



การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จาก  
สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล

**Isolation of Bacteria with Antimicrobial Activity from  
Marine Invertebrates**

อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์

**Ampornrut Prapaiwong**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Microbiology**

**Prince of Songkla University**

**2555**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล
ผู้เขียน	นางสาวอัมพรรัตน์ ประไพวงศ์
สาขา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2554

### บทคัดย่อ

แบคทีเรียทะเลที่มีความเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตอื่นในทะเลจัดเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการแยกแบคทีเรียทะเลได้ทั้งหมด 514 ไอโซเลท จากตัวอย่างกัลปังหา ปะการัง ฟองน้ำและเพรียง รวมทั้งสิ้น 26 ตัวอย่าง ใน 4 จังหวัดในฝั่งทะเลอันดามันของประเทศไทย พบแบคทีเรียที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมด 29 ไอโซเลท (5.64 %) โดยไอโซเลท P0915 มีฤทธิ์ดีที่สุด ซึ่งสารสกัด ethyl acetate จาก P0915 ทดสอบโดยวิธี broth microdilution assay สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S.aureus* ATCC 29213, *S.aureus* PSU 106, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) NPRC 001R, MRSA NPRC 002R, MRSA NPRC 003R, MRSA NPRC 004R ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Vibrio parahaemolyticus* PSU 1681 ซึ่งมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 256-512 µg/mL และมีค่า MBC อยู่ระหว่าง 512-1,024 µg/mL และยังสามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรีย *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 ได้ 93.91 % ที่ความเข้มข้นสาร 4,500 µg/mL ผลการบ่งชี้ชนิดของไอโซเลท P0915 โดยการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (16 rDNA analysis) สามารถจำแนกชนิดของไอโซเลท P0915 ได้เป็น *Pseudoalteromonas flavipulchra*

**Thesis Title** Isolation of bacteria with antimicrobial activity from marine invertebrates  
**Author** Miss Ampornrut Prapaiwong  
**Major Program** Microbiology  
**Academic** 2011

## ABSTRACT

Marine bacteria associated with marine organisms are important sources of bioactive compounds. Five hundred fourteen bacteria were isolated from 26 samples of sea fan, coral, barnacle and sponges collected from four provinces in the Andaman sea, Thailand. An agar well diffusion method was used to screen for bacteria with an antimicrobial activity. Twenty nine isolates (5.64%) exhibited antimicrobial activity against at least one tested microorganism. Isolate P0915 was the most promising strain that presented a consistently high activity against the tested microorganisms. An ethyl acetate extract from a cell suspension of P0915 inhibited the Gram-positive bacteria; *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* PSU 106, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) NPRC 001R, MRSA NPRC 002R, MRSA NPRC 003R, MRSA NPRC 004R and one Gram-negative bacterium; *Vibrio parahaemolyticus* PSU 1681. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by a broth microdilution assay and provided values of 256-512 µg/mL and 512-1,024 µg/mL, respectively. An inhibitory activity against *Microcystis aeruginosa* TISTR 8305 was discovered. A 93.91% decline in the population of *M. aeruginosa* TISTR 8305 was found when mixed with the ethyl acetate extracts at a concentration of 4,500 µg/mL. Strain P0915 was identified as being closely related to *Pseudoalteromonas flavipulchra* based on its 16S rDNA sequence analysis.

## กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยทางจุลชีววิทยาในครั้งนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือของบุคคลหลายท่าน จึงขอขอบคุณทุกท่านที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษาและให้การสนับสนุน งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.กมลธรรม อ่ำสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยแนะนำแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการทำการทดลองจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และกรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์จนมีความถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบคุณ รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร, รศ. ดร. ศุภยางค์ วรวิมลคุณชัย และ ศ. ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับวิธีการทดสอบ

ขอขอบคุณ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ศักดิ์อนันต์ ปลาทอง ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล อีกทั้งยังเอื้อเฟื้อเกี่ยวกับเรื่องตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะเภตรา จังหวัดสตูล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่และบุคลากรประจำภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์การทดลอง เครื่องมือและสารเคมีต่างๆ ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆทุกท่านในทุกห้องปฏิบัติการที่คอยให้คำแนะนำ ช่วยเหลือดูแลและเป็นกำลังใจให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณแม่ พี่น้องทุกคน ที่คอยให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ด้วยดีเสมอมาและสุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กันตลอดมา

อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์

## สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(9)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	17
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	17
ขอบเขตการวิจัย	17
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	18
3. ผลการทดลอง	31
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	55
5. สรุปผลการทดลอง ปัญหาและข้อเสนอแนะ	61
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	76
ประวัติผู้เขียน	99

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ชนิดและลักษณะของกัลปังหาที่พบในประเทศไทย	4
2. ตัวอย่างฟองน้ำที่พบในประเทศไทย	6
3. ตัวอย่างชนิดของปะการัง	8
4. การจัดกลุ่มแบคทีเรียทะเล	11
5. ตัวอย่าง และ สถานที่เก็บตัวอย่าง	18
6. ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียทะเลที่แยกได้โดยวิธี agar well diffusion	33
7. แหล่งที่มาของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ	35
8. ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell suspension จากการบ่มที่ระยะเวลาต่างๆ	38
9. ประสิทธิภาพของการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell suspension, P0915 cell free supernatant และ P0915 cell free supernatant เข้มข้น	40
10. ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของ P0915 cell suspension โดยวิธี agar well diffusion	42
11. ประสิทธิภาพของสารสกัด ethyl acetate ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 culture	43
12. ค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดจาก cell suspension ของไอโซเลท P0915 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ	44
13. การยับยั้งราก่อโรคในพืชของ P0915 cell suspension โดยวิธี agar well diffusion	46

## รายการตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
14. การยับยั้ง <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8305 ของไอโซเลท P0915 ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังเลี้ยงร่วมกันที่ 30°C เป็นเวลา 3 วัน	48
15. การทดสอบสารสกัด ethyl acetate ของ cell suspension ของไอโซเลท P0915 ในการยับยั้ง <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8305	49
16. การทดสอบการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท P0915 ด้วย API ZYM Kit	51



## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. การทดสอบฤทธิ์ต้าน <i>S. aureus</i> PSU 106 เบื้องต้นของ P0915 cell suspension โดยวิธี agar well diffusion	32
2. การทดสอบประสิทธิภาพของ P0915 cell suspension จากการบ่มที่ระยะเวลาต่างๆ ในการยับยั้ง <i>S. aureus</i> PSU 106 โดยวิธี agar well diffusion	39
3. ลักษณะเซลล์ปกติและเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) หลังจากการเลี้ยงร่วมกับไอโซเลท P0915 ( $10^8$ CFU/mL) เป็น เวลา 3 วันและหลังการเติมสารสกัด ethyl acetate ของ cell suspension ของไอโซเลท P0915 (4,500 $\mu$ g/mL) เป็นเวลา 3 วัน	50
4. แถบทดสอบเอนไซม์ API ZYM Kit	52
5. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท P0915 บนอาหาร ASW agar และเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์	53
6. Phylogeneic Tree แสดงตำแหน่งไอโซเลท P0915 ใน genus <i>Pseudoalteromonas</i> ที่ได้ทำการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (16S rRNA analysis)	54

## สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

%	=	Percentage
µL	=	Microliter
µg	=	Microgram
CFU/mL	=	Colony forming unit per milliliter
mm	=	Millimeter
g	=	Gram
mL	=	Milliliter
°C	=	Degree Celsius
rpm	=	Revolutions per minute
MIC	=	Minimum Inhibitory Concentration
MBC	=	Minimum Biocidal Concentration
MFC	=	Minimum Fungicidal Concentration

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

ยาปฏิชีวนะมีความสำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อเป็นอย่างมาก แต่ในปัจจุบันพบปัญหาดื้อยามากยิ่งขึ้น โดยจุลินทรีย์มีกลไกต่างๆ ในการต่อต้านยาปฏิชีวนะซึ่งทำให้เกิดการดื้อยาขึ้นด้วยเหตุนี้ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการค้นหายาปฏิชีวนะใหม่ๆ เพิ่มขึ้นเพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อต่อไป โดยมุ่งความสนใจในการค้นหายาปฏิชีวนะจากสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากมหาสมุทร เนื่องจากกว่า 70% ของพื้นที่โลกเป็นมหาสมุทร ซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรที่ใหญ่และหลากหลาย เช่น บริเวณน้ำลึกที่แสงส่องไม่ถึง และแนวปะการังในเขตร้อนซึ่งมีความหลากหลายของระบบนิเวศมากที่สุด เมื่อเทียบกับระบบนิเวศของป่าฝนในเขตร้อนชื้น (Colwell, 2002) ระบบนิเวศของมหาสมุทรประกอบด้วยสารประกอบทางเคมีต่างๆ มากมายจากรายงานของ Winton (1988), Malakoff (1997) และ Pomponi (1999) ระบุว่าระบบนิเวศทางทะเลเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารเคมีหลากหลายชนิด มีรายงานการพบสารดังกล่าวเกือบ 30,000 ชนิด (ลิตา, 2551) ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารเคมีที่พบในทะเล เช่น terpenes, polyketides, acetogenins และ peptide เป็นต้น (Wright, 1998) นอกจากนี้ยังพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากปะการัง เช่น alkaloids, prostaglandins (Kelecom, 2002), nephtheoxydiol และ clavukerin C สารที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล เช่น cyclic peroxide สารที่แยกได้จากปะการังอ่อน (soft coral) เช่น valerenenol และ entoplopanone สารที่ได้จากปะการังอ่อนสายพันธุ์ *Xeria* sp. เช่น xeniolone (Kobayashi and Kitagawa, 1994) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ โดยอาจจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปจากเดิมโดยอาศัยกระบวนการทางกายภาพและชีวภาพ (Wright, 1998) เมื่อ 30-40 ปี ที่ผ่านมามีการพบสารชนิดใหม่ๆ กว่า 12,000 ชนิด ที่เกิดขึ้นจากพืชทะเล สัตว์ทะเล และจุลินทรีย์ โดยจะมีการค้นพบสารใหม่ๆ กว่า 100 ชนิด ในทุกๆ ปี (Donia and Hamann, 2003) สารส่วนใหญ่พิสูจน์ได้ว่ามาจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Lie and Zhou, 2002) อุปสรรคสำคัญในการศึกษาเรื่องนี้คือ การจัดหาวัตถุดิบเพราะ ความเข้มข้นของสารที่ได้จากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังเหล่านี้น้อยกว่า 1 ในล้านของน้ำหนักเปียก (Proksch *et al.*, 2002) หากต้องการสารเหล่านี้เป็นจำนวนมาก จำเป็นต้องใช้สัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นจำนวนมากซึ่งเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ จากการศึกษาของ Friedrich *et al.* (1999) พบว่า กว่า 40 % ของมวลชีวภาพในเนื้อเยื่อของฟองน้ำ *Aplysina aerophoba* มีแบคทีเรียอาศัยอยู่ร่วมกัน แบบ symbiotic โดยที่แบคทีเรียได้อาหารจาก *A. aerophoba* และแบคทีเรียจะ

ช่วยทำให้ *A. aerophoba* คงรูปร่าง การศึกษาที่ผ่านมาได้มีการแยกแบคทีเรียจากกัลปังหาและ ฟองน้ำที่สามารถผลิตสารที่สามารถต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เช่น ผลิตสารต้านแบคทีเรีย, สาร ต้านรา, สารต้านไวรัส หรือแม้กระทั่งตัวฟองน้ำเองก็มีการพบสารที่สามารถต้านมะเร็งได้อีกด้วย (Monks *et al.*, 2002) ดังนั้นการคัดแยกจุลินทรีย์จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลจึงเป็นอีก ทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้การศึกษาของ สิตา (2551) พบว่า กัลปังหาที่มีความไวต่อการต่อการถูกรุกรานโดยจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เช่น พวกแบคทีเรียและรา ตัวอย่างราที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด epizootic ในหมู่เกาะ West Indies และ ทะเล Caribbean คือ *Aspergillus sydowii* ซึ่งเป็นราที่อาศัยสิ่งใน้ำเปื้อย เพื่อการดำรงชีวิต พบได้ทั้ง บนบกและในทะเล

ดังนั้นการศึกษารังนี้จึงมุ่งเน้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากสัตว์ไม่มี กระดูกสันหลัง เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ต่อไป

## บทตรวจเอกสาร

กัลปังหา (ศักดิ์อนันต์และคณะ, 2548, <http://www.scitour.most.go.th>; April 20,2012)

มี ชื่อวงศ์ Paramuriceidae และ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Paramuricea* sp. กัลปังหา เป็นสัตว์ชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับปะการัง มีขนาดตัวแต่ละตัวประมาณ 1-4 มิลลิเมตร ขึ้นอยู่กับแต่ละชนิด ตัวกัลปังหาแต่ละตัว เรียกว่า polyp จะเจริญเติบโต อยู่รวมกันเป็นโคโลนี มีการติดต่อเชื่อมโยงกัน แลกเปลี่ยนอาหารซึ่งกันและกัน เคลือบอยู่บนแกนคล้ายกิ่งไม้ แกนของกัลปังหาเป็นสารประกอบโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า “กอร์โกนิน” (gorgonin) ซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายกับสารที่พบในเขาสัตว์ ซึ่งกัลปังหาสร้างขึ้นมาค้ำจุนร่างกาย มีลักษณะเป็นเส้นหรือเป็นรูปพัด ดังนั้น กัลปังหารูปพัดที่เห็นจึงประกอบไปด้วยตัวกัลปังหา นับพัน นับหมื่นตัว เคลือบอยู่ภายนอก กัลปังหามีส่วนที่ยึดเกาะกับพื้นเรียกว่า holdfast เคลือบไปบนพื้นผิว มีคุณสมบัติในการยึดเกาะบนพื้นแข็ง มีความเหนียว แข็งแรง

