกัดหายาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

Figure 32. Percentage of active extracts with antibacterial activities

จากผลการทดสอบสารสกัดหายาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียพบว่าสารสกัดหายาจากแบคทีเรียโกลดิ้งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือยาสายพันธุ์ MRSA และ VRE ได้ และคิดเป็นร้อยละของสารสกัดหายาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA ถึงร้อยละ 8.25 ซึ่งมากกว่าร้อยละของสารสกัดหายาที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* อาจเนื่องจากคุณสมบัติของสาร กลไกการออกฤทธิ์หรือเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของสารไม่เหมือนกับยา Methicillin ที่เชื้อ *S. aureus* สามารถคือต่อยาได้ ซึ่งยา Methicillin จะออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* แต่เชื้อจะมีกลไกคือต่อยาก็คือเชื้อจะเปลี่ยนเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา หรือ binding site ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์กับเป้าหมาย หรือ target site ได้ (Tenover, 2006) ดังนั้นการที่สารสกัดหายาสามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ได้มากกว่าจึงไม่จำเป็นว่าจะต้องยับยั้งต่อเชื้อที่ยับยั้งง่ายได้มากกว่าเสมอไป ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติสารที่แยกได้เป็นสำคัญ และนอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหายาจากแบคทีเรียโกลดิ้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบอย่างเชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *Sal. Typhi* ซึ่งเป็นเชื้อที่ยับยั้งได้ยาก

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าสารสกัดหายาที่แยกได้จากแบคทีเรียโกลดิ้งนั้นออกฤทธิ์ค่อนข้างกว้างโดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นข้อมูล

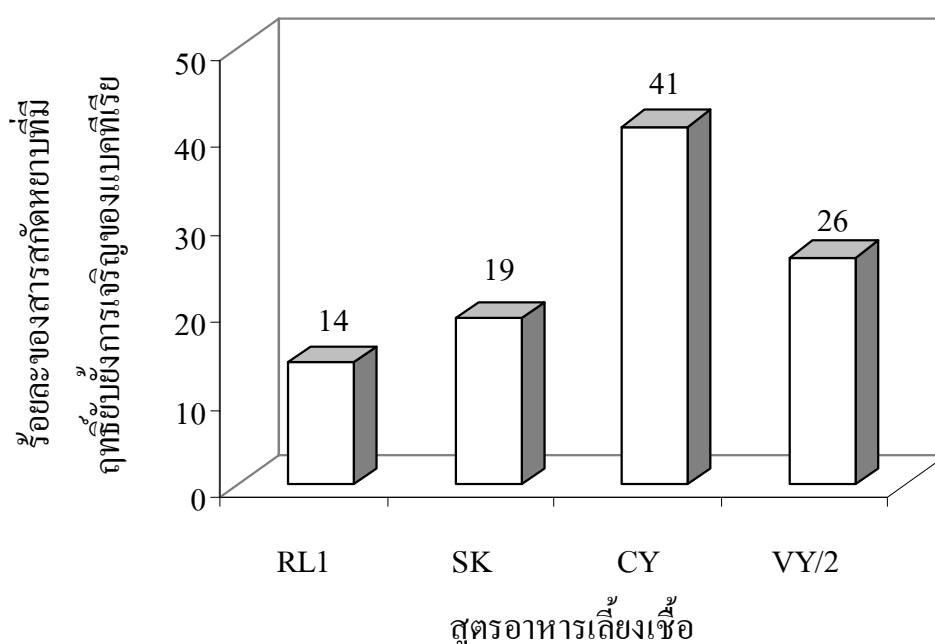
สำคัญในการบ่งชี้ว่าแบคทีเรียไกลดิงมีคุณสมบัติในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่น่าสนใจ ซึ่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย

4.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

ผลจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้จากทะเลเพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตร ดังแสดงในภาคผนวก ก พบว่าอาหารสูตร CY ที่มี casitone, malt extract, yeast extract เป็นองค์ประกอบนั้น ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุดคือ 24 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 41 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร CY ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร RL1 ที่มี peptone, yeast extract, vitamin B₁₂ เป็นองค์ประกอบนั้น เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยที่สุด โดยมีเพียง 8 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 14 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร RL1 ทั้งหมด) ส่วนอาหารสูตร VY/2 ที่มี Baker's yeast paste เป็นองค์ประกอบ และสูตร SK ที่มี skim milk และ yeast extract เป็นองค์ประกอบ สามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้มากเป็นอันดับสองและสามตามลำดับคือ อาหารสูตร VY/2 มีจำนวน 15 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 25 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร VY/2 ทั้งหมด) และอาหารสูตร SK 11 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 19 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร SK ทั้งหมด) ดังแสดงในภาพที่ 33 และเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดของสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรต่างๆ จากตารางที่ 11 พบสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของ Methicillin-Resistant *S. aureus* ส่วนใหญ่มาจากอาหารสูตร CY (14 ตัวอย่าง) รองลงมาคืออาหารสูตร SK (6 ตัวอย่าง) และจากอาหารสูตร VY/2 (3 ตัวอย่าง) อาหารสูตร RL1 (2 ตัวอย่าง) ตามลำดับ สำหรับการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ Vancomycin-Resistant *E. faecalis* พบว่าสารสกัดหยาบที่มาจากอาหารสูตร CY สามารถยับยั้ง Vancomycin-Resistant *E. faecalis* ได้มากที่สุด (8 ตัวอย่าง) รองลงมาคืออาหารสูตร VY/2 (4 ตัวอย่าง) ในขณะที่สารสกัดหยาบจากอาหารสูตร RL1 และ SK มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญได้เท่ากันในการทดสอบ (2 ตัวอย่าง)

จากผลการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร พบว่าสารสกัดหยาบที่แยกได้จากเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร CY มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้มากที่สุด ซึ่งอาหารสูตร CY เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของสารอาหารสมบูรณ์ที่สุด (complex medium) นั่นคือประกอบด้วย casitone 10 กรัม, malt extract 2 กรัม และ yeast extract 1 กรัม อาจเป็นไปได้ว่า casitone ซึ่งเป็นแหล่งที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบสูง ซึ่งมีผลโดยตรงกับโครงสร้างของสารที่ผลิต กล่าวคือ

กรดอะมิโนซึ่งจะเป็นโครงสร้างพื้นฐาน (building blocks) ในการสร้างสารที่ซับซ้อนต่อไป ทำให้สารที่สร้างจากอาหารชนิดนี้มีฤทธิ์ที่ดีกว่าในอาหารชนิดอื่น ดังเช่นการทดลองของ Hopf และคณะ (1990) ได้ศึกษาการผลิต Ambruticin S จาก myxobacteria: *Sorangium cellulosum* ในอาหารที่มีกรดอะมิโนสูง พบว่าการสร้าง Ambruticin S ในอาหาร complex medium นั้นสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันในอาหาร synthetic medium



ภาพที่ 33 ร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด

Figure 33. The percentage of active crude extracts against bacterial cultures, classified by media

ผลจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงในอาหารสูตรที่แตกต่างกัน ทำให้ได้สารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันด้วย และส่งผลถึงคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Bitzer และคณะ (2006) ที่ได้กล่าวถึงหลักการที่เชื้อสายพันธุ์หนึ่งสามารถที่จะผลิตสารที่แตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ OSMAC (one strain-many compounds) ซึ่งเชื่อจะนำไปใช้ในการสร้างสารเมตาบอไลต์ชนิดต่างๆได้ และในการทดลองนี้ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Rapidithrix thailandica* ในอาหารที่มีองค์ประกอบของสารอาหารต่างกัน ได้แก่ RL1 และ VY/2 พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้คือ TISTR1736 RL และ TISTR1736 VY นั้นมีความแตกต่างกันและออกฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบแตกต่างกันด้วย จากผลการวิเคราะห์

องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบทั้งสองด้วยวิธี TLC และ HPLC พบว่าให้ผล TLC และ HPLC chromatogram ที่บ่งบอกถึงองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 11 จำนวนสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ไกลดิงในอาหารชนิดต่างๆที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย

Table 11. Number of gliding bacterial crude extracts with antibacterial activities

Cultivating media	Number of antibacterial crude extracts				
	MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P.aeruginosa</i>
RL1	2	2	4	3	3
SK	6	2	4	2	1
CY	14	8	9	7	4
VY/2	3	4	3	4	2

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

5.1 การคัดเลือกสารสกัดหยาบและการจัดกลุ่มสารสกัดหยาบในขั้นต้น

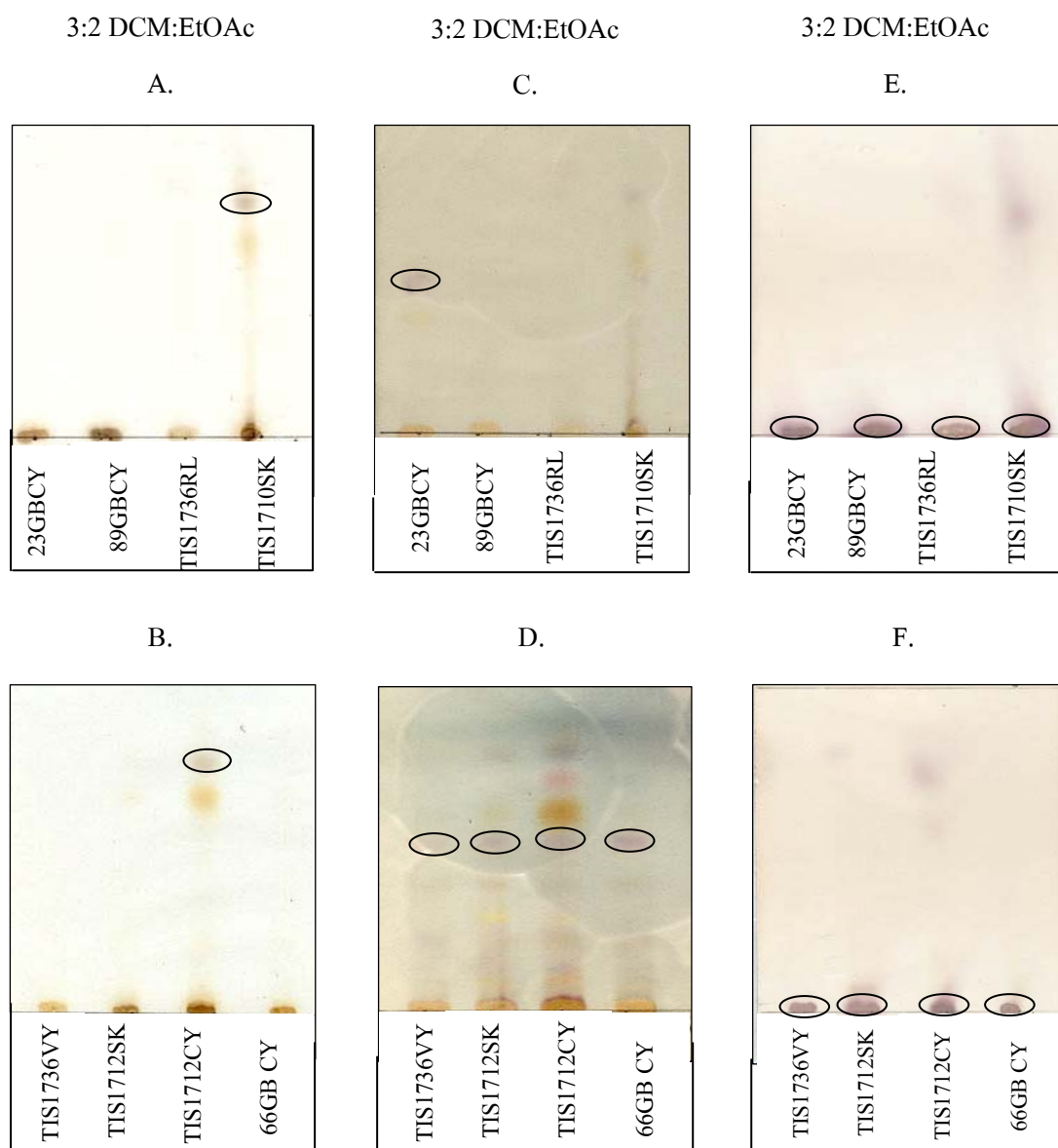
จากการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียของสารทั้ง 303 ตัวอย่างในข้อ 3 พบว่ามีสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 15 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบค่า MIC ต่ำกว่า 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ GB086CY, GB097CY, GB102CY, GB111CY, 23GBCY, 52GBCY, 52GBVY, 66GBVY, 89GBCY, 96GBCY, TISTR1710SK, TISTR1712SK, TISTR1712CY, TISTR1736RL และ TISTR1736VY โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเหล่านี้ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอยู่ในช่วงระหว่าง 9.38-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