กัลปังหาจะพบมากบริเวณร่องน้ำลึก 10-15 เมตร อาจเป็นบริเวณโขดหินหรือหัวแหลมซึ่งมีกระแสน้ำไหลแรงเนื่องจากสามารถโอนเอนตามกระแสมาได้ มักพบกัลปังหาในที่น้ำลึกและกระแสแรง อาจเป็นเพราะกัลปังหาไม่ต้องแก่งแย่งพื้นที่กับปะการัง เนื่องจากกัลปังหาหลายชนิดไม่มีสาหร่ายซูแซนเทลลี ซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดียว ที่อาศัยอยู่รวมเหมือนกับปะการัง การที่ไม่มีสาหร่ายเซลล์เดียวอยู่รวมกันนั้นทำให้กัลปังหาไม่มีความจำเป็นต้องพึ่งพาแสงมากนัก อีกทั้งกัลปังหาเป็นสัตว์ที่กรองกินแพลงก์ตอนเป็นอาหาร โดยจะใช้เข็มพิษและหนวดที่อยู่รอบปากทั้ง 8 เส้น ซึ่งมีลักษณะคล้ายขนนก ช่วยจับเหยื่อในน้ำ ส่งเข้าไปยังส่วนของปากซึ่งอยู่ตรงกลางและต่อไปยังท่อไซโฟโนกลีฟ (siphonoglyph) ที่ทำหน้าที่เป็นคอหอยและหลอดอาหาร ผ่านไปสู่ส่วนของท้องซึ่งฝังอยู่ในเนื้อเยื่อซีแอนไคม์ (coenenchyme) ทั้งนี้ กัลปังหาจะมีท่อขนาดเล็กเชื่อมโยงกันระหว่างตัวกัลปังหาแต่ละตัว เพื่อส่งผ่านสารอาหารที่ได้จากการย่อยของแต่ละตัวนั้นไปหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อและโครงสร้างต่างๆ ตลอดทั้งโคโลนี นอกจากนี้กัลปังหายังมีโครงสร้างหินปูนขนาดเล็กจำนวนมากซึ่งเรียกว่า สเคลอไรท์ (sclerites) ประกอบกันอยู่ทั้งโคโลนีเพื่อช่วยป้องกันเนื้อเยื่อของกัลปังหาให้ปลอดภัยและสร้างความแข็งแรงให้กับโคโลนี แม้ตัวกัลปังหาจะมีขนาดเล็ก แต่สามารถดำรงชีวิตผ่านพ้นมรสุมและเจริญเติบโตขึ้นเป็นโคโลนีขนาดใหญ่ได้

กัลปังหาสามารถสืบพันธุ์ได้ 2 วิธี วิธีแรกโดยการแตกหน่อที่โคน เมื่อตัวเก่าตายตัวใหม่ก็เจริญเติบโตต่อไป วิธีที่สองเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างไข่กับอสุจิ ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะเจริญเติบโตต่อไปเป็นตัวเมีย เมื่อตัวอ่อนโตจะว่ายน้ำจากตัวแม่ไปเกาะที่โขดหิน เพื่อสร้างกัลปังหาตัวใหม่ขึ้นมาซึ่งจะมีขนาดโตขึ้นเรื่อยๆ จากการศึกษาของนักชีววิทยาทางทะเลพบว่า กัลปังหางอกได้ยาวแค่ 5-200 มิลลิเมตร ต้องใช้เวลานานนับปี ซึ่งกัลปังหาส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อพื้นที่ เช่น กัลปังหาที่พบในประเทศไทยแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและลักษณะของกัลปังหาที่พบในประเทศไทย

กัลปังหา	ลักษณะ
1. <i>Solenocaulon</i>	ความสูงประมาณ 15-40 ซม. โคลนีมีการเรียงตัวในระนาบเดียว และห่อเข้าหากันคล้ายกรวย โคลนีมีสีแดงดำในของกรวยมีสีขาว
2. <i>Melithae</i>	ความสูงตั้งแต่ 5-240 ซม. คล้ายกิ่งไม้ มีการเรียงตัวในระนาบเดียว มีปุ่มนูนกระจายตามกิ่งก้านของโคลนี ลำต้นมีสีเหลือง
3. <i>Acabaria</i>	ความสูงไม่เกิน 5 เซนติเมตร โคลนีเป็นแบบร่างแห มักปรากฏปุ่มนูนตามกิ่งก้านของโคลนี โคลนีมีสีสดใส เช่น เหลืองสด หรือแดงสลับขาว
4. <i>Muricella</i>	สูงได้มากกว่า 70 เซนติเมตร โพลีปีตหดได้ เมื่อโพลีปีตจะปรากฏเป็นปุ่มนูนบนผิวจำนวนมาก โคลนีสีขาว โพลีปีตสีแดง
5. <i>Mopsella</i>	ความสูงตั้งแต่ 5-240 เซนติเมตร การเรียงตัวของโคลนีคล้ายกิ่งไม้ มีปุ่มนูนตามกิ่งก้านของโคลนี โคลนีมีสีแดงและมีโพลีปีตเหลือง
6. <i>Echinogorgia</i>	ความสูงประมาณ 10-15 เซนติเมตร ผิวขรุขระเนื่องจากมีแท่งหินปูนเรียงตัวกันรอบโพลีปีต โคลนีมีสีแดง
7. <i>Euplexaura</i>	ความสูงประมาณ 70 เซนติเมตร แต่ละช่วงของการแตกแขนงยาวเป็นพิเศษ โพลีปีตหดได้ โคลนีสีเหลือง โพลีปีตสีขาว
8. <i>Rumphella</i>	ความสูงประมาณ 12-20 เซนติเมตร แต่ละกิ่งของโคลนีหนาและอ่อนไหว ปลายกิ่งมน โคลนีสีเทา น้ำตาลเทา หรือน้ำตาลอมเขียว
9. <i>Hicksonella</i>	ความสูงอาจจะมากกว่า 60 เซนติเมตร กิ่งหนาและแข็ง โคลนีมีการแตกกิ่งเป็นคู่ โคลนีสีเทา น้ำตาลเทา หรือน้ำตาลอมเขียว
10. <i>Junceella</i>	ความยาวตั้งแต่ 5-450 เซนติเมตร การเรียงตัวของโพลีปีตไม่เป็นระเบียบ ความหนาของเส้นจะไม่เสมอกันและอาจมีการแตกแขนง
11. <i>Ellisella</i>	ความสูงประมาณ 60 เซนติเมตร โคลนีมีการแตกกิ่งเป็นคู่ กิ่งแขนงจะยาวมาก โพลีปีตหดได้ ผิวมีตุ่มเล็กๆ กระจายทั่ว โคลนีมีสีสดใส เช่น แดง ส้ม น้ำตาลแดง
12. <i>Ctenocella</i>	ความสูงตั้งแต่ 5-120 เซนติเมตร การเรียงตัวของโคลนีมีลักษณะเป็นซี่คล้ายหวี โคลนีมีหลายสี เช่น เหลือง ขาว น้ำตาลอ่อน เป็นต้น
13. <i>Subergorgia</i>	ความสูงตั้งแต่ 25-450 เซนติเมตร การเรียงตัวของโคลนีคล้ายพัด มีลักษณะสานกันคล้ายร่างแห สังเกตได้ง่ายจากขนาดอันใหญ่โต มีการเรียงตัวในระนาบเดียว โคลนีมีสีเหลือง

ที่มา: <http://www.TalayThai.com>; January 7, 2009

## ฟองน้ำ

ฟองน้ำเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ใน Phylum Porifera แปลว่า ผู้มีลำตัวเป็นรูพรุน ฟองน้ำเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโบราณที่มีโครงสร้างร่างกายแบบง่าย ๆ เนื่องจากการเรียงตัวของเซลล์แบบหลวม ๆ และไม่มีลักษณะของเนื้อเยื่อที่แท้จริง เซลล์ของฟองน้ำมีลักษณะพิเศษที่ไม่พบในสัตว์ชนิดอื่นคือ ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์จากหน้าที่หนึ่งไปเป็นหน้าที่อีกอย่างหนึ่งได้ (Totipotency) ลำตัวเป็นรูพรุนและมีท่อน้ำกระจายอยู่ทั่วตัว โดยมีระบบท่อน้ำ (Water canal system) ที่ประกอบด้วยท่อน้ำเล็กๆ ตามลำตัวเป็นท่อน้ำเข้า (Ostium) ผนังลำตัวประกอบด้วยเนื้อเยื่อสองชั้น เนื้อเยื่อชั้นนอกเป็นเซลล์รูปร่างแบนเรียงกันคล้ายแผ่นกระเบื้อง ประกอบด้วยเซลล์ที่เป็นปลอก มีเส้นเซลล์ช่วยโอบกักให้น้ำเคลื่อนผ่านลำตัว เรียกเซลล์เหล่านี้ว่าเซลล์ปลอกคอ (Choanocyte) เซลล์พิเศษเหล่านี้ทำหน้าที่จับอาหารและออกซิเจนไว้หายใจ ส่วนน้ำที่ผ่านการกรองแล้วจะไหลออกมาทางท่อน้ำออก (Osculum) ซึ่งส่วนมากมีขนาดใหญ่ท่อเดี่ยว โครงสร้างของร่างกาย (Skeleton) ประกอบด้วยหนามฟองน้ำ (Spicules) และหรือเส้นใยฟองน้ำ (Spongin fibers) มีโครงสร้างค้ำจุนระหว่างเนื้อเยื่อชั้นนอกกับชั้นใน คือ อยู่ในชั้นมีเซนไคม์ เรียกว่า ขวาก (spicule) ทำให้ฟองน้ำคงรูปร่างอยู่ได้ ขวากสามารถแบ่งตามสารที่เป็นส่วนประกอบได้ 3 ชนิด คือ ขวากหินปูน (Calcareous spicule) เป็นขวากที่ประกอบด้วยหินปูน พบในฟองน้ำหินปูน, ขวากแก้ว (Siliceous spicule) เป็นขวากที่ประกอบด้วยซิลิกา, สปองจิน (Spongin) ไม่ใช่ขวากแต่เป็นเส้นใยที่ประกอบด้วยสาร สเกลอโรโปรตีน (Scleroprotein)

ฟองน้ำจัดจำแนกตามลักษณะของขวากออกได้ 4 Classes ดังนี้

1. Class Calcarea เป็นฟองน้ำที่มีขวากเป็นหินปูนมีรูปร่างรูปเข็มหรือมี 3 แฉก หรือ 4 แฉก ลักษณะแข็งเปราะ เรียกฟองน้ำพวกนี้ว่า ฟองน้ำหินปูน (Calcareous sponges) ได้แก่ ฟองน้ำแจกันสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp.
2. Class Hexactinellida เป็นฟองน้ำที่มีขวากเป็นรูป 6 แฉก เป็นสารประกอบพวกซิลิกา สานกันเป็นตาข่ายเรียกฟองน้ำนี้ว่า ฟองน้ำแก้ว (Glass sponges) มีรูปร่างคล้ายแจกัน หรือถ้วยมีลักษณะสวยงาม เป็นฟองน้ำที่อาศัยอยู่ในทะเลบริเวณน้ำลึก ได้แก่ กระเช้าดอกไม้ของวีนิส (Venus's flower basket, *Euplectella*)
3. Class Demospongiae เป็นฟองน้ำที่มีลักษณะอ่อนนุ่มเนื่องจากเป็นเส้นใยที่มีสารประกอบพวกสเกลอโรโปรตีน หรือบางชนิดอาจมีขวากเป็น ซิลิกาผสมโยโปรตีน ไม่มีหินปูนเป็นส่วนประกอบ ฟองน้ำพวกนี้อาศัยอยู่ในทะเล มีสีสันต่าง ๆ ได้แก่ ฟองน้ำตุ้ต (Spongia) ฟองน้ำดอกเห็ด (Pterion) และฟองน้ำจี๊ด (Spongilla)
4. Class Sclerospongiae เป็นฟองน้ำที่พบอาศัยอยู่ตามรอยแตกของปะการัง จึงเรียกฟองน้ำ

ปะการัง ลักษณะทั่วไปจะคล้ายฟองน้ำในชั้นเดโมสปอนเจีย (Class Demospongiae) แต่ ฟองน้ำในชั้นนี้ จะมีโครงสร้างเป็นหินปูนบาง ๆ หุ้มอยู่ภายนอก มีขวากเป็นซิลิกา และเส้นใย โปรตีน เป็นฟองน้ำที่พบน้อยมาก ได้แก่ Calcifibrospongiae ฟองน้ำเป็นสัตว์เกาะติดอยู่กับที่ตามพื้นทะเล (Sessile animals) สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบ อาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ บางชนิดมีการเลี้ยงตัวอ่อนไว้ในระบบท่อของน้ำของตัวเอง ตัวอย่าง ฟองน้ำที่พบในประเทศไทย ดังแสดงในตารางที่ 2 (<http://www.lib.kmutt.ac.th>; March 3, 2010)

### ตารางที่ 2 ตัวอย่างฟองน้ำที่พบในประเทศไทย

Species	ชื่อสามัญ
<i>Xestospongia</i> sp.	ฟองน้ำเคลือบแข็งสีม่วง
<i>Gelliodes petrosioides</i>	ฟองน้ำเคลือบแข็งสีฟ้า
<i>Petrosia</i> sp.	ฟองน้ำเคลือบสีม่วง
<i>Xestospongia</i> sp. หรือ <i>Petrosia</i> sp.	ฟองน้ำครกแขนง
<i>Coelocarteria singaporensis</i>	ฟองน้ำกระชาย
<i>Haliclona</i> (Halichoelona) sp.	ฟองน้ำคลานสีส้ม
<i>Paratetilla bacca</i> (Selenka)	ฟองน้ำลูกกอล์ฟ
<i>Chondrilla nucula</i> (Schmidt)	ฟองน้ำหนังสีดำ
<i>Clathria</i> (Thalysias) sp.	ฟองน้ำเคลือบสีส้ม
<i>Iotrochota purpurea</i> (Bowerbank)	ฟองน้ำเคลือบสีเหลืองดำ
<i>Iotrochota baculifera</i> Ridley	ฟองน้ำสีดำเมือกม่วง
<i>Hyrtios gumminea</i> (Ridley)	ฟองน้ำยืดหยุ่นสีดำ
<i>Oceanapia sagittaria</i> (Sollas)	ฟองน้ำท่อพุ่มสีแดง

ที่มา: [http://www.smcrc.go.th/kokra\\_spong.html](http://www.smcrc.go.th/kokra_spong.html); January 7, 2009

(สุเมตต์ ปรุงฉากร, 2547)



## ปะการัง

ปะการัง เป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเล จัดอยู่ในชั้นแอนโรซัวและจัดเป็นพวกดอกไม้ทะเล ปะการังแต่ละตัวมีขนาดเล็กเรียกว่าโพลิฟ แต่จะอาศัยรวมกันอยู่เป็นโคโลนีที่ประกอบไปด้วยโพลิฟเดี่ยวๆจำนวนมาก ปกติแล้วโพลิฟจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่กี่มิลลิเมตร ด้านนอกเป็นชั้นผนังอีพิเธลเลียม ส่วนด้านในเป็นเนื้อเยื่อคล้ายวุ้นที่รู้จักกันว่าเมโซกลี โพลิฟมีสมมาตรรัศมีและมีหนวดโดยรอบช่องปากที่อยู่ตรงกลางที่เปิดต่อเนื่องไปที่กระเพาะอาหารหรือซีเลเนเทอร์อนไปยังที่อาหารถูกย่อยและปล่อยของเสีย หนวดทั้งหลายของโพลิฟจะทำการจับเหยื่อโดยใช้เซลล์ที่ทำให้เกิดอาการระคายเคืองแสบร้อนที่เรียกว่าเข็มพิษ มีเซลล์หลายชนิดที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อการจับเหยื่อและทำให้เหยื่อสลบ การเกิดโครงสร้างแข็งเนื้อปูนด้านนอกเกิดจากการสะสมตัวของแร่ระธาโกไนต์ โดยโพลิฟทำหน้าที่จับไอออนของแคลเซียมจากน้ำทะเลให้ทำปฏิกิริยากับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากสาหร่าย อัตราการตกสะสมของแร่ระธาโกไนต์ มีความแปรผันอย่างมากในระหว่างชนิดพันธุ์และสภาพสิ่งแวดล้อมรอบข้างที่อาจจะมากถึง 10 กรัม/ตารางเมตรของโพลิฟ/วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแสงสว่าง กล่าวคือในช่วงกลางคืนจะผลิตได้เพียงประมาณร้อยละ 90 ต่ำกว่าการผลิตในช่วงกลางวัน

### ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของปะการัง

ส่วนใหญ่แล้วปะการังจะสืบพันธุ์แบบใช้เพศ โดยประมาณแล้วร้อยละ 25 จะเป็นปะการังที่สร้างแนวปะการังที่โคโลนีหนึ่งๆจะประกอบไปด้วยเพศเดี่ยว ส่วนที่เหลือจะเป็นโคโลนีชนิดที่มีสองเพศ ประมาณร้อยละ 75 ของปะการังชนิดที่สร้างแนวปะการังที่ตัวอ่อนเกิดจากการปฏิสนธิภายนอกโคโลนีแม่ โดยการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (ไข่และสเปิร์ม) ออกไปสู่มวลน้ำทะเลแพร่กระจายไปได้ระยะทางไกลๆ เมื่อเซลล์สืบพันธุ์หลอมรวมกันในระหว่างการปฏิสนธิ

### ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของปะการัง เช่น

**การแตกหน่อ** ทำให้โคโลนีของปะการังมีการเพิ่มขนาดขึ้น การเพิ่มขนาดของโคโลนีจะเกิดขึ้นเมื่อมีคอร์อลไลต์ตัวใหม่ตัวหนึ่งเติบโตมาจากโพลิฟตัวเดิมด้วย

**การแบ่งตัวตามความยาว** จะเริ่มต้นด้วยการขยายขนาดของโพลิฟแล้วตามด้วยการแบ่งตัวของกระเพาะ ปากจะแบ่งตัวออกแล้วเกิดเป็นหนวดชุดใหม่ จากนั้นโพลิฟแต่ละตัวทั้งสองจะสร้างส่วนของลำตัวและโครงสร้างภายนอกที่ขาดหายไปให้เป็นโพลิฟที่สมบูรณ์

**การแบ่งตัวในแนวขวาง** เกิดขึ้นเมื่อโพลิฟและโครงสร้างภายนอกเกิดการแบ่งตัวเองในแนวขวางออกเป็นสองส่วน หมายความว่าส่วนหนึ่งจะมีส่วนแผ่นฐานรองด้านล่างและอีกส่วนหนึ่งเป็นแผ่นช่องปากด้านบน โพลิฟใหม่ทั้งสองนี้ก็จะสร้างส่วนที่ขาดหายไปให้เป็นโพลิฟใหม่ที่สมบูรณ์

**การแตกตัว** เกิดขึ้นในปะการังบางชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งปะการังในวงศ์ฟังจิอิดี ที่โคโลนีสามารถแตกออกเป็นสองส่วนหรือมากกว่าในช่วงแรกๆของพัฒนาการ

**การหนีออกของโพลีฟ** เกิดขึ้นจากโพลีฟหนึ่ง ๆ ทิ้งโคลนของตัวเองแล้วไปสร้างถิ่นฐานใหม่แล้วพัฒนาการไปเป็นโคลนรุ่นใหม่

**การแตกออก** จริงๆ แล้วถือเป็นชนิดหนึ่งของการแตกตัว เกิดขึ้นจากโคลนหนึ่งแตกหักระหว่างการเกิดพายุหรือเหตุการณ์อื่น ๆ ที่ทำให้ โคลนเกิดการแตกหัก ส่วนที่แตกหักออกมาแต่ละชิ้นสามารถเจริญเติบโตพัฒนาเป็นโคลนรุ่นใหม่ได้ ([http://th.wikipedia.org/wiki:January 7, 2009](http://th.wikipedia.org/wiki:January_7,_2009))

### ตารางที่ 3 ตัวอย่างชนิดของปะการัง แบ่งตามลักษณะภายนอกได้ดังนี้

ปะการัง	ลักษณะภายนอก
1. ปะการังเขากวาง	มีลักษณะคล้ายเขากวาง บริเวณกิ่งจะมีตุ่มอยู่โดยรอบ ตุ่มเหล่านี้คือที่อยู่ของตัวปะการัง
2. ปะการังแบบแผ่นแบนราบ	มีลักษณะคล้ายโต๊ะบางครั้งอาจซ้อนกันเป็นชั้น
3. ปะการังแบบหุ้มห่อ	มีลักษณะแผ่ขยายหุ้มฐานพื้นที่ปะการังติดอยู่
4. ปะการังแบบเป็นก้อน	มีลักษณะเป็นก้อนคล้ายก้อนหิน
5. ปะการังแบบกิ่งก้อน	มีลักษณะการรวมกันเป็นกระจุกค่อนข้างแน่น แต่ไม่ติดเป็นก้อนเดียวกัน
6. ปะการังแบบเป็นแผ่น	มีลักษณะซ้อน ๆ กันเป็นกระจุก คล้ายใบไม้หรือผัก
7. ปะการังแบบเห็ด	มีลักษณะการแผ่ออกคล้ายดอกเห็ด
8. ปะการังสีน้ำเงิน	มีสีน้ำเงินอยู่ในเนื้อของหินปูน

ที่มา: <http://www.dnp.go.th/npo/html/Research/Coralreef/Coralreef.html>; January 7, 2009

จากการที่กัลปังหา ฟองน้ำ ปะการัง สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมในทะเลซึ่งมีความหลากหลายและมีสภาวะการแข่งขันที่สูง แสดงว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ น่าจะมีกลไกในการ

ต่อสู้เพื่อการอยู่รอด จึงเป็นที่มาของความสนใจจุลินทรีย์ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกัลปังหา ฟองน้ำ และปะการัง (Friedrich *et al.*, 1999)

### เพรียง

เพรียง (barnacle) เป็นสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังประเภทสัตว์ขาปล้อง มีหลายชนิด ในอันดับ Thoracica เปลือกหุ้มตัวมีหกลแฉกเรียงซ้อนกัน รูปร่างของเปลือกมีหลายแบบ เช่น รูปกรวยคว่ำ มีปากเปิดด้านบน เปลือกบริเวณปากบางและคม เกาะอยู่ตามหินและวัสดุอื่น ๆ ที่น้ำท่วมถึง เช่น *Balanus amphitrite* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ฐานประมาณหนึ่งเซนติเมตร เพรียงส่วนใหญ่ประมาณ 75% จะอาศัยอยู่ในน้ำตื้น ส่วนประมาณอีก 25% จะเป็นเพรียงน้ำลึก ซึ่งเพรียงบางชนิดสามารถอยู่ในน้ำที่ลึกถึง 600 เมตร ได้

### ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในทะเล

จำนวนรวมสายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นที่รู้จัก ในโลกมีเพียงประมาณ 4,000 สายพันธุ์ เท่านั้นจากจำนวนรวมของแบคทีเรียทั้งหมดประมาณ 3,000,000 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 0.1 % (Groombridge, 1992)

เนื่องจาก 75 % ของพื้นผิวโลกถูกปกคลุมด้วยมหาสมุทร จุลินทรีย์ในระบบนิเวศทางทะเลจึงมีความซับซ้อนและหลากหลายโดยธรรมชาติ การศึกษาทางจุลชีววิทยารวมไปถึงศึกษารูปแบบของชีวิตบริเวณผิวน้ำและลึกลงไป ในแถบชายฝั่งทะเลและไกลออกไปจากชายฝั่งทะเล ระบบนิเวศที่ได้ศึกษาเป็นพิเศษ คือบริเวณปากภูเขาไฟใต้น้ำ, ระบบนิเวศแนวปะการังเขตร้อน, ระบบนิเวศปากแม่น้ำ, บึง, นาเกลือ (salt pans), backwaters, ป่าชายเลน บริเวณเหล่านี้ที่มีความอุดมสมบูรณ์และธาตุอาหารที่หลากหลาย ซึ่งในสิ่งแวดล้อมทางทะเลก็ประกอบไปด้วยที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ทะเล ดังนี้

1. บริเวณผิวน้ำที่สัมผัสอากาศ
2. บริเวณท้องน้ำ (ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ที่ดำรงชีพแบบอิสระ)
3. บริเวณผิวน้ำตะกอนที่ติดต่อกับผิวน้ำ
4. บริเวณตะกอน
5. บริเวณพื้นผิวอนุภาคของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์
6. บริเวณผิวภายนอกและภายในของพืชและสัตว์
7. บริเวณสภาพแวดล้อมที่เป็นที่สุด เช่น ร้อนจัด, เย็นจัด, เค็มจัด เป็นต้น

การศึกษาในครั้งนี้มีความสนใจจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณผิวภายนอกและภายในของพืชและสัตว์ ซึ่งพืชและสัตว์ (แพลงก์ตอนไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) บนพื้นผิวของมัน (เช่น epibiotic) และโพรงภายใน (เช่น endobiotic) มีความเหมาะสมในการให้จุลินทรีย์ต่างชนิดกันเจริญได้

### แบคทีเรียทะเล

นิยามของแบคทีเรียทะเลขึ้นอยู่กับความสามารถในการเจริญ ในความเข้มข้นของน้ำทะเลเท่านั้น แบคทีเรียทะเลหลายสายพันธุ์ต้องการ โซเดียมไอออน, โพแทสเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออน ส่วนบางสายพันธุ์ยังต้องการคลอไรด์ไอออนและเฟอร์ริกไอออน โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียทะเลมีความสามารถเจริญได้เฉพาะในน้ำทะเลเท่านั้น แบคทีเรียทั้งหมดที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลอาจจะไม่ใช่แบคทีเรียทะเลที่แท้จริง บริเวณใกล้ชายฝั่งทะเล 95 % ของประชากรแบคทีเรียอยู่ในรูปแบบทงเกลื้อ มีเพียง 5% ที่เป็นแบคทีเรียทะเลที่แท้จริง ส่วนในมหาสมุทรเปิดและทะเลน้ำลึก แบคทีเรียทะเลที่แท้จริงเป็นสายพันธุ์ที่โดดเด่น

ในมหาสมุทรมีน้ำอยู่  $10^{22}$  ลิตร และในน้ำนั้นประกอบไปด้วยแบคทีเรีย  $10^8$ - $10^9$  CFU/L แบคทีเรียส่วนใหญ่ของโลก ( $10^{30}$ ) อาศัยอยู่ในส่วนของท้องน้ำทะเล แบคทีเรียที่เหลือส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในตะกอนน้ำทะเลซึ่งครอบคลุม 70% ของพื้นผิวโลก แหล่งพลังงานสำคัญของแบคทีเรียคือแสงแดด แต่แสงแดดจะใช้ได้เฉพาะบริเวณที่ผิวน้ำ ส่วนแบคทีเรียในน้ำและตะกอนคาดว่าจะต้องใช้พลังงานในรูปแบบอื่นๆที่แตกต่างกันออกไป ในมหาสมุทรส่วนใหญ่จะเป็นแบบ oligotrophic (Purushothaman and Jayalakshmi, 2010)