จากการนำสารสกัดหยาบทั้ง 15 ตัวอย่างมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี TLC สามารถแบ่งกลุ่มของสารสกัดหยาบได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะขององค์ประกอบทางเคมีบนแผ่น TLC ซึ่งอาศัยการจัดจำแนกตามตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ใช้แยกคือ กลุ่มที่ 1 ใช้ไคคลอโร

มีแทนต่อเอธิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 3:2 เป็น mobile phase ได้แก่ 23GB CY, 66GB VY, 89GB CY, TISTR1710 SK, TISTR1712 SK, TISTR1712 CY, TISTR1736 RL และ TISTR1736 VY และกลุ่มที่ 2 ใช้ไดคลอโรมีเทนต่อเอธิลอะซิเตทต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 8.5:0.5:1 เป็น mobile phase ได้แก่ 52GB CY, 52GB VY, 96GB CY, GB086 CY, GB097 CY, GB102 CY และ GB111 CY

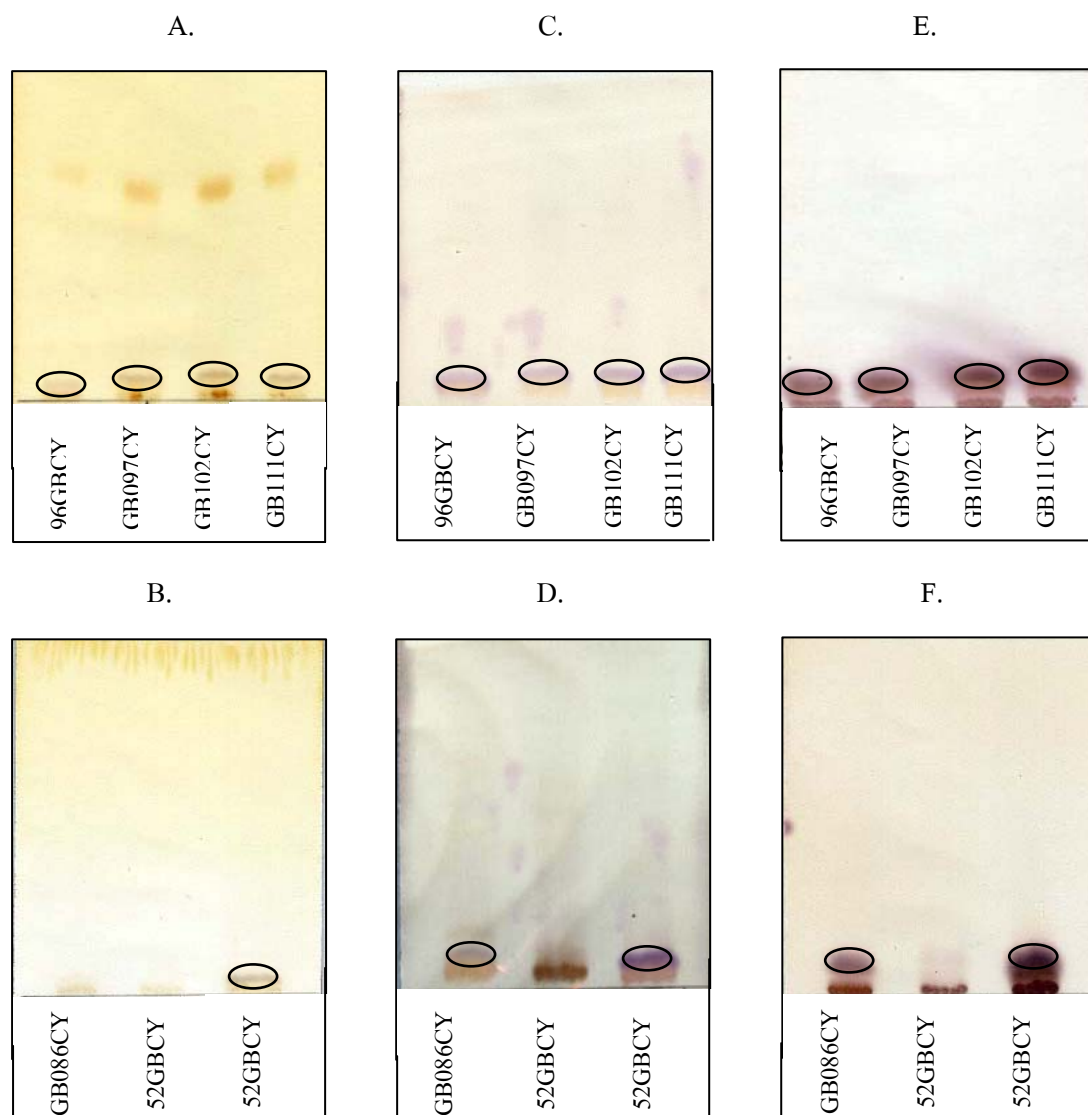
สำหรับการศึกษาชนิดขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบกระทำโดยการทดสอบชนิดของสารในกลุ่มของ alkaloids, terpenes และ peptides ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญของยาจากแหล่งธรรมชาติโดยใช้ Wagner's reagent, Vanillin ใน H_2SO_4 และ Ninhydrin reagent ในการทดสอบ ตามลำดับ โดยที่ Wagner's reagent เป็นรีเอเจนต์ที่ทำปฏิกิริยากับอะมิโนอิสระ เกิดเป็นสีน้ำตาลแดงในขณะที่ Ninhydrin reagent จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบ เกิดเป็นสีม่วงแดง และ Vanillin ใน H_2SO_4 ทำปฏิกิริยากับ triterpene อิสระเกิดเป็นสีม่วงแดงเช่นเดียวกัน จากการทดลองพบว่า 2 ตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ TISTR1710 SK และ TISTR1712 CY และ 5 ตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ 96GB CY, GB097 CY, GB102 CY, GB111 CY และ 52GB VY เกิด spot สีน้ำตาลแดงเมื่อทดสอบด้วย Wagner's reagent แสดงว่ามีสารในกลุ่มอัลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ และเมื่อทดสอบสารสกัดหยาบทั้งหมดด้วย vanillin ใน H_2SO_4 พบว่ามี 5 ตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ 23GB CY, 66GB VY, TISTR1712 SK, TISTR1712 CY, TISTR1736 VY และทุกตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 ยกเว้น 52GB CY เกิด spot สีม่วงแดง แสดงว่ามีสารกลุ่ม terpenes และ terpenoids นอกจากนี้เมื่อทดสอบด้วย Ninhydrin test พบว่าทุกตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 นั่นคือ 23GB CY, 66GB VY, 89GB CY, TISTR1710 SK, TISTR1712 SK, TISTR1712 CY, TISTR1736 RL และ TISTR1736 VY และทุกตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 ยกเว้น 52GB CY เกิด spot สีม่วงแดง แสดงว่ามีสารในกลุ่มเปปไทด์ จากการทดลองจะเห็นได้ว่ามีสารสกัดหยาบ 6 ตัวอย่าง คือ 52GB VY, 96GB CY, GB097 CY, GB102 CY, GB111 CY และ TISTR1712 CY ที่มีสารทั้งในกลุ่มของ alkaloids, terpenes และ peptides เป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในภาพที่ 34 และ 35 และสรุปผลการทดสอบ alkaloids, terpenes และ peptides ดังแสดงในตารางที่ 12 อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี TLC นั้นเป็นเพียงการทดสอบและจัดกลุ่มของสารเบื้องต้นตามความสามารถในการแยกด้วยระบบ solvent ที่แตกต่างกัน ซึ่งสารสกัดจากแบคทีเรียไกลดิงสกัดโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ดังนั้นสารสกัดหยาบที่ได้จึงค่อนข้างมีสภาพขี้สูง อีกทั้งเป็นสารสกัดหยาบที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ในขั้นตอนการทำ TLC จึงค่อนข้างยากที่จะแยกสารอย่างสมบูรณ์ แต่ผลการทดสอบที่ได้ก็เพียงพอที่จะใช้ในการจัดจำแนกชนิดของสารสกัดหยาบในเบื้องต้น



ภาพที่ 34 Thin Layer Chromatogram ของสารสกัดหยาบ 23GB CY, 66GB VY, 89GB CY, TISTR1710 SK, TISTR1712 SK, TISTR1712 CY, TISTR1736 RL และ TISTR1736 VY ที่ทดสอบด้วย Wagner's reagent (A, B: alkaloid detection), Vanillin ใน H_2SO_4 (C, D: terpenes detection) และ Ninhydrin reagent (E, F: peptides detection)

Figure 34. Thin Layer Chromatogram of 23GB CY, 66GB VY, 89GB CY, TISTR1710 SK, TISTR1712 SK, TISTR1712 CY, TISTR1736 RL and TISTR1736 VY sprayed with Wagner's reagent (A, B: alkaloid detection), Vanillin in H_2SO_4 (C, D: terpenes detection) and Ninhydrin reagent (E, F: peptides detection)

8.5:0.5:1 DCM:EtOAc:MeOH 8.5:0.5:1 DCM:EtOAc:MeOH 8.5:0.5:1 DCM:EtOAc:MeOH



ภาพที่ 35 Thin Layer Chromatogram ของสารสกัดหยาบ 52GB CY, 52GB VY, 96GB CY, GB086 CY, GB097 CY, GB102 CY และ GB111 CY ที่ทดสอบด้วย Wagner's reagent (A, B: alkaloid detection), Vanillin ใน H_2SO_4 (C, D: terpenes detection) และ Ninhydrin reagent (E, F: peptides detection)

Figure 35. Thin Layer Chromatogram of 52GB CY, 52GB VY, 96GB CY, GB086 CY, GB097CY, GB102 CY and GB111 CY sprayed with Wagner's reagent (A, B: alkaloid detection), Vanillin in H_2SO_4 (C, D: terpenes detection) and Ninhydrin reagent (E, F: peptides detection)