รูปแบบการดำรงชีวิตของแบคทีเรียมีความหลากหลายเป็นอย่างมาก ในด้านความต้องการสารอาหาร นับเป็นเรื่องยากมากที่จะทำการจำแนกแบคทีเรียและมีการใช้ระบบต่างๆเป็นจำนวนมากในการค้นหาแบคทีเรียเหล่านี้ ระบบที่ใช้ในการจัดจำแนกคือความเหมือนกันตามสายวิวัฒนาการ (Woese and Fox, 1977) ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลาย ซึ่งการจัดกลุ่มนี้จะแยกเป็น prokaryotes, archaeobacteria และ eubacteria ซึ่งหากแบ่งแบคทีเรียเหล่านี้ตามแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่แบคทีเรียต้องใช้จะถูกแบ่งเป็น autotrophs และ heterotrophs

กลุ่ม autotrophs จัดตามแหล่งพลังงานที่ใช้จะถูกจัดเป็น photoautotrophs ใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งพลังงาน และ chemoautotrophs ใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน แบคทีเรียในกลุ่ม chemoheterotrophic เป็นตัวแทนแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ ถูกแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ถึงแม้จะอยู่ในกลุ่มอนุกรมวิธาน แต่แบคทีเรียแสดงความหลากหลายของเมตาบอลิซึมที่สูงมากและบางกลุ่มยังมีความสามารถเฉพาะตัวในการใช้ธาตุอาหารตามสภาพแวดล้อมที่อยู่ ซึ่ง Fenical และ Jensen (1993) ได้ทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียทะเลไว้ดังนี้

ตารางที่ 4 การจัดกลุ่มแบคทีเรียทะเล (Fenical and Jensen, 1993)

<b>Archaeobacteria</b>	<b>Autotrophic Eubacteria</b>	<b>Chemoheterotrophic Eubacteria</b>	<b>Eukaryotes</b>
Chemoautotrophs	Photoautotrophs	Gram positive	Fungi
Methanogens	Anoxygenic photosynthesis	Endospore forming rods and cocci	Higher fungi
Thermoacidophiles	Purple and green photosynthetic bacteria (Order Rhodospirillales)	Non spore forming rods	Ascomycetes
Chemoheterotrophs	Oxygenic photosynthesis	Non spore forming cocci (family Micrococceae)	Deuteromycetes
Halophiles	Cyanobacteria (order Cyanobacteriales)	Actinomycetes and related organisms	Basidiomycetes
	Prochlorophytes (order Prochlorales)		Lower fungi (class Phycomycetes)
	Chemoautotrophs Nitrifying bacteria (family Nitrobacteraceae)	Rods and cocci aerobic (family Pseudomonadaceae)	
	Colorless sulfur oxidizing bacteria	Facultative (family Vibrionaceae)	
	Methane oxidizing bacteria (family Methylococcaceae)	Anaerobic (sulfur reducing bacteria)	

ตารางที่ 4 (ต่อ) การจัดกลุ่มแบคทีเรียทะเล (Fenical and Jensen, 1993)

Archaeobacteria	Autotrophic Eubacteria	Chemoheterotrophic Eubacteria	Eukaryotes
Halophiles		Gliding bacteria (order Cytophagales and Beggiatoales) Spirochaetes (order Spirochaetales) Spiral and curved bacteria (family Spirillaceae) Budding, and/or appendaged bacteria Mycoplasma (class Mollicutes	

#### งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา มีการศึกษาสารต่างๆ ที่แยกได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและเชื้อก่อโรคต่างๆ เช่น สารต้านจุลินทรีย์จากฟองน้ำทะเล 10 ชนิด ที่เก็บตัวอย่างจากมหาสมุทรแอตแลนติกชายฝั่ง Morocco และจากอ่าวไทย นำมาสกัดโดยใช้ chloroform เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ และเชื้อรา 5 สายพันธุ์ โดยเทคนิค Agar disc method ผลที่ได้คือ สามารถยับยั้งอย่างน้อยที่สุด 1 สายพันธุ์ คิดเป็น 50% และ 20% สามารถยับยั้งเชื้อราได้ ขณะเดียวกันก็ได้มีการสกัดสารจาก *Hippospongia communis* และ *Ircinia variaibilis* ที่เก็บจากแหล่งเดียวกันซึ่งสามารถยับยั้ง *Candida tropicalis* R<sub>2</sub> (เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อ amphotericin B และ nystatin) รวมไปถึงแบคทีเรียและเชื้อราชนิดอื่นด้วย ซึ่งตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา โดยการหาค่า MIC มาตรฐาน โดยวิธีการ Broth dilution method และวิธี Two test media ( Rifai et al., 2004 )

มีรายงานว่าตัวอย่างฟองน้ำจากประเทศบราซิล สามารถที่จะผลิตสารต้านจุลินทรีย์ สารต้านเชื้อรา และสารต้านมะเร็ง ทำให้มีการค้นพบสารใหม่ที่ไชรักษาผู้ป่วยได้ โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรีย คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Micrococcus luteus*

ATCC 9341 โดยมี chloramphenicol เป็นยาที่ใช้ในเปรียบเทียบ ส่วนเชื้อราที่ยับยั้งได้คือ *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1600 (Monks et al., 2002)

จากการศึกษาของ Tadesse et al. (2008) ที่ได้ค้นพบสารประกอบที่แยกได้จาก กัลปังหาและฟองน้ำซึ่งสารประกอบเหล่านี้สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาและในคนได้ โดยสามารถต้านแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus* ซึ่งมีฤทธิ์ เทียบเท่ากับยาต้านจุลินทรีย์พวก penicillin, vancomycin, chloramphenicol รวมไปถึง polymyxin

อีกทั้งยังมีการศึกษาตัวอย่างฟองน้ำ 7 ชนิด จากทะเลเมดิเตอร์เรเนียนของ Touati et al. (2007) พบว่าเมื่อนำสารสกัดที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 8 สายพันธุ์ และเชื้อราก่อโรคอีก 6 สายพันธุ์ ปรากฏว่าสารสกัดจาก *Agelas oroides* และ *Axinella damicornis* สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* และ *Listeria monocytogenes* ที่ดื้อยา gentamicin รวมไปถึง *Enterococcus faecalis* ส่วนสารสกัดจาก *Axinella damicornis* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 8 สายพันธุ์และสารสกัดจาก *Agelas oroides* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์

Galeno and Martinez (2006) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟองน้ำทะเล 24 สายพันธุ์โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค คือ *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และเชื้อ *Candida albican* ATCC 10231 เมื่อสกัดสารจากฟองน้ำโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คือ methanol, chloroform และ n-hexane โดยใช้วิธี Disc diffusion assay ปรากฏว่า มี 19 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และมี 3 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุด คือ *Leucetta* aff. *Florida*, *Clinachyrella kuekenthali* และ *Svensea zeai* ซึ่งฟองน้ำบางสายพันธุ์ เช่น *Topsentia ophiraphidites* ประสิทธิภาพของการยับยั้งขึ้นกับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดด้วย ซึ่งเมื่อใช้ methanol ในการสกัดจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดี ส่วน *Ircinia strobilina* ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี

ส่วน Aceret et al. (1998) พบว่า *Sinularia flexibilis* เป็นปะการังอ่อนที่พบแบคทีเรีย และสาหร่ายปกคลุมบริเวณผิว และมีการสร้างสารพวก Sinulariolide และ Flexibilide ที่สามารถต่อต้านสิ่งมีชีวิตอื่นที่มารุกราน ซึ่งสามารถนำสารนี้มาทำเป็นสารปฏิชีวนะได้ โดยมีการสกัดตัวอย่างปะการัง และนำมาแช่เยือกแข็ง เพื่อสกัดสารเคมีและแยกให้ได้ diterpenes และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยวิธี Disc assay method และใช้วิธี Tube dilution technique เป็นวิธีทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ ผลการศึกษาจากทั้งสองวิธีพบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อแกรมบวกได้ 2 สายพันธุ์คือ *Bacillus* sp. และ *S. aureus* ซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับยา penicillin, chloramphenicol, vancomycin และ polymixin

ถึงแม้ว่าจะมีการค้นพบสารต้านจุลินทรีย์จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น กัลปังหาและฟองน้ำบางชนิด แต่ประสิทธิภาพของสารต่อต้านนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป (Munro and Munro, 2003) ซึ่งสารเหล่านี้อาจจะเพิ่มประสิทธิภาพในการต่อต้านหรือช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ (Aiker *et al.*, 2001) จากการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในทะเล ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากจุลินทรีย์จัดเป็นอันดับ 3 รองจากพวกฟองน้ำ (Sponga *et al.*, 1999) และ coelenterates (Blunt *et al.*, 2004) และหากมีการนำสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังดังกล่าวมาใช้ประโยชน์มากขึ้น โดยไม่มีการเพาะเลี้ยงทดแทนก็จะทำให้เกิดการสูญพันธุ์ได้ จากรายงานของ Friedrich *et al.* (1999) ที่พบว่า กว่า 40% ของมวลชีวภาพในเนื้อเยื่อของฟองน้ำ *Aplysina aerophoba* มีแบคทีเรียอาศัยอยู่ จึงนำไปสู่ความคิดที่ว่า แบคทีเรียเหล่านี้จะมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ดังนั้นทางเลือกที่ดีทางหนึ่งคือ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรค เนื่องจากมีการศึกษาจำนวนมากที่รายงานความสัมพันธ์ของการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล เช่น มีรายงานถึงการคัดแยกแบคทีเรียที่ได้จากฟองน้ำแถบ Antarctic ซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่รุนแรง แสดงถึงความสามารถของฟองน้ำและแบคทีเรีย ที่มีความอดทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย และจากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยวิธี 16S rDNA sequencing ยังมีการพบ  $\alpha$  และ  $\gamma$ -Proteobacteria (17.3 และ 65.3%), CFB group ของ Bacteroidetes (10.7%) และ Actinobacteria (6.7%) (Mangano *et al.*, 2008)

การศึกษาแบคทีเรียในตัวอย่างฟองน้ำ 4 สายพันธุ์จากทะเลจีนใต้ คือ *Stelletta tenui*, *Halichondria*, *Dysidea avara* และ *Craniella australiensis* โดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene เทียบผลกับฐานข้อมูล BLAST ได้แบคทีเรียทั้งหมดสี่ไฟลัม คือ *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* และ *Actinobacteria* (Li *et al.*, 2005)

นอกจากนี้มีการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในตัวอย่าง สาหร่าย เปรียงหัวหอม และปะการัง จากทางตอนเหนือของชายฝั่งทะเลแถบบราซิล พบเชื้อรา 256 สายพันธุ์ คัดแยกออกมา แตกต่างกัน 24 สกุล รวมไปถึง *Ascomycota*, *Zygomycota* และ *Basidiomycota* แบคทีเรีย 181 สายพันธุ์ แตกต่างกัน 41 สกุล เช่น *Bacillus*, *Ruegeria*, *Micrococcus*, *Pseudovibrio* และ *Staphylococcus* (Menezes *et al.*, 2010)

Gandhimathi *et al.* (2008) ได้ทำการแยก Actinomycetes จากฟองน้ำทะเลซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและราก่อโรคได้ โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Micrococcus luteus*, *Streptococcus haemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*,



*Staphylococcus aureus* ส่วนเชื้อราที่สามารถยับยั้งได้คือ *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* และ *Candida tropicalis*

Ely et al. (2004) คัดแยก แบคทีเรียและรา จากตัวอย่างฟองน้ำ 7 ชนิด และ สาหร่าย 2 ชนิด ในแถบชายฝั่งทะเลของประเทศอินเดีย เพื่อค้นหาสารต้านจุลินทรีย์ ในการทดลองนี้ สารสกัด Methanolic จากสิ่งมีชีวิตในทะเลเหล่านั้น แสดงกิจกรรมในการต้านจุลินทรีย์ได้หนึ่งชนิดหรือมากกว่านั้น โดย *Sigmatocia carnosus* แสดงกิจกรรมการยับยั้งที่กว้าง แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. ได้ *Echinogorgia* ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย แต่ *Echinogorgia reticulate* ยับยั้ง *Rhodotorula* sp. ได้ แต่น้อยมาก และ *E. compecta* สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. และ *Nocardia* sp. ได้ เชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียคือ *Haliclona cribriculis* และ *Chrotella australiensis* สามารถยับยั้ง *Klebsiella* sp. และ *Vibrio cholerae* ได้ตามลำดับ

Anand et al. (2005) คัดเลือก แบคทีเรียทะเล 75 สายพันธุ์ที่มีความเกี่ยวข้องกับ ฟองน้ำ 4 ชนิด (*Echinodictyum* sp., *Spongia* sp., *Sigmatocia fibulatus* และ *Mycale mannarensis*) ที่ได้จากชายฝั่ง Tuticorin coast ในแถบ อ่าว Mannar เพื่อศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะ ที่มีผลยับยั้งแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*, *Escherichai coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* และราก่อโรคอีก 1 ชนิด คือ *Candida albicans* โดยใช้วิธี agar-overlay พบว่า 21 % ของแบคทีเรียที่แยกได้สามารถสร้างสารสารปฏิชีวนะ โดยมีกิจกรรมยับยั้งแบคทีเรียในช่วงกว้างหรือมีความจำเพาะต่อชนิดของแบคทีเรีย และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ SC3 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์และเจริญเติบโตได้ดี หลังจากนั้นได้นำ culture broth มาสกัดด้วย ethyl acetate และนำมาแยกส่วนด้วย reverse phase HPLC พร้อมกับหา fraction ที่มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียสูง จากการศึกษาสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาของ SC3 พบว่าเป็นแกรมบวก รูปแท่ง สร้างสปอร์ได้ เคลื่อนที่ได้ ผลิต catalase และ oxidase จากการวิเคราะห์ Phylogenetic โดยการเปรียบเทียบและการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA gene พบว่ามีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับ *Vibrio* และ *Bacillus* ประมาณ 95-99% การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับการวิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับฟองน้ำในแถบทะเลอินเดียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้

ในการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างฟองน้ำจากทะเลเมดิเตอร์เรเนียนแล้วนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 5 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus lentus*, *Candida* sp., *Bacillus subtilis* และ *Mycobacterium* sp. หลังจากศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่าง ทำให้แยกได้สองกลุ่มคือ  $\alpha$  และ  $\gamma$  - Proteobacteria เมื่อศึกษาทางด้าน Phylogenetic พบว่า  $\gamma$ - Proteobacteria เทียบเคียงได้กับ *Vibrio* sp. และ *Pseudoalteromonas* sp. (Thiel and Imhoff, 2003)

อีกทั้งยังมีการศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ผิวของฟองน้ำ *Petrosia ficiformis* ซึ่งจากการแยกโดยวิธีการดั้งเดิมและวิธีการชีวโมเลกุล ผลปรากฏว่าคัดแยกได้ทั้งหมด 57 สายพันธุ์แบ่งได้ดังนี้ คือ *Pseudoalteromonas* sp., *Flavobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium*, *Actinomyces* sp., *Streptomyces* sp., *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Enterobacteriaceae* เมื่อนำมาวิเคราะห์แบบ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) พบว่าหลายไอโซเลทมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยทดสอบกับเชื้อก่อโรคในคนคือ *E. faecalis*, *S. aureus*, *Micrococcus* sp. ซึ่ง 2 สายพันธุ์ที่วิเคราะห์แยกได้คือ *Rhodococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. โดยการทำให้ 16S rRNA gene sequencing (Chelossi et al., 2004)

การศึกษาของ Wilson et al. (2009) พบว่าแบคทีเรียจากทะเลเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารต้านจุลินทรีย์ จากความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศทางทะเลซึ่งมีมากมายนั้น คาดว่าจะมีสารต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ให้ค้นพบได้ โดยแบคทีเรียที่ศึกษานั้นอาศัยอยู่ในท้องทะเล ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะอาศัยบนโฮสต์และพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่เหมาะสมกับการดำรงชีพ การศึกษาลักษณะความสามารถในการเจริญของประชากรจุลินทรีย์บนพื้นผิวทะเล ที่ทำเรือซิดนีย์ ประเทศออสเตรเลียและทดสอบกิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์นั้นพบว่า 47% ใน 104 ไอโซเลท ของตัวอย่างแบคทีเรียจากทะเลที่แยกจากท่าเรือซิดนีย์ ไม่สามารถจำแนกได้ถึงระดับจีโนม ได้ด้วยวิธี 16S rRNA gene ขณะที่การทดสอบสารต้านจุลินทรีย์ 104 ไอโซเลท พบว่ามีแบคทีเรียที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์ 10 ไอโซเลท และมี 8 ไอโซเลท ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน โดย 8 ไอโซเลทที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมายโดยการยับยั้งนั้นต้องใช้สารที่มีความเข้มข้นที่ไม่น้อยกว่า 6.6%v/v และเมื่อศึกษาชนิดของโมเลกุลของสารยับยั้งและการศึกษา Polarity extractions ของสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ 8 ไอโซเลท พบว่าสารต้านจุลินทรีย์นั้นมีขั้วสูงและถูกยับยั้งได้โดย Proteinase K ซึ่งแสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์เป็นสารประกอบพวกโปรตีน โดยการศึกษาเป็นการศึกษาครั้งแรกที่มีการเชื่อมข้อมูลระหว่าง phylogeny ของแบคทีเรียกลุ่มเกาะติดพื้นผิวกับการผลิตสารต้านจุลินทรีย์

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคและเชื้อรา *Aspergillus* sp. F33 และ F36 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากกัลปังหาที่เป็นโรค โดยทีมงานวิจัยของ รศ.ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร (Phongpaichit et al., 2006) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งคาดว่า *Aspergillus* sp. F33 อาจเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในกัลปังหา จากการศึกษาของสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ต ได้มีการค้นพบโรคที่เกิดกับปะการังและกัลปังหา โดยมีรายงานกัลปังหาที่เกิดโรค ทั้งในแถบมหาสมุทรอินโด-แปซิฟิกและแถบมหาสมุทรแอตแลนติก (ทะเลแคริบเบียน) เช่น โรคแถบสีขาว (white band disease) แถบสีดำ (black band disease) แถบสีน้ำตาล (brown band disease) โรคพวกนี้มีส่วนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะรา *Aspergillus* ซึ่ง

ในประเทศไทยเองได้มีการค้นพบที่แถบเกาะสิมิลันเมื่อหลายปีก่อน ทำให้กัลปังหาที่กองหินใต้ น้ำ Fantasy Reef เสียหายไปมาก เมื่อปลายปี พ.ศ. 2549 ได้พบปะการังดาวใหญ่ (*Diploastrea heliopora*) ที่แนวปะการังด้านตะวันออกของเกาะราชาใหญ่กำลังเกิดโรคแถบสีขาวอีกด้วย ซึ่งหากสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารที่ยับยั้งราก่อโรคในกัลปังหาและปะการังเหล่านี้ได้ ก็อาจจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ได้ในอนาคต

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดแยกและบ่งชี้แบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่แยกได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล
2. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์
3. หาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดที่แยกได้

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

คัดแยกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งอาจจะนำไปสู่การค้นพบสารต้านจุลินทรีย์ชนิดใหม่ได้

### ขอบเขตการวิจัย

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล ซึ่งคาดว่าจะได้แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ 500 ไอโซเลท เพื่อทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบ รวมทั้งหาค่า MIC, MBC และ MFC และบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค

**บทที่ 2**  
**วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง**

**2.1 วัสดุ**

**2.1.1 ตัวอย่าง**

**ตารางที่ 5 ตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล และ สถานที่เก็บตัวอย่าง**

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	จำนวน	สถานที่เก็บ	ผู้อนุเคราะห์ในการเก็บ ตัวอย่าง
9 พฤศจิกายน 2551	กัลปังหา <i>Paramuricea</i> sp.	3	จังหวัดตรัง (เขาเมง, เกะยา, เกาะม้า, เกาะโหลง, เกาะมุกต์, หินกวนอิม)	คณะผู้วิจัย
	ปะการังอ่อนหนาม <i>Dendronephthya</i> sp.	3		
24 พฤศจิกายน, 3 ธันวาคม 2551	กัลปังหา <i>Paramuricea</i> sp.	2	จังหวัดกระบี่ (หมู่เกาะสิมิลัน)	อาจารย์ศักดิ์อินันต์ ปลาทอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
	ปะการังสมอง <i>Platygyra</i> sp.	1		
9 ธันวาคม 2551	กัลปังหา <i>Paramuricea</i> sp.	2	จังหวัดสตูล (เกาะเขาใหญ่)	เจ้าหน้าที่ สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสตูล
	ฟองน้ำสีม่วง <i>Halichondria</i> sp.	1		
1 สิงหาคม 2552	กัลปังหา <i>Paramuricea</i> sp.	3	จังหวัดสตูล (เกาะเขาใหญ่)	เจ้าหน้าที่ สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสตูล
26 ตุลาคม 2552	กัลปังหา <i>Paramuricea</i> sp.	6	จังหวัดภูเก็ต (อ่าวมะขาม)	คุณธีรวัฒน์ จริตงาม นักวิชาการประมงปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมง ชายฝั่งภูเก็ต
	ฟองน้ำแจกันดำ <i>Aplysina</i> sp.	3		
	ปะการังเขากวาง <i>Acropora</i> spp.	1		
	เพรียงห่าน <i>Lepas anatifera</i>	1		

## 2.1.2 จุลินทรีย์ทดสอบ

### 2.1.2.1 แบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. วราภรณ์ วุฑฒะกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1. *Vibrio parahaemolyticus* PSU 1681
2. *Escherichia coli* PSU 95
3. *Staphylococcus aureus* PSU 106
4. *Salmonella* Typhimurium PSU 101

### 2.1.2.2 แบคทีเรียก่อโรค

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ศุภยางค์ วรวิฑูฒิกุณชัย ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
2. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 001R
3. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 002R
4. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 003R
5. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 004R
6. *Acinetobacter baumannii* AB 045
7. *Pseudomonas aeruginosa* PA 3
8. *Pseudomonas aeruginosa* PA 8
9. *Pseudomonas aeruginosa* PA 10
10. *Pseudomonas aeruginosa* PA 14

### 2.1.2.3 แบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐาน

ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1. *Bacillus subtilis*
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

#### 2.1.2.4 ราที่แยกได้จากกัลปังหาที่เป็นโรค

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1. *Aspergillus* sp. F33
2. *Aspergillus* sp. F36

#### 2.1.2.5 ราก่อโรคพืช

ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ศุภยงค์ วรภูมิคุณชัย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1. *Sclerotium rolfsii*
2. *Pythium aphanidermatum*
3. *Magnaporthe grisea*
4. *Phytophthora palmivora*
5. *Phytophthora botryosa*
6. *Ganoderma lucidum*
7. *Rigidoporus microporus*
8. *Rhizoctonia solani*

#### 2.1.2.6 สาหร่าย

*Microcystis aeruginosa* TISTR 8305

#### 2.1.3 สารเคมี

##### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- Artificial sea water agar (ASWA)
- Artificial sea water broth (ASWB)
- Luria Bertani broth (LB)
- Mueller-Hinton agar (MHA)
- Mueller-Hinton broth (MHB)
- Potato dextrose agar (PDA)
- Sabouraud dextrose broth (SDB)
- Tryptic soy agar (TSA)

## 2. ยาด้านจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ก)

- Amphotericin B
- Chloramphenicol

## 3. สารเคมีทั่วไป (ภาคผนวก ก)

สี

- Crystal violet
- Iodine
- Safranin
- Resazurin

ตัวทำละลาย

- Ethyl acetate
- Hexane
- Methanol
- Methanol:chloroform (1:1)

สารเคมีอื่น ๆ

- 70% และ 95% (Ethyl alcohol)
- 20% Glycerol
- 1% Tween-80
- Artificial Sea Water (ASW)
- Sterile normal saline solution (0.85% NaCl)
- Sodium sulfate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

### 2.1.4 อุปกรณ์

- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- สไลด์ (Slide)
- พาสเจอร์ปีเปต (Pasteur pipette)
- ปีเปต (Pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
- กรรไกร (scissor)

- หลอดทดลอง (Test tube) 13 X 100 มิลลิเมตร และ 16 X 100 มิลลิเมตร
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Bunsen burner)
- ปากคีบ (Forceps)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- เข็มเย็บเชื้อ (Needle)
- ห่วงเย็บเชื้อ (Loop)
- แท่งแก้วโค้งงอ (Spreader)
- ขวดฝาเกลียว (duran bottle) ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิเมตร
- เครื่องวัด pH (pH meter)
- Eppendorf
- Tips
- Foil
- Cylinder
- Mortar
- Vortex
- Vernier caliper
- Hot plate



## 2.2 วิธีการทดลอง

### 2.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกัลปังหา ปะการัง ฟองน้ำและเพรียง ใส่ในถุงที่บรรจุน้ำทะเลบริเวณที่เก็บตัวอย่าง รัดปากถุงด้วยยาง นำถุงตัวอย่างแช่ในกระติกน้ำแข็ง นำกลับห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบภายใน 24 ชม.

ตัดตัวอย่าง 1 g ล้างด้วย 70% alcohol และ sterile artificial seawater (ASW) (ตัวอย่างฟองน้ำล้างด้วย ASW เพียงอย่างเดียว) บดด้วยครกบดยาให้ละเอียด นำไปทำการเจือจางด้วยวิธี ten-fold dilution ใน ASW ปริมาตร 9 mL ทำการเจือจางต่อไปจนถึง  $10^{-7}$  ดูดตัวอย่างที่ความเจือจาง  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  ปริมาตร 0.1 mL spread ลงบน ASW agar โดยทำ ความเจือจางละ 3 plates นำไปบ่มที่  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน คัดเลือกโคโลนีที่แตกต่าง กัน เขี่ยเชื้อดังกล่าวมา restreak บน ASW agar เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เก็บแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ใน ASW agar slant เก็บไว้ที่  $4^{\circ}\text{C}$  สำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อไป

### 2.2.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)

#### 2.2.2.1 การเตรียมแบคทีเรียเพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

เลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วจากตัวอย่างกัลปังหา ปะการัง ฟองน้ำและเพรียง บนอาหาร ASW agar บ่มที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อใน ASW agar มาปรับ ความเข้มข้นของเชื้อให้ได้  $0.5 \text{ McFarland}$  ( $1.5 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ) ใน NSS (0.85 % NaCl) ดูด เชื้อ 0.3 mL เลี้ยงใน ASW broth 3 mL บ่มใน shaker ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 2.2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

##### 2.2.2.2.1 การเตรียมเชื้อราสำหรับการทดสอบ

เลี้ยง *Aspergillus* sp. F33, F36 บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เจริญก่อนที่จะทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่าง

##### 2.2.2.2.2 การเตรียม spore suspension

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรา เขี่ย spore ราที่ใช้ในการทดสอบ ใส่ใน 1% Tween-80 ปริมาตร 9 mL เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex ดูด spore suspension ปริมาตร 0.1 mL หยดลงบน Haemocytometer นับสปอร์รา นำมาคำนวณ โดยใช้สูตร  $4B \times 10^6 \text{ cells}$  (โดย B คือจำนวน สปอร์ราที่นับได้ใน 5 ช่องรวมกันแล้วหารด้วย 5) จำนวนให้ได้  $10^7$  สปอร์ต่อ 1% Tween-80 ปริมาตร 1 mL