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้ง
แบคทีเรีย

Table 12. Chemical composition analysis of active crude extracts

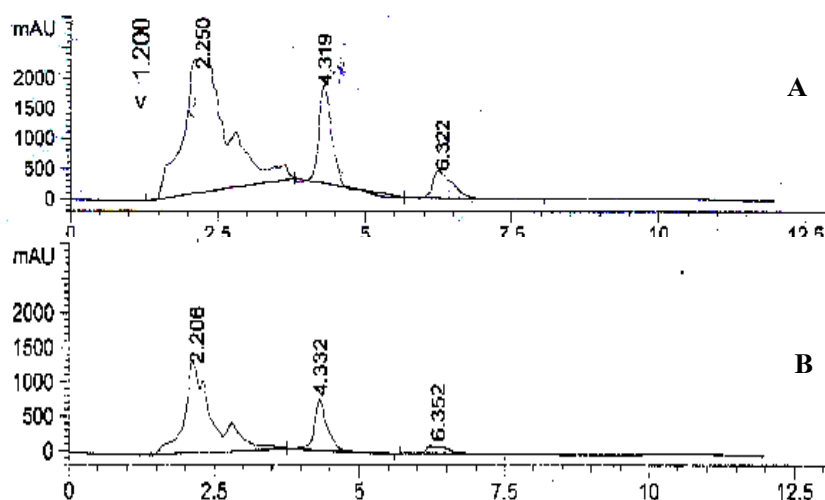
Active extracts	Alkaloid detection	Terpene detection	Peptide detection
GB 086 CY		+	+
GB 097 CY	+	+	+
GB 102 CY	+	+	+
GB 111 CY	+	+	+
23 GB CY		+	
52 GB CY			
52 GB VY	+	+	+
66 GB VY		+	
89 GB CY			
96 GB CY	+	+	+
TISTR1710SK	+		+
TISTR1712SK		+	
TISTR1712CY	+	+	+
TISTR1736RL			
TISTR1736VY		+	

หมายเหตุ + คือ มีสารในกลุ่มที่ทดสอบเป็นองค์ประกอบ

5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

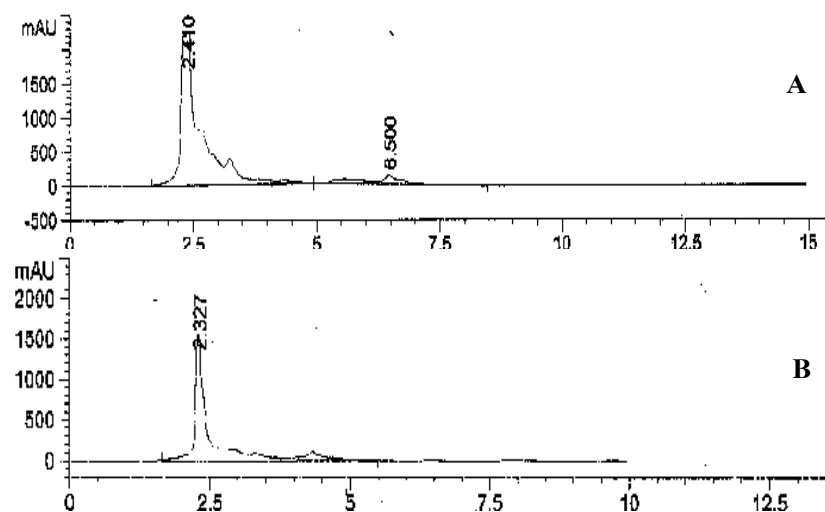
นำสารสกัดหยาบทั้ง 15 ตัวอย่าง ที่คัดเลือกแล้วไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี HPLC และจัดกลุ่มสารสกัดหยาบตาม HPLC chromatogram ของตัวอย่างที่คล้ายคลึงกันโดยใช้คอลัมน์ชนิด reversed phase (Thermo Hypersil BDS C18 5 μ m, 4.5x250 mm) ตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเลตชนิด diode array โดยกำหนดความยาวคลื่นที่ 210 และ 230 นาโนเมตรเนื่องจากความยาวคลื่นที่ 210 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นที่สามารถตรวจวัดสารที่เป็นองค์ประกอบได้เกือบทุกชนิด ทั้งที่ดูดกลืนแสงช่วง UV และไม่ดูดกลืนแสงช่วง UV ส่วนที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นที่สารที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด จากการวัดในเบื้องต้นด้วย UV spectrophotometer ปริมาณตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ครั้งละ 20 ไมโครลิตร และเตรียมตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารละลายเมทานอล:น้ำ (75:25) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ ด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ระยะเวลา 20 นาที จากผลการทดลองที่ได้สามารถแบ่งสารออกได้เป็น 5 กลุ่ม ตามลักษณะโครมาโตแกรมที่คล้ายคลึงกัน ดังแสดงในภาพที่ 36-40 โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ TISTR1712 CY และ TISTR1736 RL กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 4 ตัวอย่าง คือ TISTR1710 SK, TISTR1712 SK, TISTR1736 VY และ 66GB VY กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 6 ตัวอย่าง คือ 52GB CY, 52GB VY, 96GB CY, GB097 CY, GB102 CY และ GB111 CY กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ 23GB CY และ 89GB CY กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย 1 ตัวอย่าง คือ GB086 CY

ผลการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี TLC และ HPLC พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน นั่นคือผลของ TLC สามารถแบ่งสารได้เป็น 2 กลุ่ม ตามตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ใช้แยก กลุ่มที่ 1 ได้แก่ 23GB CY, 66GB VY, 89GB CY, TISTR1710 SK, TISTR1712 SK, TISTR1712 CY, TISTR1736 RL และ TISTR1736 VY เมื่อนำสารกลุ่มที่ 1 ทดสอบด้วย HPLC พบว่าให้ผลของ HPLC chromatogram แตกต่างกัน 3 แบบ ส่วนสารในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ 52GB CY, 52GB VY, 96GB CY, GB086 CY, GB097 CY, GB102 CY และ GB111 CY เมื่อนำสารกลุ่มที่ 2 ทดสอบด้วย HPLC พบว่าให้ผลของ HPLC chromatogram แตกต่างกัน 2 แบบ เนื่องจากการทดสอบด้วย TLC ซึ่งใช้ silica gel ชนิด normal phase เป็น stationary phase พบว่าสารที่มีขั้วต่ำจะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่มีขั้วสูงจะถูกแยกออกมาทีหลังและยังคงติดอยู่ที่ฐานไม่สามารถแยกได้ แต่ HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด reversed phase คือ C18 สารที่มีขั้วสูงจะถูกแยกออกมาก่อน สารที่มีขั้วต่ำจะถูกแยกออกมาทีหลัง อีกทั้ง HPLC ใช้ปั๊มที่มีแรงดันสูง จึงสามารถแยกสารได้ดีกว่าและมีประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่า TLC



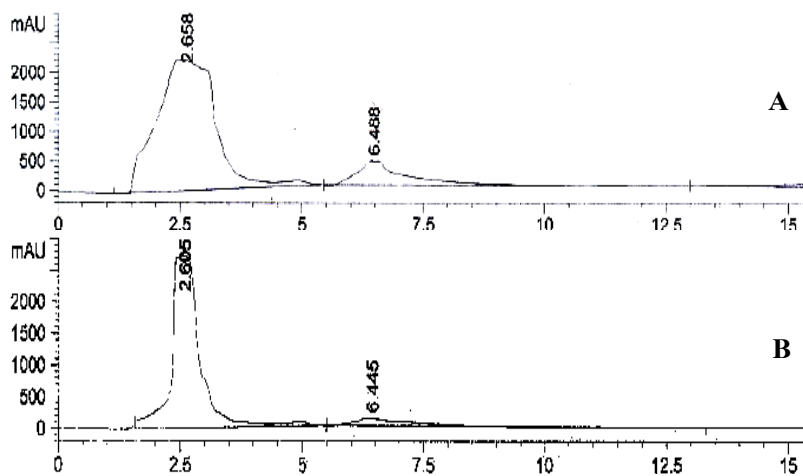
ภาพที่ 36 โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ TISTR1712 CY ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตรและ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)

Figure 36. Diode Array Detector HPLC chromatogram of TISTR1712 CY with 75:25 MeOH:H₂O as mobile phase (A : wavelength 210 nm and B: wavelength 230 nm)



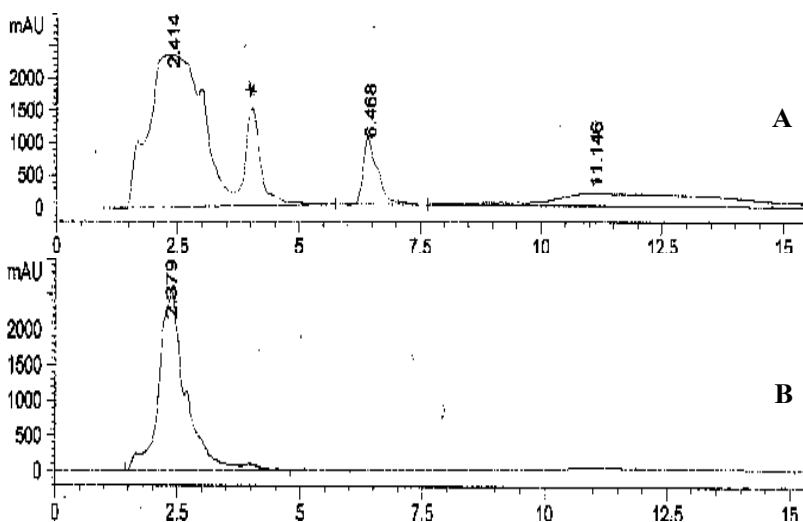
ภาพที่ 37 โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ TISTR1712 SK ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)

Figure 37. Diode Array Detector HPLC chromatogram of TISTR1712 SK with 75:25 MeOH:H₂O as mobile phase (A : wavelength 210 nm and B: wavelength 230 nm)



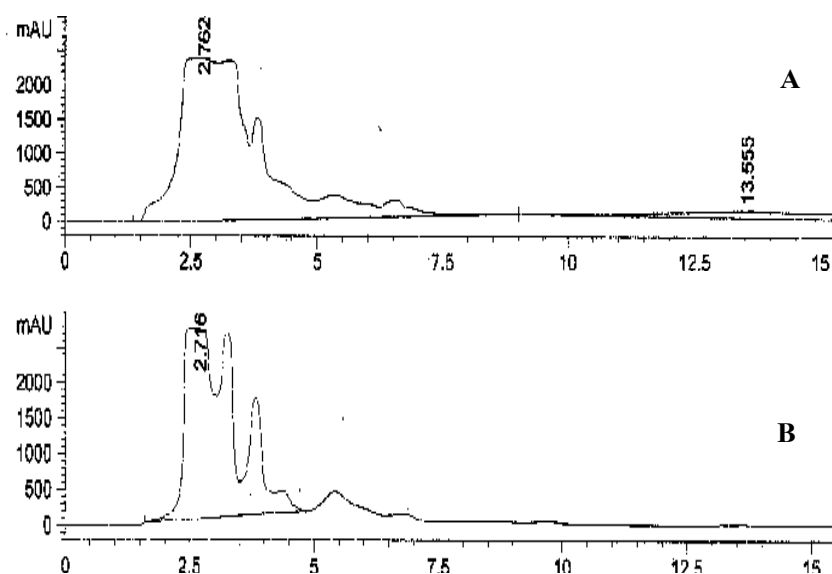
ภาพที่ 38 โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ GB102 CY ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)

Figure 38. Diode Array Detector HPLC chromatogram of GB102 CY with 75:25 MeOH:H₂O as mobile phase (A : wavelength 210 nm and B: wavelength 230 nm)



ภาพที่ 39 โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ 89GB CY ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)