### 2.2.2.2.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion โดยการดูด spore suspension จากข้อ 2.2.2.2.2 0.1 mL ผสมกับ soft agar 4 mL (ภาคผนวก ก) จะได้ spore suspension ที่มีความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อ soft agar 4 mL แล้ว overlay ทับบน ASW agar (20 mL ASW agar/plate) หลังจากนั้นเจาะหลุม ASW agar ด้วย Pasteur pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้ส่วนท้ายของ pasteur pipette กดลงไปบนเนื้อ ASW agar นำแบคทีเรียที่แยกได้ในข้อ 2.2.2.1 ที่เลี้ยงใน ASW broth ปริมาตร 80  $\mu$ L หยอดในหลุม บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้ววัด inhibition zone โดย Vernier caliper

### 2.2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

#### 2.2.2.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

นำแบคทีเรียก่อโรคเลี้ยงบนอาหาร TSA ยกเว้น *V. parahaemolyticus* PSU 1681 ให้เลี้ยงบน TSA +1% NaCl แบคทีเรียทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 2.2.2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS ดูดเชื้อปริมาตร 0.1 mL ผสมกับ soft agar 4 mL เขย่าด้วย Vortex ให้เข้ากันจะได้เชื้อก่อโรคความเข้มข้น  $10^7$  CFU/mL แล้ว overlay ทับบน ASW agar (20 ml ASW agar/plate) หลังจากนั้นเจาะหลุม ASW agar ด้วย Pasteur pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้ส่วนท้ายของ Pasteur pipette กดลงไปบนเนื้อ ASW agar นำแบคทีเรียที่แยกได้ในข้อ 2.2.2.1 ที่เลี้ยงใน ASW broth ปริมาตร 80  $\mu$ L หยอดในหลุม บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัด inhibition zone โดย Vernier caliper

### 2.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell suspension จากการบ่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ

การเตรียม P0915 cell suspension นำโคโลนี P0915 อายุ 48 ชม. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS ดูดเชื้อ P0915 10 mL ใส่ในอาหาร ASW broth ปริมาตร 100 mL บ่มใน orbital shaker ที่อุณหภูมิ 30 °C 120 rpm เก็บ cell suspension ชั่วโมงที่ 48, 72, 96, 120 เพื่อไปทดสอบตามข้อ 2.2.2 ดังแผนภูมิที่ 1 (ภาคผนวก ข.) (คำนวณสถิติโดยใช้ One Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS 15 สำหรับ Windows)

## 2.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell free supernatant

การเตรียม P0915 cell free supernatant นำโคโลนี P0915 ที่มีอายุ 48 ชม. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS คูดเชื้อ 10 mL ใส่ในอาหาร ASW broth ปริมาตร 100 mL บ่มใน orbital shaker ที่อุณหภูมิ 30 °C 120 rpm เป็นเวลา 48 ชม. นำ cell suspension ตกตะกอนเซลล์โดยทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant มาตรฐานผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำ cell free supernatant ไปทดสอบตามข้อ 2.2.2 ดังแผนภูมิที่ 2 (ภาคผนวก ข.)

### 2.2.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell free supernatant เข้มข้น

การเตรียม cell free supernatant นำโคโลนี P0915 ที่มีอายุ 48 ชม. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS คูดเชื้อ 10 mL ใส่ในอาหาร ASW broth ปริมาตร 100 mL บ่มใน orbital shaker ที่อุณหภูมิ 30 °C 120 rpm เป็นเวลา 48 ชม. นำ P0915 cell suspension ตกตะกอนเซลล์โดยทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant มาตรฐานผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำ cell free supernatant มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการทำให้ Freeze drying

เมื่อได้ Freeze dried cell free supernatant ละลายตัวอย่าง Freeze dried cell free supernatant ด้วย 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 mL เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ปริมาตรครบ 10 mL ซึ่งสารละลาย Freeze dried cell free supernatant มีความเข้มข้นขึ้นเป็น 10 เท่า จากความเข้มข้นของ cell free supernatant นำ Freeze dried cell free supernatant ที่ละลายแล้วไปทดสอบตามข้อ 2.2.2 ดังแผนภูมิที่ 3 (ภาคผนวก ข.)

## 2.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรีย

### 2.2.5.1 การเตรียมไอโซเลท P0915 ก่อนสกัด

#### 2.2.5.1.1 การเตรียม Cell free supernatant ในการทำ Freeze drying

นำโคโลนี P0915 ที่มีอายุ 48 ชม. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS คูดเชื้อ 10 mL ใส่ในอาหาร ASW broth ปริมาตร 100 mL บ่มใน orbital shaker ที่อุณหภูมิ 30 °C 120 rpm เป็นเวลา 48 ชม. นำ P0915 cell suspension ตกตะกอนเซลล์โดยทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant มาตรฐานผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำ cell free supernatant มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการทำให้ Freeze drying

### 2.2.5.1.2 การเตรียม cell suspension ในการทำ Freeze drying

นำโคโลนี P0915 ที่มีอายุ 48 ชม. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS ดูดเชื้อ 10 mL ใส่ในอาหาร ASW broth ปริมาตร 100 mL บ่มใน orbital shaker ที่อุณหภูมิ 30 °C 120 rpm เป็นเวลา 48 ชม. นำ cell suspension มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการทำให้ Freeze drying

### 2.2.5.1.3 การเตรียม cell suspension เพื่อสกัดสาร

นำโคโลนี P0915 ที่มีอายุ 48 ชม. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS ดูดเชื้อ 20 mL ใส่ในอาหาร ASW broth ปริมาตร 200 mL บ่มใน orbital shaker ที่อุณหภูมิ 30 °C 120 rpm เป็นเวลา 48 ชม. นำไปสกัดด้วยตัวทำละลายโดยตรงโดยไม่ผ่านการ Freeze drying

### 2.2.5.1.4 การเตรียม whole cell pellets เพื่อสกัดสาร

นำโคโลนี P0915 ที่มีอายุ 48 ชม. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS ดูดเชื้อ 10 mL ใส่ในอาหาร ASW broth ปริมาตร 100 mL บ่มใน orbital shaker ที่อุณหภูมิ 30 °C 120 rpm เป็นเวลา 48 ชม. นำ P0915 cell suspension ตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนที่เป็น supernatant ทิ้ง นำส่วนของตะกอนเซลล์หลังหมุนเหวี่ยงเก็บไว้เพื่อนำไปสกัดสารออกฤทธิ์ต่อไป

ผลจากการทำ Freeze drying ได้สารสีขาวออกเหลือง ร่วน หลังจากนั้นนำ Freeze dried cell free supernatant, Freeze dried cell suspension, cell suspension และ whole cell pellets มาทำการสกัดด้วย Ethyl Acetate ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

### 2.2.5.2 การสกัดสารตัวอย่างด้วย Ethyl Acetate (EtOAc) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Al-Zereini (2006)

นำ Freeze dried cell free supernatant หรือ Freeze dried cell suspension หรือ cell suspension หรือ whole cell pellets มาทำการสกัดด้วย EtOAc สามครั้ง ครั้งที่หนึ่ง นำตัวอย่าง 200 mL (หากตัวอย่างเป็นของแข็งให้ชั่งตัวอย่างมา 5 g ผสมกับน้ำกลั่น 200 mL) ใส่กรวยสกัดสาร เติม EtOAc 100 mL ปิดฝากรวย คลายกรวย เขย่าแล้วคลายกรวย จนกว่าแรงดันในกรวยจะเหลือน้อยลง หนีบกรวยไว้กับขาตั้ง รอให้น้ำกับ EtOAc แยกชั้นออกจากกัน เปิดฝากรวยไขส่วนน้ำออกและเทส่วน EtOAc ออกทางปากกรวย เก็บส่วน EtOAc ส่วนที่ 1 ไว้ นำส่วนน้ำมาเทใส่กรวยทำการสกัดครั้งที่สอง เติม EtOAc 100 mL แล้วทำเช่นเดียวกับครั้งแรก

ไซส่วนน้ำออก เทส่วน EtOAc ส่วนที่ 2 เก็บไว้ การสกัดครั้งที่สาม นำส่วนน้ำมาใส่กรวย เติม EtOAc 100 mL แล้วทำเช่นเดียวกับครั้งที่หนึ่งและสอง ไซส่วนที่เป็นน้ำออก เท EtOAc ส่วนที่ 3 เก็บไว้

เติมน้ำกลั่นลงไปในการสกัดประมาณ 100 mL นำ EtOAc ทั้ง 3 ส่วนมารวมกัน แล้วเทใส่กรวยสกัด ทำการเขย่าอย่างขำงต้น แล้วรอให้ส่วนน้ำและส่วน EtOAc แยกชั้นกัน ไซส่วนน้ำออก เท EtOAc เก็บไว้

เติม sodium sulfate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ลงไปเพื่อเอาน้ำที่ปนอยู่ออก โดยเติมทีละน้อยแล้วเขย่าแล้ววางทิ้งไว้จนสังเกตเห็น  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  จับเป็นก้อน กรองเอา  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ออก โดยใช้กรวยกรอง ที่มีชั้นกรองเป็นไส้ที่ผ่านการล้างด้วย organic solvent แล้ว นำส่วน EtOAc ที่กรอง  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ออกแล้วไปทำการระเหย EtOAc ออกที่อุณหภูมิ  $30\text{ }^\circ\text{C}$  ด้วยเครื่อง Evaporator

ละลายสารสกัดจากขวดระเหยสารด้วย EtOAc เทส่วนของ EtOAc เก็บใส่ขวดแก้ว ทำการระเหย EtOAc ที่ใช้ละลายออก เก็บสารที่เหลืออยู่ในขวดไว้ที่  $4\text{ }^\circ\text{C}$  (แผนภูมิที่ 4)

ละลายสารสกัดจากแบคทีเรีย ด้วย 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL สำหรับเก็บเป็น stock solution แล้วเจือจางด้วย DMSO ในอัตราส่วน 1:10 หลังจากนั้นนำสารสกัดที่สกัดได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งตามข้อ 2.2.2

### 2.2.5.3 การหาค่า MIC, MBC และ MFC (ตัดแปลงวิธี broth micro-dilution จาก CLSI M38-A(2002),M7-A8 (2009)) ดังนี้

ละลายสารสกัด ethyl acetate ด้วย 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL สำหรับเก็บเป็น stock solution ตูต 10% DMSO ปริมาตร 20  $\mu\text{L}$  ลงไปในทุกหลุมของ 96 well plate หลังจากนั้นตูดสารสกัดใส่หลุมแรก ปริมาตร 20  $\mu\text{L}$  ดังนั้นหลุมแรกจะมีความเข้มข้นเป็น 1,024  $\mu\text{g/mL}$  ทำการเจือจางไปเรื่อยๆจะได้ 10 ความเข้มข้น อยู่ในช่วงระหว่าง 0.25-1,024  $\mu\text{g/mL}$  โดยทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เติม SDB ปริมาตร 80  $\mu\text{L}$  ลงไปในทุกหลุม หลังจากนั้นเติม spore suspension ของเชื้อรา (2.2.2.2) (spore ที่ผสมกับอาหาร SDB ในอัตราส่วน 1:10) ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ลงใน 96 well plate ที่มี สารสกัด cell suspension และอาหาร SDB ในข้างต้น โดยมีชุดควบคุม negative control ที่เติม spore suspension กับอาหาร SDB และ positive control เติม amphotericin B และ spore suspension ของเชื้อรา (แผนภูมิที่ 5) บ่มที่อุณหภูมิ  $25\text{ }^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 3 วัน ทำการอ่านค่า MIC การอ่านค่า MIC จะเติมน้ำสี 0.18% resazurin ปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  เมื่อบ่มไปแล้ว 68 ชม. บ่มที่  $25\text{ }^\circ\text{C}$  ต่อไป 4 ชม. แล้วอ่านผล โดยถ้าสี resazurin กลายเป็นสีชมพู-บานเย็น แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อร่าก่อโรค หากสี resazurin ยังมีสีคงเดิมคือ สีน้ำเงิน-ม่วง แสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค นำหลุมที่

มีน้ำเงินมา streak บนอาหาร PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 วัน เพื่ออ่านค่า MFC

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก็ทำเช่นเดียวกันคือ นำสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL สำหรับเก็บเป็น stock solution ดูด 10% DMSO ปริมาตร 20  $\mu$ L ลงไปในทุกหลุมของ 96 well plate หลังจากนั้นดูดสารสกัดใส่หลุมแรกปริมาตร 20  $\mu$ L ดังนั้นหลุมแรกจะมีความเข้มข้นเป็น 1,024  $\mu$ g/mL ทำการเจือจางไปเรื่อยๆจะได้ 10 ความเข้มข้น อยู่ในช่วงระหว่าง 0.25-1,024  $\mu$ g/mL โดยทำ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เติม MHB ปริมาตร 80  $\mu$ L ลงไปในทุกหลุม หลังจากนั้นเติม bacterial suspension (2.2.2.2) (bacterial suspension ที่ผสมกับอาหาร MHB ในอัตราส่วน 1:10) ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงใน 96 well plate ที่มี สารสกัด cell suspension และอาหาร MHB ใน ข้างต้น โดยมีชุดควบคุม negative control ที่เติม bacterial suspension กับอาหาร MHB และ positive control เติม chloramphenicol และ bacterial suspension (แผนภูมิที่ 5) บ่มที่ อุณหภูมิ 35 °C เวลา 24 ชั่วโมง ทำการอ่านค่า MIC การอ่านค่า MIC จะเติมสี 0.18% resazurin ปริมาตร 10  $\mu$ L เมื่อบ่มไปแล้ว 20 ชม. บ่มที่ 35 °C ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วอ่าน ผล โดยถ้าสี resazurin กลายเป็นสีชมพู-บานเย็น แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อก่อโรค หากสี resazurin ยังมีสีคงเดิมคือ สีน้ำเงิน-ม่วง แสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค นำหลุมที่มีน้ำเงินมา streak บนอาหาร TSA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เวลา 24 ชั่วโมง เพื่ออ่านค่า MBC