Figure 39. Diode Array Detector HPLC chromatogram of 89GB CY with 75:25 MeOH:H₂O as mobile phase (A : wavelength 210 nm and B: wavelength 230 nm)



ภาพที่ 40 โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดหยาบ GB086 CY ที่มี 75:25 เมทานอลต่อน้ำ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A: ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และ B: ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร)

Figure 40. Diode Array Detector HPLC chromatogram of GB086 CY with 75:25 MeOH:H₂O as mobile phase (A : wavelength 210 nm and B: wavelength 230 nm)

5.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

จากข้อมูล ¹H NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบที่คัดเลือกได้ในสารละลาย DMSO-d₆ (ภาคผนวก ฉ) พบว่าให้ผลสอดคล้องกับผลของ HPLC chromatogram กล่าวคือ สารสกัดหยาบที่ให้ผลของ HPLC โครมาโตแกรมเหมือนกัน จะแสดงสัญญาณ ¹H NMR สเปกตรัม คล้ายคลึงกันด้วย ยกเว้นสารสกัดหยาบในกลุ่มที่ 1 (TISTR1712 CY และ TISTR1736 RL) และกลุ่มที่ 4 (23GB CY และ 89GB CY) ซึ่งให้ผลของ HPLC โครมาโตแกรมที่ต่างกัน แต่แสดงสัญญาณ ¹H NMR สเปกตรัม เหมือนกัน และพบว่า ¹H NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบทุกตัวอย่างแสดงสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ) ในช่วง 7-8 ppm บ่งชี้ว่าสารสกัดหยาบทุกตัวอย่างมีอะโรมาติกโปรตอน ในโครงสร้าง และมีสารสกัดหยาบจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ TISTR1710 SK, TISTR1712 SK และ TISTR1736 VY แสดงสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ) ช่วง 4-5 ppm แสดงว่ามีโปรตอนที่เกาะอยู่กับ heteroatoms เช่น CH₂O, CH₂NO₂, CH₂Cl เป็นองค์ประกอบของโครงสร้าง โดยเฉพาะสารสกัด

หายาบ TISTR1712 SK ซึ่งมีความสูงของสัญญาณมากที่สุด อาจเป็นไปได้ว่าหากโครงสร้างของสารที่มีอะโรมาติกโปรตอนและโปรตอนที่เกาะอยู่กับ heteroatoms เป็นสารที่มีโอกาสจะเป็นสารชนิดใหม่ที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้ เนื่องจากทำให้โครงสร้างมีความซับซ้อนและมีความแตกต่างกันของตำแหน่งการจัดเรียงตัวของอะตอม ส่งผลให้สามารถพบโครงสร้างดังกล่าวได้ยากกว่าโครงสร้างพื้นฐาน ซึ่งการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างจากข้อมูล $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัม สามารถทราบหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างได้จากค่า chemical shift (δ) อย่างไรก็ตามการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดหายาบจะต้องอาศัยการแยกสารและทำให้สารบริสุทธิ์ตลอดจนต้องอาศัยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆ ประกอบกัน จึงจะสามารถวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีได้ซึ่งจะอยู่นอกเหนือขอบเขตของการวิจัยนี้

จากการคัดเลือกสารสกัดหายาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ให้ค่า MIC ต่ำกว่า $150 \mu\text{g/ml}$ จำนวน 15 สารสกัด ซึ่งมาจากตัวอย่างแตกต่างกัน ได้แก่ ฟิล์มชีวภาพ, สาหร่าย, เศษเชือก, เปลือกหอย และกระดองหมีก พบว่าสาหร่ายและเศษเชือกเป็นตัวอย่างที่ดีในการแยกแบคทีเรียไกลดิงที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย โดยพบว่าแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *Rapidithrix thailandica* ซึ่งแยกได้จากเศษเชือกมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยเฉพาะแบคทีเรียคือยาสายพันธุ์ MRSA และ VRE มีค่า MIC เท่ากับ 9.38 และ 18.75 ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหายาบทั้ง 15 ตัวอย่าง สามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ ซึ่งมีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป นอกจากนี้พบว่าการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงในอาหารสูตร CY สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่แตกต่างกันทำให้สร้างสารแตกต่างกัน และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันด้วย อย่างเช่นการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *Rapidithrix thailandica* ในอาหารสูตร RL1 และ VY/2 พบว่าสารสกัดหายาบจากอาหารสูตร RL1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในขณะที่สารสกัดหายาบจากอาหารสูตร VY/2 สามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อ MRSA ซึ่งสอดคล้องกับผลของ TLC และ HPLC ของทั้ง 2 สารสกัด ซึ่งแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 13 การเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์เดียวกันในอาหารสูตรเดียวกัน อย่างเช่น การเลี้ยงเชื้อ *Tenacibaculum mesophilum* 4 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร CY เหมือนกัน ให้ผลการทดสอบด้วย TLC, HPLC และ NMR เหมือนกัน นั่นไม่ได้หมายความว่าสารสกัดหายาบที่ได้จะเป็นสารชนิดเดียวกัน จะเห็นได้จากการที่สารสกัดหายาบจากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 13 เนื่องจากสารสกัดหายาบมีสารประกอบมากมายหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ อาจมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันแต่มีตำแหน่งในการออกฤทธิ์ของสารแตกต่างกันไป

ตารางที่ 13 ผลการคัดกรองสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิ้งที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

Table 13. Antibacterial activity of marine gliding bacterial crude extracts and their chemical composition

Strain	Source	Media	Antibacterial activities MIC ($\mu\text{g/ml}$)					TLC			Classification by	
			M	V	B	S	P	Alkaloid	Terpene	Peptide	HPLC (group)	NMR (group)
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	Biofilm	CY	75	37.5	150	-	-		/	/	5	4
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	Biofilm	CY	18.75	-	150	18.75	-	/	/	/	3	3
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	Seaweed	CY	75	-	150	-	-	/	/	/	3	3
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	Rope	CY	150	37.5		75	-	/	/	/	3	3
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	Cuttle bone	CY	150	-	37.5	-	-	/	/	/	3	3
<i>Rapidithrix thailandica</i>	Seaweed	VY/2	37.5	-		-	-		/		2	2
<i>Rapidithrix thailandica</i>	Shell	SK	75	-		-	-	/		/	2	2
<i>Rapidithrix thailandica</i>	Rope	RL1	9.38	18.75	150	150	37.5				1	1
<i>Rapidithrix thailandica</i>	Rope	VY/2	75	-	-	-	-		/		2	2
<i>Alphaproteobacterium</i>	Rope	CY	37.5	-		-	18.75				4	1
Unidentify	Shell	SK	150	-	75	-	-		/		2	2

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Table 13. (Cont.)

Strain	Source	Media	Antibacterial activities MIC ($\mu\text{g/ml}$)					TLC			Classification by	
			M	V	B	S	P	Alkaloid	Terpene	Peptide	HPLC (group)	NMR (group)
Unidentify	Shell	CY	150	-	75	-	-	/	/	/	1	1
Unidentify	Cuttle bone	CY	150	-	150	150	18.75		/		4	1
Unidentify	Seaweed	CY	75	-	150	-	-				3	3
Unidentify	Seaweed	VY/2	18.75	37.5		-	-	/	/	/	3	3

M= MRSA, V= VRE, B= *B. subtilis*, S= *Sal. Typhi*, P= *P. aeruginosa*

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 19 สายพันธุ์ โดยพบว่าแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้ 4 สายพันธุ์มีความใกล้เคียงกับ *Tenacibaculum mesophilum* (Families: Flavobacteriaceae) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับร้อยละ 98-100 และ 1 สายพันธุ์มีความใกล้เคียงกับ *Flexibacter echinica* (Families: Cytophagaceae) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับร้อยละ 99 และพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้คือ 14 สายพันธุ์มีความใกล้เคียงกับ *Alphaproteobacterium* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในช่วงร้อยละ 96-100 ซึ่งแบคทีเรียไกลดิงที่แยกได้เมื่อเทียบเคียงสายพันธุ์ในฐานข้อมูลแล้วเป็น *Alphaproteobacterium* นั้นอาจเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ซึ่งไม่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ NCBI รวมทั้งเมื่อพิจารณาจากลักษณะของ Swarm colony บนจานเพาะเชื้อ และลักษณะรูปร่างเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast ร่วมกับการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ยืนยันว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียไกลดิง

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงทั้ง 19 สายพันธุ์ เพื่อผลิตสารสกัดหยาบในอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร ได้แก่ สูตร CY ซึ่งมี casitone, malt extract, yeast extract เป็นองค์ประกอบ สูตร RL1 มี peptone, yeast extract, vitamin B₁₂ เป็นองค์ประกอบ สูตร VY/2 มี Baker's yeast paste เป็นองค์ประกอบ และ SK มี skim milk, yeast extract เป็นองค์ประกอบ รวมเป็น 76 สารสกัด และในการคัดกรองสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิงที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 51299, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella* Typhi และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้นำสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียไกลดิงที่มีในห้องปฏิบัติการมาทดสอบด้วย 227 สารสกัด รวมเป็น 303 สารสกัดหยาบ การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะใช้วิธี colorimetric microdilution broth ซึ่งมี AlamarBlue เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่ามี 58 สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 9.38-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทดลองพบว่าอาหารสูตร CY ให้สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุดคือ 24 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 41 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร CY ทั้งหมด 58 ตัวอย่าง) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร RL1 เป็นอาหารที่ผลิตสารสกัดหยาบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยที่สุด โดยมีเพียง 8 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ

14 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร RL1 ทั้งหมด) ส่วนอาหารสูตร VY/2 และ SK สามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้มากเป็นอันดับสองและสามตามลำดับคือ อาหารสูตร VY/2 มีจำนวน 15 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 25 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร VY/2 ทั้งหมด) และอาหารสูตร SK 11 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 19 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากอาหารสูตร SK ทั้งหมด) การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงในอาหารสูตรที่แตกต่างกัน ทำให้ได้สารสกัดหยาบที่แตกต่างกัน และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันด้วย การหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลากหลายและเหมาะสมทำให้มีโอกาสได้สารชนิดใหม่

จากการคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ให้ค่า MIC ต่ำกว่า 150 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 15 สารสกัด ซึ่งมาจากตัวอย่างแตกต่างกัน ได้แก่ ฟิล์มชีวภาพ, สาหร่าย, เศษเชือก, เปลือกหอย และกระดองหมีก พบว่าสาหร่ายและเศษเชือกเป็นตัวอย่างที่ดีในการแยกแบคทีเรียไกลดิงที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย โดยพบว่าแบคทีเรียไกลดิงสายพันธุ์ *Rapidithrix thailandica* ซึ่งแยกได้จากเศษเชือกมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยเฉพาะแบคทีเรียคือยาสายพันธุ์ MRSA และ VRE มีค่า MIC เท่ากับ 9.38 และ 18.75 ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหยาบทั้ง 15 ตัวอย่าง มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี TLC, HPLC และ NMR พบว่า เชื้อสายพันธุ์เดียวกันเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกัน จะให้ผลของ TLC, HPLC และ NMR เหมือนกัน แต่อาจไม่ใช่สารชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบแตกต่างกัน