ที่มา : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, arch 1,2010, ( ศิริรุช, 2550)

## 2.2.6 การยับยั้งร่าก่อโรคพืชของ P0915 cell suspension

ปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS ดูดเชื้อ 1 mL เลี้ยงใน ASW broth 10 mL บ่มใน shaker ความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ใช้พาสเจอร์ปีเปต (Pasture pipette) เจาะหลุมบนอาหาร PDA plate ไว้ด้านหนึ่ง ตัดเส้นใยราวางบนอาหาร PDA plate ในด้านตรงกันข้ามให้มีระยะห่าง 3 ซม. หยด cell suspension อายุ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 80  $\mu$ L ลงไปในหลุม นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 25 °C เป็น เวลา 3-7 วัน วัด inhibition zone

### 2.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้ง *M. aeruginosa* TISTR 8305 ของ P0915 cell suspension โดยวิธี microdilution method ดัดแปลงมาจากวิธีของ

Kim et al. (2009)

นำเชื้อ P0915 ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS ตูตเชื้อ 1 mL เลี้ยงใน ASW broth 10 mL บ่มใน shaker ความเร็ว 120 rpm ที่ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ทำการปรับความเข้มข้น P0915 cell suspension ให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ทำการเจือจาง ให้ได้ปริมาณเชื้อ  $10^1$ - $10^8$  CFU/mL ตูตเชื้อใส่ใน 96 well plate ปริมาตร 100  $\mu$ L ต่อหลุม ใส่ *M. aeruginosa* TISTR 8305 (ความหนาแน่น  $2.8 \times 10^6$  cells/mL) ลงไปในหลุมละ 100  $\mu$ L บ่มในที่ๆมีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน ทำการนับเซลล์สำหรับที่เหลืออยู่ด้วย Haemocytometer

### 2.2.8 การทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้ง *M. aeruginosa* TISTR 8305 ของ สารสกัด ethyl acetate P0915 cell suspension โดยวิธี microdilution method

เจือจางสารสกัด ethyl acetate P0915 cell suspension ใน 96 well plate ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500, 1,500, 2,500, 3,500, 4,500  $\mu$ g/mL ต่อหลุม (แต่ละหลุมมีสารสกัด ปริมาตร 100  $\mu$ L) ใส่ *M. aeruginosa* TISTR 8305 (ความหนาแน่น  $2.8 \times 10^6$  cells/mL) ลงไปในหลุมละ 100  $\mu$ L บ่มในที่ๆมีแสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน ทำการนับเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ที่เหลืออยู่ด้วย Haemocytometer

### 2.2.9 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของไซยาโนแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope (SEM))

ได้ทำการส่งตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียเพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำการทดสอบโดยเครื่อง Scanning Electron Microscope, JSM-5800 LV, JEOL, JAPAN วิธีการทดสอบ อ้างอิงตามวิธีปฏิบัติงาน เลขที่ WI-RES-SEM5800-001 และ WI-RES-SEM-001 โดยใช้กำลังขยาย x 1,500, x 8,000, x 25,000

## 2.2.10 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท P0915 โดย

### API ZYM Kit (by Biomerieux)

ทำการเลี้ยงเชื้อ ไอโซเลท P0915 บนอาหาร ASW agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม. นำไอโซเลท P0915 ดังกล่าวเตรียม suspension ใน NSS ปริมาตร 2 mL ให้มีความขุ่น 5-6 McFarland ( $4.8 \times 10^9 - 9.6 \times 10^9$  CFU/mL) ทำการ label ลงบนขอบผนัง ถาด เติมน้ำกลั่นในหลุมของถาด 5 mL เพื่อเพิ่มความชื้น แกะแถบทดสอบเอนไซม์ แต่ละอันออกมา วางแถบทดสอบเอนไซม์ในกล่องบ่ม นำไอโซเลท P0915 ที่เตรียมไว้ หยดลงไปหลุมบนแถบทดสอบเอนไซม์ หลุมละ 65  $\mu$ L หลังจากเติมไอโซเลท P0915 แล้ว ปิดฝาถาด บ่ม ที่ 37 °C เป็นเวลา 4-4.5 ชม. หลังจากบ่มครบตามเวลา แล้ว หยด ZYM A หลุมละ 1 หยด และ ZYM B หลุมละ 1 หยด ลงไปในแต่ละหลุมบนแถบทดสอบเอนไซม์ รอสีเปลี่ยนอย่างน้อย 5 นาที ภายใต้แสง ถ้าผลเป็นบวกจะเปลี่ยนสีอย่างถาวรตามแต่ชนิดของเอนไซม์ ถ้าผลเป็นลบจะเปลี่ยนเป็นไม่มีสีเมื่อเทียบกับหลุมควบคุม อ่านผลโดยเปรียบเทียบกับแถบสี แผนภูมิที่ 6 (ภาคผนวก ข.)

## 2.2.11 การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทางชีวโมเลกุล

การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (16 rDNA analysis) ความยาว 1500 เบส primers ที่ใช้คือ 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3', positions 9-27 on 16S rDNA by the *E. coli* numbering system; Brosius *et al.*, 1981) และ 1500R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3', position 1509-1492 on 16S rDNA by the *E. coli* numbering system; Brosius *et al.*, 1981) โดยส่งตรวจวิเคราะห์ที่ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) (เอกสารอ้างอิง ภาคผนวก ค.)



### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

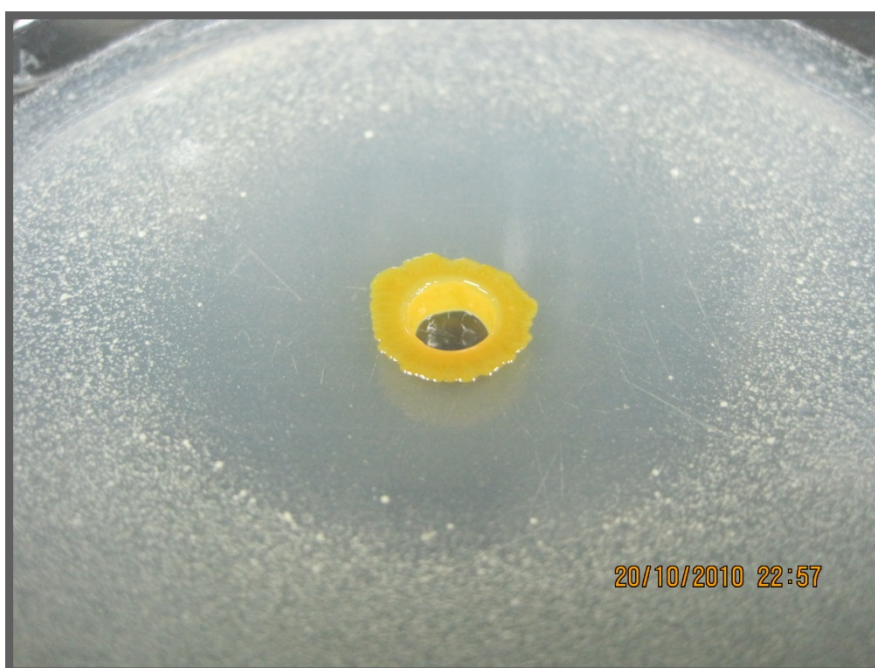
##### 3.1 ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลและการทดสอบ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากการเก็บตัวอย่างสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลอันดามันใน 4 จังหวัด คือ จังหวัดสตูล, จังหวัดตรัง, จังหวัดกระบี่และภูเก็ต เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 397 ไอโซเลท ในปี 2551 (อัมพรรัตน์, 2552) และ 117 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างกัลปังหาและฟองน้ำ จากจังหวัดสตูลและจังหวัดภูเก็ต ในปี 2552 รวมทั้งสิ้น 514 ไอโซเลท โดยสามารถแยกแบคทีเรียแกรมลบได้ 299 ไอโซเลท (58%) และแยกแบคทีเรียแกรมบวกได้ 215 ไอโซเลท (42%) นำแบคทีเรียทั้ง 514 ไอโซเลท มาทำการทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 6 สายพันธุ์ด้วยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996) พบแบคทีเรียที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมด 29 ไอโซเลท (5.64 %) (ตารางที่ 6) โดยทั้ง 29 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *V. parahaemolyticus* PSU 1681, *E. coli* PSU 95, *S. aureus* PSU 106, *S. Typhimurium* PSU 101, และ รา *Aspergillus* sp. F33, *Aspergillus* sp. F36 ได้อย่างน้อย 1 ชนิด มีแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่า 1 ชนิด คือ ไอโซเลท P0268, P0576 และ P0663 สามารถยับยั้ง *S. aureus* PSU 106 มีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 8.7-12.6 mm, และให้วงใสในการยับยั้ง *Aspergillus* sp. F33 อยู่ในช่วง 8.6-10.8 mm, ไอโซเลท S0331 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 3 สายพันธุ์ โดยสามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* PSU 1681 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 11.5 mm, *S. aureus* PSU 106 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 19.9 mm และสามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* PSU 101 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 11.3 mm, ไอโซเลท P1116 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ 3 สายพันธุ์ เช่นกัน โดยสามารถยับยั้ง *S. aureus* PSU 106 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 14.9 mm, *Aspergillus* sp. F33 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 13.3 mm และ *Aspergillus* sp. F36 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 10.3 mm และ ไอโซเลท P0915 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้ง 6 ชนิดคือสามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* PSU 1681 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 9.0 mm, *E. coli* PSU 95 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 10.6 mm, *S. aureus* PSU 106 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 24.2 mm, *S. Thyphimurium* PSU 101 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 8.2 mm, และ รา *Aspergillus* sp. F33 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 17.4 mm, *Aspergillus* sp. F36 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 9.7 mm

จากการทดสอบดังกล่าวพบว่า มีแบคทีเรียที่แยก 20 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้ง *Aspergillus* sp. F33 มีค่า inhibition zone ระหว่าง 8-17 mm, 14 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* PSU 106 มีค่า inhibition zone ระหว่าง 8-24 mm ส่วน *V. parahaemolyticus* PSU 1681, *S. Typhimurium* PSU 101 และ *Aspergillus* sp. F36 มีแบคทีเรียเชื้อละ 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคดังกล่าวได้และมีแบคทีเรีย 1 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *E. coli* PSU 95 ได้

จากการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่า แบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค แยกได้จากกัลปังหา 8 ตัวอย่าง จากตัวอย่างกัลปังหาทั้งหมด 16 ตัวอย่าง แยกได้จากฟองน้ำ 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างฟองน้ำทั้งหมด 4 ตัวอย่าง แยกได้จากปะการัง 1 ตัวอย่าง จากปะการังทั้งหมด 5 ตัวอย่างและแยกได้จากเพรียง 1 ตัวอย่าง จากตัวอย่างเพรียงทั้งสิ้น 1 ตัวอย่าง จาก 3 จังหวัด (ตารางที่ 7)

เมื่อทำการทดสอบซ้ำ อีกสามครั้ง พบว่า แบคทีเรีย 4 ไอโซเลทคือ P0268, P0576, P0663 และ P1116 มีกิจกรรมการยับยั้งน้อยลง จนไม่เกิดการยับยั้งในที่สุดและอีก 1 ไอโซเลท S0331 ทำการเลี้ยงเชื้อใหม่ไม่ขึ้น จากข้อมูลผลการทดสอบของไอโซเลท P0915 (รูปที่ 1) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งของเชื้อที่หลากหลายสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ จึงทำการคัดเลือกไอโซเลท P0915 เพื่อทำการศึกษาต่อไป



รูปที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ต้าน *S. aureus* PSU 106 เบื้องต้นของ P0915 cell suspension โดยวิธี agar well diffusion

ตารางที่ 6 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียทะเลที่แยกได้  
โดยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)




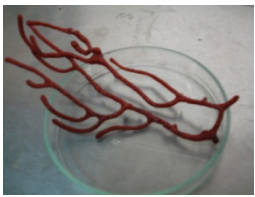

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)					
	<i>V. parahaemolyticus</i> PSU 1681	<i>E. coli</i> PSU 95	<i>S. Typhimurium</i> PSU 101	<i>S. aureus</i> PSU 106	<i>Aspergillus</i> sp. F33	<i>Aspergillus</i> sp. F36
S0244	-	-	-	9.5	-	-
S0255	-	-	-	9.3	-	-
S0331	11.5	-	11.3	19.9	-	-
S0334	-	-	-	-	8.3	-
S0341	-	-	-	-	10.9	-
S0347	-	-	-	11.5	-	-
S0351	-	-	-	13.7	-	-
P0240	-	-	-	9.3	-	-
P0265	-	-	-	-	13.2	-
P0266	-	-	-	-	12.6	-
P0267	-	-	-	-	9.0	-
P0268	-	-	-	9.7	10.8	-
P0271	-	-	-	-	12.8	-
P0381	-	-	-	-	9.2	-
P0572	-	-	-	8.2	-	-
P0575	-	-	-	-	14.1	-
P0576	-	-	-	8.7	9.1	-
P0577	-	-	-	14.5	-	-
P0663	-	-	-	12.6	8.6	-
P0785	-	-	-	-	13.3	-
P0861	-	-	-	-	15.9	-
P0863	-	-	-	-	1.7	-

ตารางที่ 6 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียทะเลที่แยกได้โดยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)