จากการทดลองครั้งนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลสาบพันธุ์ใหม่ได้ 14 สายพันธุ์ และยังพบว่าตัวอย่างที่เหมาะสมในการแยกแบคทีเรียไกลดิงจากทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะแบคทีเรียคือยาสายพันธุ์ MRSA และ VRE คือ สาหร่ายและเศษเชือก โดยอาหารที่เหมาะสมในเลี้ยงแบคทีเรียไกลดิงเพื่อผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบที่ดีที่สุดคืออาหารสูตร CY ซึ่งเป็น complex medium ที่มี casitone เป็นองค์ประกอบหลัก

เอกสารอ้างอิง

- พิมพ์จิต คามพวรรณ และ วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล. 2542. สเปกโทรสโกปีของสารอินทรีย์. ใน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี. เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 3. หน้า 68-97. ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- สุภานันท์ แซ่ลิ้ม. 2548. สารต้านแบคทีเรียจากแอคติโนมัยสีทในทะเลของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- อัครวิทย์ กาญจนโอภาส. 2548. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่องสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ ในทะเลในประเทศไทย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. 2000. ภาวะวิกฤตของการติดยาปฏิชีวนะ (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.readyplanet.net.html> (31 ตุลาคม 2550)
- Alexander, O. N., Brunello, O., Christopher, S., Anthony, H., Colin, F. and Ian, C. 2000. RNA polymerase inhibitors with activity against rifampin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. Am. Soc. Microbiol. 44: 3163–3166.
- Baker, C. N., Tenover, F. C. 1996. Evaluation of alamar colorimetric broth microdilution susceptibility testing method for staphylococci and enterococci. J. Clin. Microbiol. 34: 2654-2659.
- Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. 1992. The Prokaryotes; A Handbook on the Biology of Bacteria; Ecophysiology, Isolation, Identification, Application. The Myxospore. 188: 3416-3476.
- Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. 1992. The Prokaryotes; A Handbook on the Biology of Bacteria; Ecophysiology, Isolation, Identification, Application. The Cytophagale. 199: 3631-3664.
- Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B. and Muller, R. 1999. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly) peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. BBA-Bioenergetics. 1445: 185-195.

- Bitzer, J., GroBe, T., Wang, L., Lang, S., Beil, W. and Zeeck, A. 2006. New aminophenoxazinones from a marine *Halomonas* sp.: fermentation, structure elucidation, and biological activity. *J. Antibiot.* 59: 86-92.
- Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C. and Goodfellow, M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Leeuwenhoek.* 87: 65–79.
- Content, S., Dutton, C. J. and Roberts, L. 2003. Myxovirescin analogues via macrocyclic ring-closing metathesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 321–325.
- Crew, P., Rodríguez, J. and Jaspars, M. 1998. *Organic Structure Analysis*. Oxford University Press. New York.
- Dawid, W. 2000. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 403-427.
- Dworkin, M., 1996. Recent advances in the social and development biology of the Myxobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 60: 70-102.
- Faulkner, D. J. 2000a. Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *J. Nat. Prod.* 17: 1-6.
- Faulkner, D. J. 2000b. Marine pharmacology. *Nat. Prod. Rep.* 19: 1-48.
- Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C., Mayhead, S. L., Faulkner, D. J., Sincich, C., Rao, M. R., Kantorowski, E. J., West, L. M., Strangman, W. K., Shimizu, Y., Li, B., Thammana, S., Drainville, K., Davies-Coleman, M. T., Kramer, R. A., Fairchild, C. R., Rose, W. C., Wild, R. C., Vite, G. D. and Peterson, R. W. 2003. New anticancer drugs from cultured and collected marine organisms. *Pharm. Biol.* 41: 6-14.
- Franklin, I. J. and Snow, G. A. 1989. *Biochemistry of Antimicrobial Action*. Chapman and Hall. 4th Ed. Springer-Verlag. New York.
- Frias-Lopez, J., Zerkle, A. L., Bonheyo, G. T. and Fouke, B. W. 2002. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2214-2228.
- Fudou, R., Iizuka, T. and Yamanaka, S. 2001. Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium: 1. fermentation and biological characteristics. *J. Antibiot.* 54: 149-152.

- Gaspari, F., Paitan, Y., Mainini, M., Losi, D., Ron, E. Z. and Marinelli, F. 2005. Myxobacteria isolated in Israel as potential source of new anti-infectives. *J. Appl. Microbiol.* 98: 429-439.
- Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S. and Muller, R. 2003. Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities-past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J. Biot.* 106: 233-253.
- Gerth, K. and Reichenbach, H. 1978. Introduction of myxospore formation in *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacteriales) I. General characterization of the system. *Arch. Microbiol.* 177: 173-182.
- Gezzano-Santoro, H., Ralph, P., Ryskamp, T. C., Chen, A. B. and Mukku, V. R. 1997. A non-radioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody. *J. Immun. Med.* 202: 163-171.
- Grabley, S. and Thiericke, R. 1999. The impact of natural products on drug discovery. *In Drug Discovery from Nature.* (Grabley, S. and Thiericke, R., Eds.). p. 3-37. Springer. Berlin.
- Haefner, B. 2003. Drug from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today.* 8: 536-544.
- Hopf, N. W., Yonsel, S. and Deckwer, W. D. 1990. Ambruticin S production in amino acid rich media. *Appl. Microbiol. Biot.* 32: 499-504.
- Hugo, W. B. and Russell, A. D. (editors). 1987. *Pharmaceutical Microbiology.* PG Publishing. Pte. Ltd.
- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R. and Yamanaka, S. 1998. Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 169: 317-322.
- Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Hiraishi, A., Ahn, W. J. and Yamanaka, S. 2003. *Plesiocystis pacifica* gen. nov., a marine myxobacterium that contains dehydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coast of Japan. *Syst. Appl. Microbiol.* 53: 189-19.
- Jansen, R., Kunze, B., Reichenbach, H. and Hofle, G. 2003. Chondrochloren A and B, New β -amino styrenes from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria). *J. Org. Chem.* 49: 2684-2689.

- Katayama, N., Fukusumi, S., Funabashi, Y., Iwahi, T. and Ono, H. 1993. TAN-1057 A-D, new antibiotics with potent antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Taxonomy, fermentation and biological activity. *J. Antibiot.* 46: 606-13.
- Keese, R. and Brandle, M. P. 2006. Chromatography. *In Practical Organic Synthesis: A Student's Guide.* (Toube, T. P., ed.). p. 55-61. University of London. London.
- Knauth, P. and Reichenbach, H. 2000. On the mechanism of action of the myxobacterial fungicide ambruticin. *J. Antibiot.* 53: 1182-1190.
- Kuner, J. M. and Kaiser, D. 1982. Fruiting body morphogenesis in submerged cultures of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 151: 458-61.
- Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Hofle, G. and Reichenbach, H. 1998. Apicularens A and B, New cytostatic macrolides from *Chondromyces* species (Myxobacteria): production, physical-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 51: 1075-1080.
- Lancaster, M. V. and Fields, R. D. 1996. Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. *J. Antibiot.* 5: 501-959.
- Lee, Y. K., Kwon, K. K., Cho, K. H., Kim, H. W., Park, J. H. and Lee, H. K. 2003. Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *J. Microbiol.* 41: 183-188.
- Li, Z. Y., Hu, W., Zhang, Q. Y., Qui, Z., Zhang, Y. and Wu, H. B. 2002. A simple method to isolate salt-tolerant myxobacteria from marine samples. *J. Med. Microbiol.* 50: 205-209.
- McCurdy, H. D. 1989. Order Myxococcales *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3. (Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N. and Holt, J. G. Eds.). p. 2139-2170. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Mims, C. A., Playfair-John, H. L., Roitt, I. M., Wakelin, D. and Williams, R. 1993. Antimicrobial agents and Chemotherapy. *J. Med. Microbiol.* 5: 239-242.
- Nakagawa, Y., Suzuki, M. and Hatano, K. 2001. Phylogenetic diversity of *Cytophaga*-like strains isolated from the sub-Tropical zone of Japan. *Inst. Ferm. Res. Commun.* 20: 61-72.
- Ó'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267: 5421-5426.
- Ravenschlag, K., Sahn, K., Pernthaler, J. and Amann, R. 1999. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3982-3989.

- Rice, L. B. 2006. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *J. Med.* 119: 11-19.
- Reichenbach, H. 1981. Taxonomy of the gliding bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 339-364.
- Reichenbach, H. 2001. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 27: 149-156.
- Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1992. The myxobacteria. *In* *The Prokaryotes*. 2nd ed. (Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H., eds.). p. 3416-3487. Springer. New York.
- Richard, M. 1986. Interaction of stigmatellin and DNP-INT with the Rieske iron-sulfur center of the chloroplast cytochrome b_6 -f complex. *Mol. Plant Biol.* 208: 1-4.
- Rodrigues, E., Tilvi, S. and Naik, C. G. 2004. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 309:121-127.
- Sasse, F., Steinmetz, H., Heil, J., Hofle, G. and Reichenbach, H. 2000. Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubule: production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 53: 879-885.
- Schmidt, E. W., Nelson, J. T. and Fillmore, J. P. 2004. Synthesis of tyrosine derivatives for saframycin MX1 biosynthetic studies. *Tetrahedron Lett.* 45: 3921-3924.
- Schwartzmann, G., Da Rocha, A. B., Berlinck, J. G. S. and Jimeno, J. 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol.* 2: 221-225.
- Sherma, J. and Fried, B. 1996. Chromatographic science. *In* *Handbook of Thin-layer Chromatography*. Vol. 71. 2nd ed. (Kowalska, T. and Sherma, J., eds.). p. 1-49. Springer. Berlin.
- Shoji, J., Hino, H., Matsumoto, K., Hattori, T., Yoshida, T. and Matsuura, S. 1988. Isolation and characterization of Katanosins A and B. *J. Antibiot.* 41: 713-718.
- Silverstein, R. M. and Webster, F. X. 1998. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 6th Ed. United State of America. USA.
- Singh, S. B. and Barrett, J. F. 2006. Empirical antibacterial drug discovery-Foundation in natural products. *J. Biochem. Pharmacol.* 71: 1006 – 1015.
- Spyere, A., Rowley, C. D., Jensen, R. P. and Fenical, W. 2003. New neoverrucosane diterpenoids produced by the marine gliding bacterium *Saprospira grandis*. *J. Nat. Prod.* 66: 818-822.

- Stach, J. E., Maldonado, L. A., Masson, D. G., Ward, A. C., Goodfellow, M. and Bull, A. T. 2003. Statistical Approaches for Estimating Actinobacterial Diversity in Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6189-6200.
- Strohl, W. 1997. *Biotechnology of Antibiotics*. 2nd Ed. Marcel Dekker. New York.
- Suzuki, Y., Ojika, M., Sakagami, Y., Fudou, R. and Yamanaka, S. 1998. Cystothiazoles C-F, new bithiazole-type antibiotics from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*. *Tetrahedron*. 54: 1399-1404.
- Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *J. Infect. Cont.* 34: 3-10.
- Vollbrecht, L., Steinmetz, H. and Hofle, G. 2002. Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from Myxobacteria II. Structure elucidation and stereochemistry. *J. Antibiot.* 55: 715-721.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียที่เรียกลดจางทะเล

1. อาหารสูตร Na-glutamate medium

L-glutamic acid monosodium salt	1.0	กรัม
NH_4NO_3	0.01	กรัม
K_2HPO_4	0.01	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร Na-glutamate medium เติม crystal violet

L-glutamic acid monosodium salt	1.0	กรัม
NH_4NO_3	0.01	กรัม
K_2HPO_4	0.01	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Crystal violet	10.0	ไมโครกรัมต่อลิตร
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารสูตร SAP2

Tryptone	1.0	กรัม
Yeast Extract	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไกลดิงจากทะเล

1. อาหารสูตร RL1 (ดัดแปลงจาก Spycere *et al.*, 2003)

Peptone	3.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
Potassium nitrate	0.5	กรัม
Vitamin B ₁₂	0.5	ไมโครกรัมต่อลิตร
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร SK

Skim milk	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
MgSO ₄	1.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารสูตร CY (ดัดแปลงจาก Suzuki *et al.*, 2003)

Casitone	10.0	กรัม
Malt extract	2.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารสูตร VY/2 (ดัดแปลงจาก Iizuka *et al.*, 2003)

Baker's yeast paste	5.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบและใช้วิเคราะห์ผลกระทบของการเจริญของแบคทีเรีย

1. Nutrient agar

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. RPMI 1640 medium

RPMI 1640	1.0	ซอง
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	1000.0	มิลลิลิตร

ผสม RPMI 1640 medium 1 ซองในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำไปฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 μm

ภาคผนวก ข

องค์ประกอบและการเตรียมสารเคมี

สารเคมีสำหรับทดสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

1. Ninhydrin reagents

Ninhydrin	200.0	มิลลิกรัม
Butanol	95.0	มิลลิลิตร
10% AcOH	5.0	มิลลิลิตร

เตรียมใส่ในขวดสเปรย์ หุ้มด้วยฟลอยด์ป้องกันแสง หากเกิดสีม่วงแดงเมื่อทดสอบด้วย Ninhydrin reagents แสดงว่ามีสารในกลุ่มเปปไทด์เป็นองค์ประกอบ

2. Wagner's reagents

Iodine	10.0	กรัม
Potassium iodide	50.0	กรัม
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	1000.0	มิลลิลิตร

เตรียมใส่ในขวดสเปรย์ หุ้มด้วยฟลอยด์ป้องกันแสง หากเกิดเป็นสีน้ำตาลแดงเมื่อทดสอบด้วย Wagner's reagent แสดงว่ามีสารในกลุ่มอัลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

3. Vanillin reagents

Vanillin	15.0	กรัม
Ethanol	250.0	มิลลิลิตร
Conc. Sulfuric acid	2.5	มิลลิลิตร

เตรียมใส่ในขวดสเปรย์ หุ้มด้วยฟลอยด์ป้องกันแสง หากเกิดสีม่วงแดงเมื่อทดสอบด้วย Vanillin ใน H_2SO_4 แสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenes และ terpenoids เป็นองค์ประกอบ

ภาคผนวก ค

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ Phase contrast

1.1 เตรียมอาหารแข็งโดยละลายวุ้นในน้ำทะเล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อให้หนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร รอให้อาหารแข็งแล้ววางสไลด์ลงบนอาหาร

1.2 เตรียมอาหารสูตร SAP2 agar medium (tryptone 0.1 กรัม, yeast extract 0.1 กรัม, agar 15.0 กรัม และ น้ำทะเล 1000.0 มิลลิลิตร) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็นลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส เททับลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร (เทให้บางที่สุดเท่าที่จะทำได้) รอให้อาหารแข็ง

1.3 ตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนี เช่นเดียวกับการ subculture นำมาวางบริเวณปลายข้างใดข้างหนึ่งของสไลด์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 2 วัน

1.4 เมื่อเชื้อเจริญให้ใช้มีดที่ปราศจากเชื้อตัดบริเวณขอบสไลด์ แล้วนำสไลด์มาปิดด้วย coverslip ตรงบริเวณขอบของ swarm colony นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ Phase contrast เพื่อดูลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์

ภาคผนวก ง

ผลการทดลอง

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบทั้งหมด 303 ตัวอย่าง
ต่อแบคทีเรียที่เรียทดสอบ

Table 14. Antibacterial activities of 303 crude extracts against bacterial

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
6 GB RL	0.0513	+		+	+	+
6 GB CY	0.1142		+	+	+	+
6 GB VY	0.0117		+	+	+	+
23 GB CY	0.1079	+	+	+	+	+
23 GB VY	0.0119					
37 GB RL	0.0354				+	
37 GB CY	0.0755			+	+	
37 GB VY	0.0093				+	+
46 GB CY	0.1038			+	+	
46 GB VY	0.0130			+		
52 GB RL	0.0151			+	+	+
52 GB CY	0.0990	+		+		+
52 GB VY	0.0089	+	+	+		+
58 GB RL	0.0441				+	
58 GB CY	0.0680			+		+
58 GB VY	0.0182			+	+	
64 GB RL	0.0323			+	+	+
64 GB CY	0.0879				+	
64 GB VY	0.0136		+		+	+

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
66 GB RL	0.0498			+	+	
66 GB CY	0.0846	+				+
66 GB VY	0.0008				+	
70 GB RL	0.0389					
70 GB CY	0.1051					
70 GB VY	0.0130		+		+	+
82 GB CY	0.0973			+	+	+
82 GB VY	0.0503			+		
83 GB RL	0.0226		+		+	
83 GB CY	0.0855		+		+	
83 GB VY	0.0827		+	+	+	
89 GB RL	0.0229	+				+
89 GB CY	0.0780	+	+	+	+	
89 GB VY	0.0523					
96 GB RL	0.0181	+		+	+	+
96 GB CY	0.0973			+		+
96 GB VY	0.0420		+		+	+
106 GB RL	0.0165				+	
106 GB CY	0.1004			+	+	
106 GB VY	0.0492					
108 GB RL	0.0207				+	+
108 GB CY	0.0953		+		+	+
108 GB VY	0.0483		+		+	
GB 086 RL	0.1050		+		+	+

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
GB 086 SK	0.0888	+	+	+	+	+
GB 086 CY	0.4139	+	+	+	+	
GB 086 VY	0.1324		+	+	+	
GB 088 RL	0.0690					
GB 088 SK	0.0421			+	+	
GB 088 CY	0.1565	+	+	+	+	
GB 088 VY	0.0629			+	+	
GB 089 RL	0.0749					
GB 089 SK	0.0538					
GB 089 CY	0.1456					
GB 089 VY	0.0551					
GB 090 RL	0.0703	+			+	+
GB 090 SK	0.0731	+			+	+
GB 090 CY	0.1417					+
GB 090 VY	0.0473		+	+		+
GB 091 RL	0.0736		+			+
GB 091 SK	0.0518	+	+	+	+	+
GB 091 CY	0.1281					+
GB 091 VY	0.1820		+	+	+	+
GB 092 RL	0.0863					
GB 092 SK	0.0669					
GB 092 CY	0.1674					
GB 092 VY	0.0673					
GB 093 RL	0.0818	+	+		+	+

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
GB 093 SK	0.0565	+	+			+
GB 093 CY	0.1356				+	+
GB 093 VY	0.0504			+		+
GB 097 RL	0.0749	+	+	+	+	
GB 097 SK	0.0606	+		+	+	+
GB 097 CY	0.1318	+	+	+	+	
GB 097 VY	0.0521	+		+	+	
GB 098 RL	0.0714					
GB 098 SK	0.0592				+	+
GB 098 CY	0.1332		+		+	+
GB 098 VY	0.0579	+	+	+	+	+
GB 099 RL	0.0795	+	+	+	+	+
GB 099 SK	0.0898					+
GB 099 CY	0.0748	+		+	+	+
GB 099 VY	0.0565	+		+	+	+
GB 100 RL	0.0499					
GB 100 SK	0.0432					
GB 100 CY	0.1320					
GB 100 VY	0.0389					
GB 102 RL	0.0765			+	+	
GB 102 SK	0.0784	+	+	+	+	+
GB 102 CY	0.1645	+	+	+		+
GB 102 VY	0.0425				+	
GB 103 RL	0.0810			+		

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
GB 103 SK	0.0698	+	+	+	+	+
GB 103 CY	0.1749	+	+	+	+	+
GB 103 VY	0.0487			+	+	+
GB 104 RL	0.0738					
GB 104 SK	0.0620					
GB 104 CY	0.0356					
GB 104 VY	0.0590					
GB 105 RL	0.0458	+	+		+	+
GB 105 SK	0.0503	+	+		+	+
GB 105 CY	0.1411	+	+			+
GB 105 VY	0.0353	+	+	+	+	+
GB 108 RL	0.0618			+	+	
GB 108 SK	0.0870				+	
GB 108 CY	0.1479			+		
GB 108 VY	0.0665			+	+	
GB 110 RL	0.0668	+	+	+	+	+
GB 110 SK	0.0505	+	+		+	+
GB 110 CY	0.1512	+	+		+	+
GB 110 VY	0.0191	+	+	+	+	+
GB 111 RL	0.1063				+	+
GB 111 SK	0.0692			+		+
GB 111 CY	0.1092	+	+	+	+	+
GB 111 VY	0.0269			+	+	+
GB 121 RL	0.0620	+	+		+	+

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
GB 121 SK	0.0575					+
GB 121 CY	0.1352	+	+		+	
GB 121 VY	0.0430	+	+	+	+	+
GB 122 RL	0.0922			+		
GB 122 SK	0.0746			+	+	
GB 122 CY	0.1508			+		
GB 122 VY	0.1044			+		
GB 123 RL	0.0697			+	+	+
GB 123 SK	0.0528	+			+	
GB 123 CY	0.1182		+			
GB 123 VY	0.0528	+	+	+	+	
4.20.2 RL	0.0568			+	+	
4.20.2 SK	0.0974		+	+	+	
4.20.2 CY	0.1357	+		+	+	
4.20.2 VY	0.0482		+	+	+	+
14.3.3 RL	0.0570	+		+	+	
14.3.3 SK	0.0466			+	+	
14.3.3 CY	0.0908	+	+	+		
14.3.3 VY	0.0475		+		+	
6.24.1 RL	0.0881					
6.24.1 SK	0.0450	+		+	+	
6.24.1 CY	0.1453	+	+			
6.24.1 VY	0.0298	+	+	+	+	
3.6.1 RL	0.0598	+			+	+

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
3.6.1 SK	0.0315			+	+	
3.6.1 CY	0.0922	+		+	+	+
3.6.1 VY	0.0136		+	+	+	+
4.1 RL	0.0716	+		+	+	
4.1 SK	0.3022	+	+	+	+	+
4.1 CY	0.0337				+	
4.1 VY	0.0484		+	+	+	+
9.43.1 RL	0.0211			+		
9.43.1 SK	0.0613				+	
9.43.1 CY	0.0916			+	+	
9.43.1 VY	0.0509			+		
9.47.1 RL	0.0912		+	+	+	
9.47.1 SK	0.0343	+		+	+	+
9.47.1 CY	0.0986	+	+	+	+	+
9.47.1 VY	0.0437		+	+	+	+
4.7.1 RL	0.0794	+	+	+	+	+
4.7.1 SK	0.0348		+		+	+
4.7.1 CY	0.1785		+		+	+
4.7.1 VY	0.0204	+	+	+	+	+
1.3.1 RL	0.0566		+	+		
1.3.1 SK	0.0293	+	+		+	+
1.3.1 CY	0.0829	+		+	+	
1.3.1 VY	0.0248		+	+	+	
14.4.2 RL	0.0546				+	

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
14.4.2 SK	0.0392				+	
14.4.2 CY	0.1047				+	+
14.4.2 VY	0.0158		+	+	+	
4.12.2 RL	0.0559	+		+		
4.12.2 SK	0.0509	+		+	+	
4.12.2 CY	0.0956	+		+	+	
4.12.2 VY	0.0393		+	+	+	+
5 RL	0.0680	+		+	+	
5 SK	0.0551	+		+	+	
5 CY	0.1074			+	+	+
5 VY	0.0351			+	+	+
4.11.4 RL	0.0752		+		+	+
4.11.4 SK	0.0426	+	+	+	+	+
4.11.4 CY	0.1476		+	+		+
5.13.2 RL	0.0619			+	+	
5.13.2 SK	0.0528				+	+
5.13.2 CY	0.1013	+		+	+	
5.13.2 VY	0.0623			+	+	
6.19.1 RL	0.0690				+	
6.19.1 SK	0.0855			+	+	
6.19.1 CY	0.1339	+	+	+	+	+
6.19.1 VY	0.0503	+		+	+	
14.6.1 RL	0.0537	+		+	+	
14.6.1 SK	0.0282	+	+	+	+	

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
14.6.1 CY	0.0849	+	+	+	+	
14.6.1 VY	0.0168	+	+	+	+	+
14.6.2 RL	0.0313	+		+	+	
14.6.2 SK	0.0432	+		+	+	
14.6.2 CY	0.1072	+		+	+	+
14.6.2 VY	0.0380				+	
6.14.3 RL	0.0685		+			
6.14.3 SK	0.0527	+	+	+		
6.14.3 CY	0.0866		+	+	+	
6.14.3 VY	0.0230					
11.3.4 SA RL	0.0434				+	+
11.3.4 SA CY	0.1155			+	+	+
11.3.4 SA VY	0.0170				+	
24 SA RL	0.0509				+	+
24 SA CY	0.1191				+	+
24 SA VY	0.0213					
28.5 SA RL	0.0468				+	+
28.5 SA CY	0.1148				+	
28.5 SA VY	0.0253				+	
35 SA RL	0.0300			+	+	
35 SA CY	0.0886			+		
35 SA VY	0.0185					+
51 SA RL	0.0432					
51 SA CY	0.1276				+	+

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
51 SA VY	0.0228				+	
59 SA RL	0.0506				+	
59 SA CY	0.1312				+	
59 SA VY	0.0231					
71 SA RL	0.0459					
71 SA CY	0.1319				+	+
71 SA VY	0.0229			+		
KK 1-3 RL	0.0248				+	+
KK 1-3 SK	0.0211				+	+
KK 1-3 CY	0.1126	+		+	+	+
KK 1-3 VY	0.0123		+	+		+
KK 1-19-2 RL	0.0461		+		+	
KK 1-19-2 SK	0.0250				+	
KK 1-19-2 CY	0.0901					
KK 1-19-2 VY	0.0135		+	+		
KK 1-21-1 RL	0.0415					
KK 1-21-1 SK	0.0224		+		+	
KK 1-21-1 CY	0.0828			+	+	+
KK 1-21-1 VY	0.0105	+	+	+	+	+
KK 1-21-2 RL	0.0412				+	
KK 1-21-2 SK	0.0205					
KK 1-21-2 CY	0.1020					
KK 1-21-2 VY	0.0133		+	+	+	
KK 1-21-3 RL	0.0373				+	+

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
KK 1-21-3 SK	0.0194				+	+
KK 1-21-3 CY	0.1015	+		+	+	+
KK 1-21-3 VY	0.0153				+	+
KK 1-26 RL	0.0414		+			+
KK 1-26 SK	0.0218		+			
KK 1-26 CY	0.1013		+			+
KK 1-26 VY	0.0248			+		
KK 1-42-3 RL	0.0484		+	+	+	
KK 1-42-3 SK	0.0161				+	
KK 1-42-3 CY	0.0966			+	+	
KK 1-42-3 VY	0.0110		+	+		+
KK 1-42-4 RL	0.0425	+		+	+	+
KK 1-42-4 SK	0.0216	+		+		+
KK 1-42-4 CY	0.1027	+		+	+	+
KK 1-42-4 VY	0.0147			+		
KK 2-1 RL	0.0353			+		
KK 2-1 SK	0.0184	+		+		+
KK 2-1 CY	0.0931			+	+	+
KK 2-1 VY	0.0163		+	+		
KK 2-4 RL	0.0433					
KK 2-4 SK	0.0213				+	
KK 2-4 CY	0.1138		+			
KK 2-4 VY	0.0159			+	+	
KK 3-1-1 RL	0.0399		+			

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
KK 3-1-1 SK	0.0219		+	+		
KK 3-1-1 CY	0.1088		+			+
KK 3-1-1 VY	0.0155		+	+		+
KK 3-12 RL	0.0370			+	+	+
KK 3-12 SK	0.0257				+	
KK 3-12 CY	0.1022			+	+	+
KK 3-12 VY	0.0132			+	+	+
TISTR1691RL	0.0361	+		+	+	+
TISTR1691SK	0.0372					
TISTR1691CY	0.0646	+		+	+	+
TISTR1691VY	0.0148				+	
TISTR1699RL	0.0366			+		
TISTR1699SK	0.0255	+	+	+	+	+
TISTR1699CY	0.0678	+		+	+	+
TISTR1699VY	0.0144				+	
TISTR1710RL	0.0378	+	+	+	+	+
TISTR1710SK	0.0237	+	+	+	+	
TISTR1710CY	0.0844			+		
TISTR1710VY	0.0132			+	+	+
TISTR1711RL	0.0345					
TISTR1711SK	0.0142			+	+	
TISTR1711CY	0.0398			+	+	
TISTR1711VY	0.0084			+	+	
TISTR1712 RL	0.0569				+	

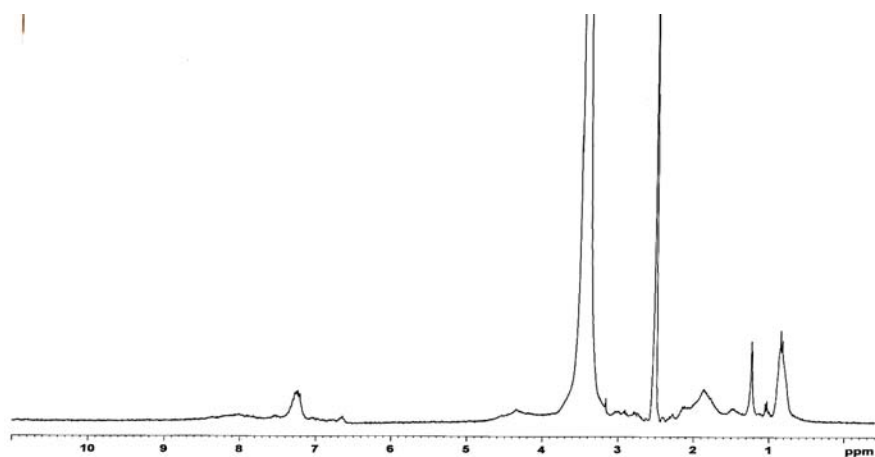
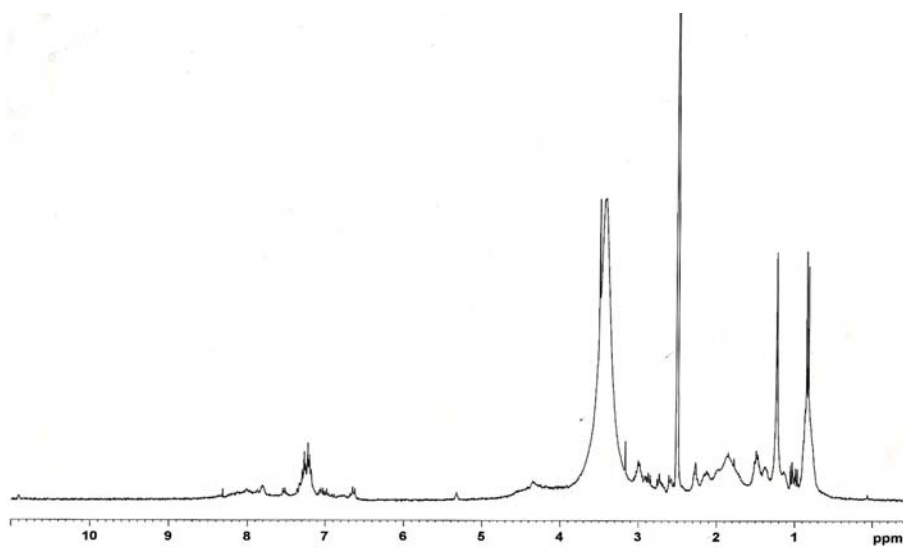
ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

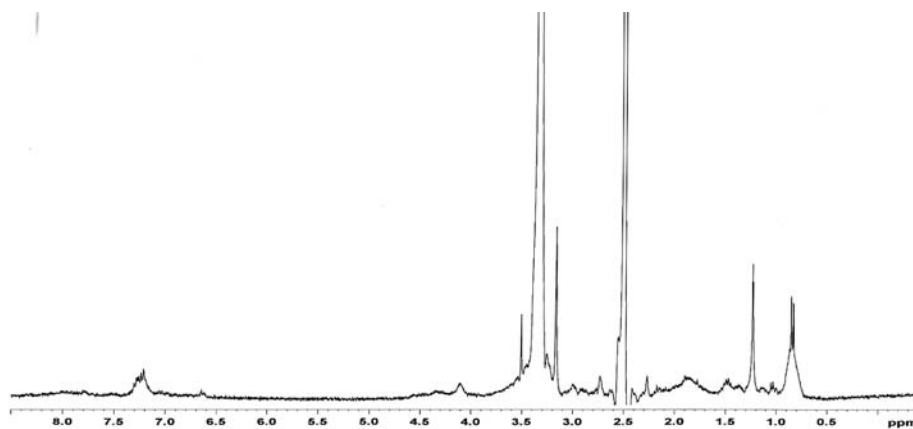
Crude Extracts Code	Weight (g)	Antibacterial Activities				
		MRSA	VRE	<i>B. subtilis</i>	<i>Sal. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>
TISTR1712SK	0.0324	+		+	+	+
TISTR1712CY	0.0587	+	+	+	+	
TISTR1712VY	0.0157			+	+	
TISTR1714 RL	0.0367			+	+	
TISTR1714SK	0.0202			+		
TISTR1714CY	0.0521	+			+	
TISTR1714VY	0.0149	+		+	+	+
TISTR1718 RL	0.0408				+	
TISTR1718 SK	0.0271					
TISTR1718CY	0.1269			+	+	
TISTR1718VY	0.0154			+	+	
TISTR1736RL	0.006	+	+	+	+	+
TISTR1736CY	0.1230			+	+	
TISTR1736VY	0.0175	+		+	+	
TISTR1737 RL	0.0451			+		
TISTR1737CY	0.0959	+			+	
TISTR1737VY	0.0492			+		+
TISTR1742 SK	0.0136		+			+
TISTR1742CY	0.0694	+	+	+	+	+
TISTR1742VY	0.0122	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

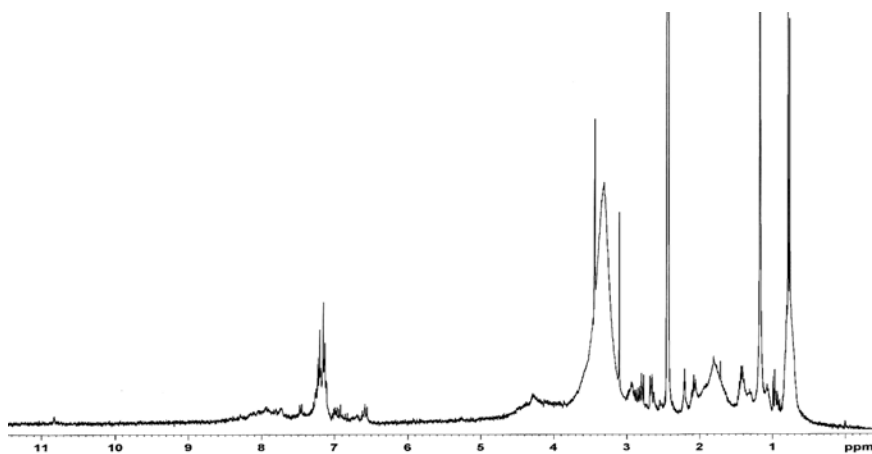
ภาคผนวก จ

สัญญาณ ^1H NMR1. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ 23GB CY2. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ 52GB CY

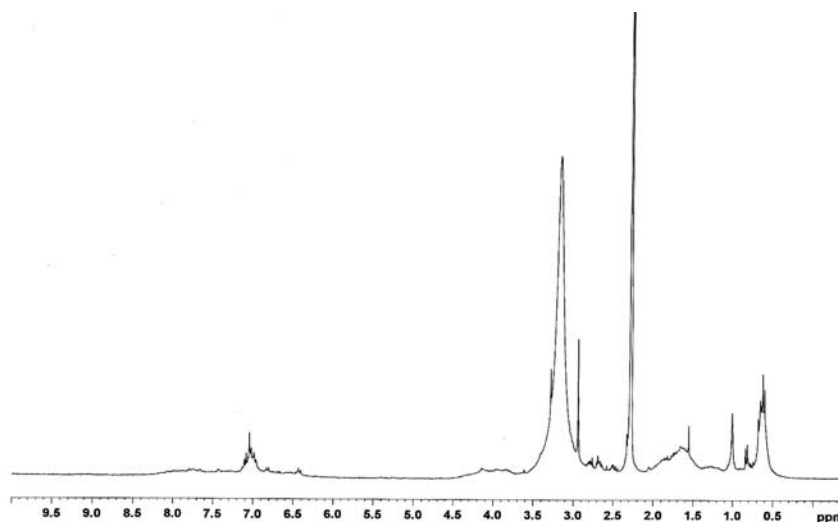
3. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ 89GB CY



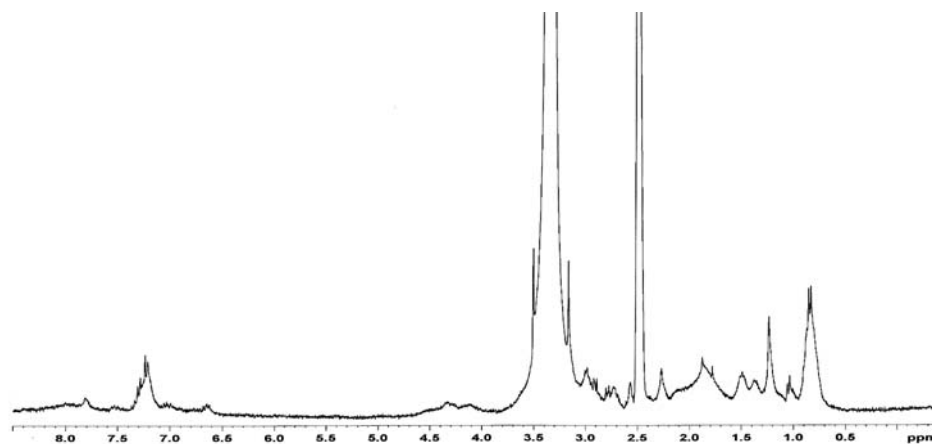
4. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ 96GB CY



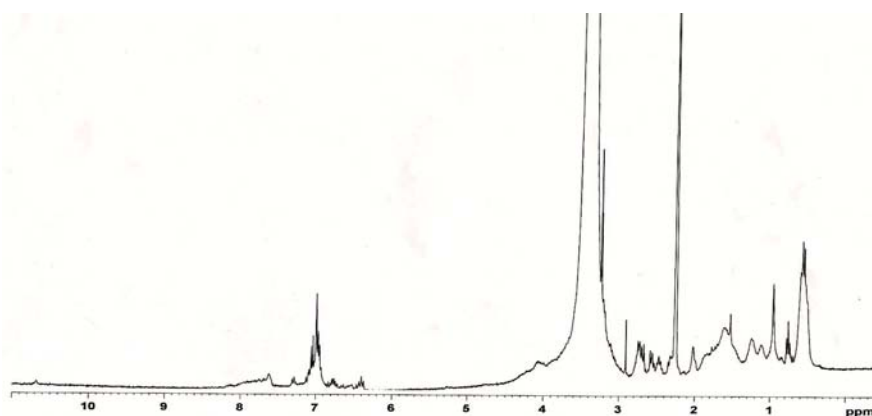
5. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ GB086 CY



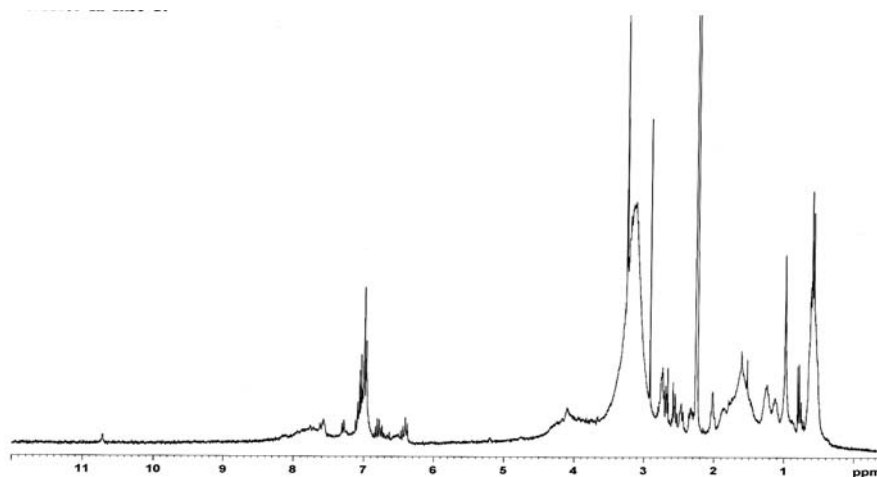
6. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ GB097 CY



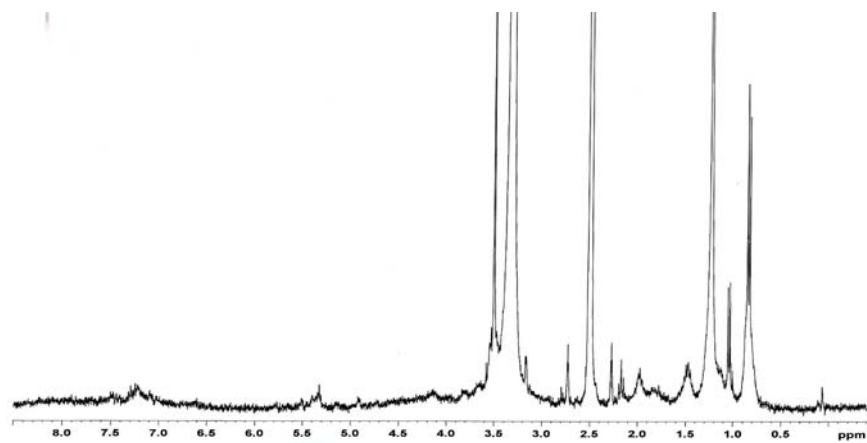
7. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ GB102 CY



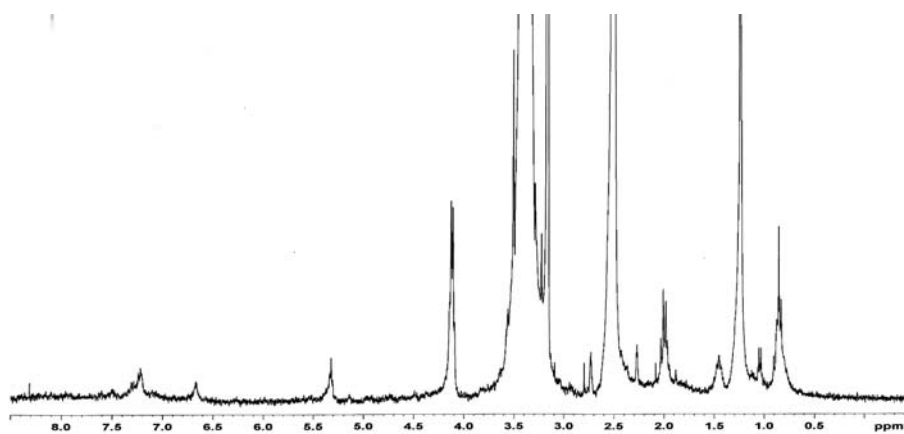
8. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ GB111 CY



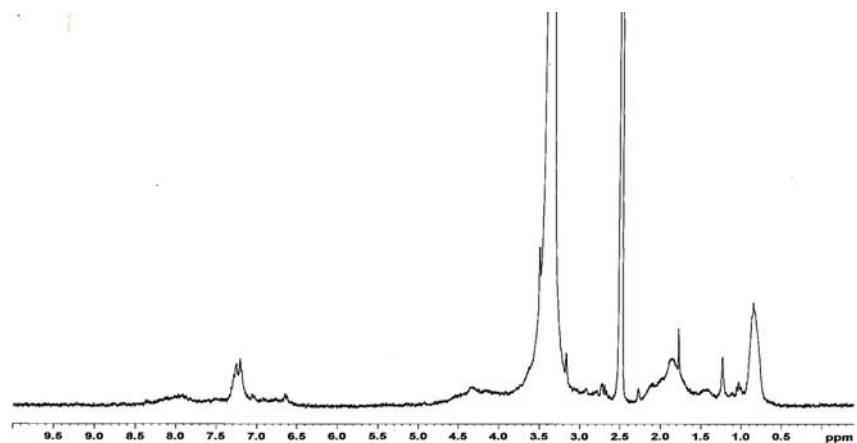
9. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ TISTR1710 SK



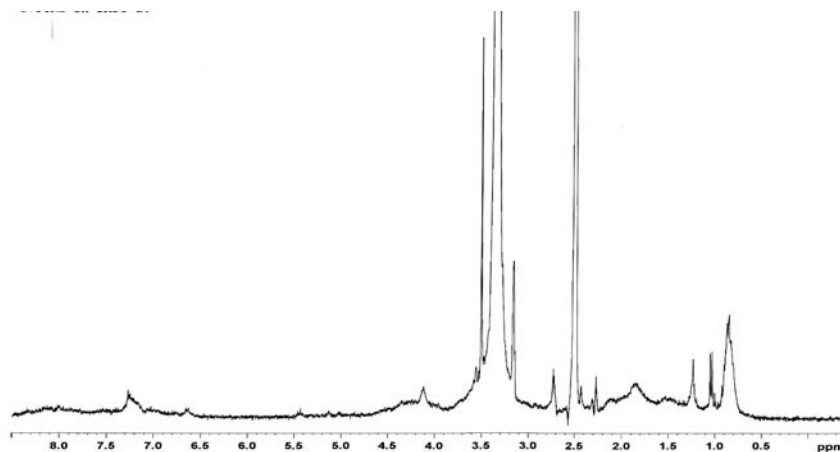
10. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ TISTR1712 SK



11. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ TISTR1712 CY



12. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ TISTR1736 RL



13. สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบ TISTR1736 VY