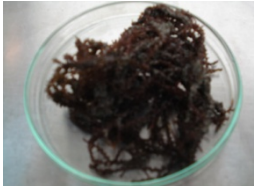



ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)					
	<i>V. parahaemolyticus</i> PSU 1681	<i>E. coli</i> PSU 95	<i>S. Typhimurium</i> PSU 101	<i>S. aureus</i> PSU 106	<i>Aspergillus</i> sp. F33	<i>Aspergillus</i> sp. F36
P0871	-	-	-	11.5	-	-
P0915	9.0	10.6	8.2	24.2	17.4	9.7
P1061	-	-	-	-	10.1	-
P1062	-	-	-	-	11.5	-
P1063	-	-	-	-	14.2	-
P1116	-	-	-	14.9	13.3	10.3
I6-5	-	-	-	-	8.4	-
รวม	2	1	2	14	20	2

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรสดังกล่าวได้

ตารางที่ 7 แหล่งที่มาของแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

	ตัวอย่าง	แบคทีเรียทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบ	ที่มาของ ตัวอย่าง
กัลปังหา		P0244, P0255	จังหวัดสตูล
		S0331, S0334, S0341, S0347, S0351	จังหวัดสตูล
		P0785	จังหวัดภูเก็ต
		P0861, P0863, P0871	จังหวัดภูเก็ต
		I6-5	จังหวัดตรัง

ตารางที่ 7 (ต่อ) แหล่งที่มาของแบคทีเรีย ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

	ตัวอย่าง	แบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ	ที่มาของตัวอย่าง
กัลปังหา		P0572, P0575, P0576, P0577	จังหวัดภูเก็ต
		P0381	จังหวัดภูเก็ต
		P1116	จังหวัดภูเก็ต
ปะการัง		P1061, P1062, P1063	จังหวัดภูเก็ต
เพรียง		P0915	จังหวัดภูเก็ต

ตารางที่ 7 (ต่อ) แหล่งที่มาของแบคทีเรีย ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

ตัวอย่าง	แบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ	ที่มาของตัวอย่าง
ฟองน้ำ		P0240, P0265, P0266, P0267, P0268, P0271
		P0663
		จังหวัดภูเก็ต

### 3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell suspension จากการบ่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ P0915 cell suspension จากการบ่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า สามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* PSU 1681 และ *E. coli* PSU 95 ได้ดีที่สุดในการบ่มที่ 48 ชม. ส่วนฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* PSU, *Aspergillus* sp. F33 และ *Aspergillus* sp. F36 ของ P0915 cell suspension จากการบ่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* PSU 101 ได้ดีที่สุดในที่ 96 ชม. (ตารางที่ 8, รูปที่ 2) จึงได้ทำการเลือกเวลาที่ 48 ชั่วโมงในการบ่มเพื่อการศึกษาประสิทธิภาพอื่น ๆ ต่อไป

### 3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell free supernatant

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ P0915 cell free supernatant อายุ 48 ชม. พบว่า เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไอโซเลท P0915 ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ cell free supernatant ดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งน้อย สามารถยับยั้ง *S. aureus* PSU 106 ให้ inhibition zone 7.4 mm, ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ให้ inhibition zone 7.7 mm ส่วน *V. parahaemolyticus* PSU 1681 ให้ inhibition zone 6.8 mm (ตารางที่ 9) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์มีน้อยมากใน cell free supernatant จึงมีการทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการนำ cell free supernatant ไปทำ Freeze drying

### 3.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell free supernatant เข้มข้น

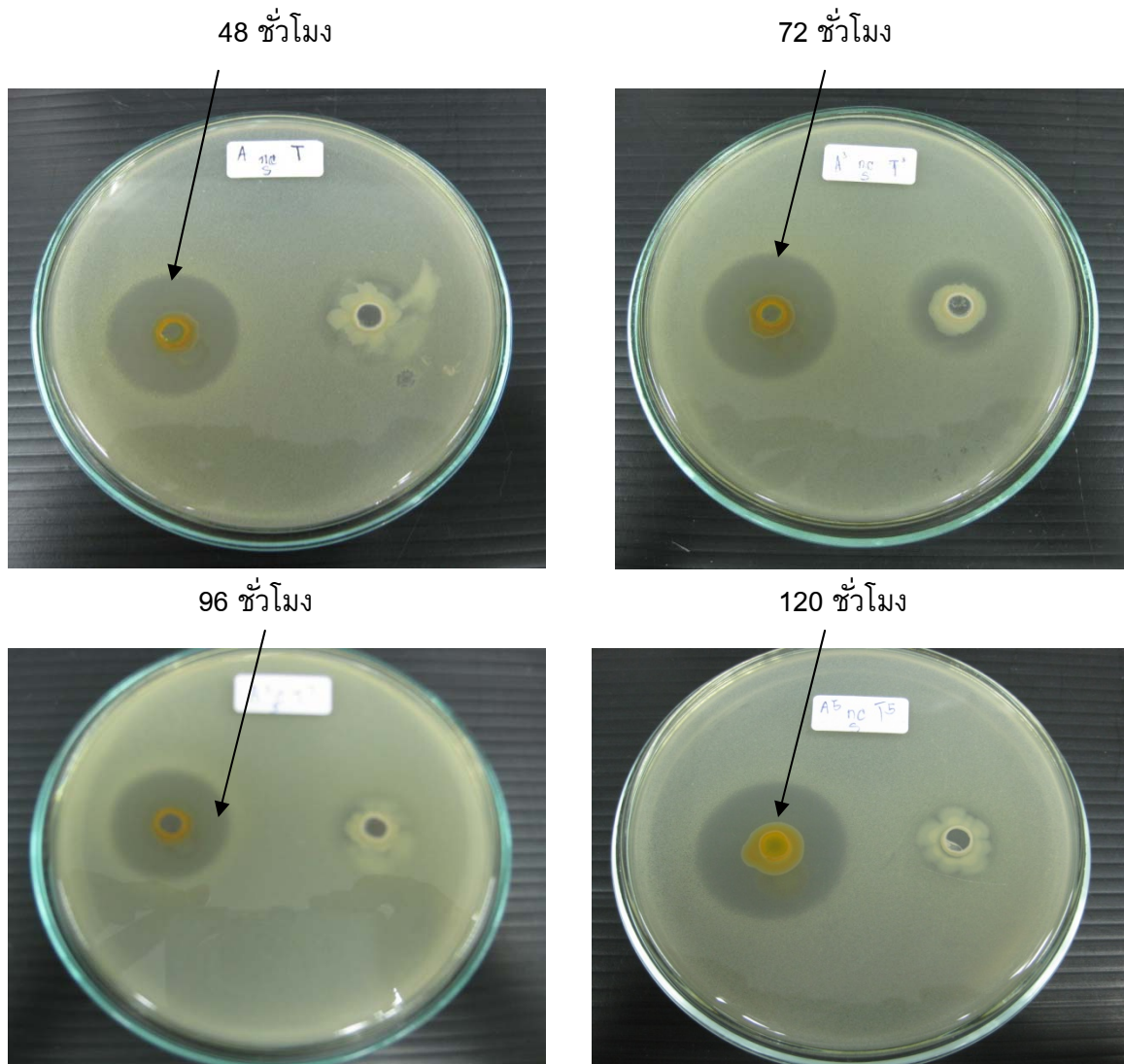
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ P0915 Freeze dried cell free supernatant พบว่า แม้จะทำให้ cell free supernatant เข้มข้นขึ้น 10 เท่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ก็ไม่ได้เพิ่มขึ้นมากนัก ซึ่ง P0915 Freeze dried cell free supernatant สามารถยับยั้ง *S. aureus* PSU 106 ให้ inhibition zone 8.3 mm และยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ให้ inhibition zone 8.5 mm ขณะที่ *V. parahaemolyticus* PSU 1681 ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเมื่อทำการทดสอบกับ P0915 Freeze dried cell free supernatant (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell suspension จาก  
การบ่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ

อายุ ของไอ โซเลท P0915 (ชม.)	ขนาด inhibition zone (mm)					
	<i>V. parahaemolyticus</i> PSU 1681	<i>E. coli</i> PSU 95	<i>S. Typhimurium</i> PSU 101	<i>S. aureus</i> PSU 106	<i>Aspergillus</i> sp. F33	<i>Aspergillus</i> sp. F36
48	14.70±0.20 <sup>a1</sup>	14.07±0.38 <sup>a2</sup>	13.00±0.20 <sup>a3</sup>	26.80±0.20 <sup>a4</sup>	17.20±0.20 <sup>a5b5</sup>	17.00±0.53 <sup>a6</sup>
72	10.60±0.10 <sup>b1</sup>	13.70±0.20 <sup>a2</sup>	9.60±0.26 <sup>b3</sup>	26.90±0.20 <sup>a4</sup>	17.50±0.20 <sup>b5</sup>	16.80±0.20 <sup>a6</sup>
96	12.70±0.20 <sup>c1</sup>	13.50±0.53 <sup>a2</sup>	14.00±0.26 <sup>c3</sup>	26.70±0.26 <sup>a4</sup>	16.70±0.20 <sup>a5</sup>	16.50±0.17 <sup>a6</sup>
120	11.66±0.25 <sup>d1</sup>	12.40±0.10 <sup>b2</sup>	11.50±0.26 <sup>d3</sup>	27.00±0.17 <sup>a4</sup>	17.40±0.17 <sup>b5</sup>	16.60±0.26 <sup>a6</sup>

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่า SD ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ( $p > 0.05$ )





รูปที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของ P0915 cell suspension จากการป่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในการยับยั้ง *S. aureus* PSU 106 โดยวิธี agar well diffusion

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell suspension, P0915 cell free supernatant และ P0915 cell free supernatant เข้มข้น

จุลินทรีย์ทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibition zone (mm)		
	CS	CFS	CCFS
<i>V. parahaemolyticus</i> PSU 1681	14.7	6.8	-
<i>E. coli</i> PSU 95	14.1	-	-
<i>S. Typhimurium</i> PSU 101	13.0	-	-
<i>S. aureus</i> PSU 106	26.8	7.4	8.3
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	NT	7.7	8.5
<i>Aspergillus</i> sp. F33	17.2	-	-
<i>Aspergillus</i> sp. F36	17.0	-	-

CS = cell suspension

NT = not tested

CFS = cell free supernatant

- = no zone

CCFS = concentrated cell free supernatant

3.5 ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของ P0915 cell suspension โดยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)

ผลจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มเติมคือ *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน 2 สายพันธุ์, MRSA 4 สายพันธุ์ (NPRC 001R-NPRC 004R), *Acinetobacter baumannii* AB 045, *P. aeruginosa* PA 3, PA 8, PA 10 และ PA 14 หลังจากทำการทดสอบ P0915 กับ จุลินทรีย์ก่อโรค ดังกล่าว พบว่า ไอโซเลท P0915 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบเกือบทุกสายพันธุ์ทั้งแกรมลบและแกรมบวกโดยมีค่า inhibition zone อยู่ในช่วง 13.3-19.4 mm. (ตารางที่ 10)

3.6 ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด ethyl acetate จากส่วนต่างๆที่ได้จาก P0915

จากผลการทดสอบข้างต้น จึงทำการสกัดสารจาก P0915 โดยใช้ ethyl acetate ทำการสกัดจาก Freeze dried cell free supernatant, Freeze dried cell suspension, cell suspension และ whole cell pellets ซึ่งพบว่า สารสกัด ethyl acetate ของ P0915 cell suspension มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยให้วงใสในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ ดังนี้ ยับยั้ง

*V. parahaemolyticus* PSU 1681 ให้ inhibition zone 14.3 mm, ยับยั้ง *S. Typhimurium* PSU 101 ให้ inhibition zone 11.0 mm, ยับยั้ง *S. aureus* PSU 106 ให้ inhibition zone 13.0 mm, ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ให้ inhibition zone 13.7 mm (ตารางที่ 11) จึงคัดเลือกสารสกัด ethyl acetate ของ P0915 cell suspension เพื่อนำมาหาค่า MIC, MBC และ MFC

### 3.7 ผลการหาค่า MIC ของ สารสกัด ethyl acetate ของ P0915 cell suspension

โดยนำแบคทีเรียก่อโรคที่มีอายุ 24 ชั่วโมงและราก่อโรคที่มีอายุ 3 วัน มาทำการทดสอบกับสารสกัดโดยวิธี broth micro-dilution ผลของการหาค่า MIC, MBC และ MFC

จากการหาค่า MIC ของ สารสกัด ethyl acetate ของ P0915 cell suspension ที่มีความเข้มข้นของสารอยู่ในช่วง 2-1,024 µg/mL พบว่า สารสกัดจากเชื้อ P0915 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29213, MRSA NPRC 001R, MRSA NPRC 002R, *B.subtilis* ที่ค่า MIC เท่ากับ 256 µg/mL และสารสกัดจากเชื้อ P0915 สามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* PSU 1681, *S. aureus* PSU 106, *S. aureus* ATCC 25923, MRSA NPRC 003R, MRSA NPRC 004R ได้ที่ MIC 512 µg/mL ยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐานที่ใช้ คือ chloramphenicol ซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 2-256 µg/mL (ตารางที่ 12)

สารสกัดจากเชื้อ P0915 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* PSU 95, *S. Typhimurium* PSU 101, *Acinetobacter baumannii* AB 045, *P. aeruginosa* PA 3, PA 8, PA 10, PA 14, ในช่วงความเข้มข้นสูงสุดของสารเท่ากับ 1,024 µg/mL

การสกัดสารจาก P0915 ด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ คือ Hexane (การสกัดใช้วิธีเดียวกับการสกัดด้วย ethyl acetate) methanol, methanol ผสม chloroform (1:1) (ดูวิธีการสกัดในภาคผนวก ข. วิธีการสกัดด้วย methanol และ methanol ผสม chloroform) สารที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดเมื่อนำไปหาค่า MIC พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ แสดงว่าตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถแยกสารต้านจุลชีพออกมาจากตัวอย่าง P0915 ได้ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของ P0915 cell suspension  
โดยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)											
	AB 045	PA 3	PA 8	PA 10	PA 14	BS	MRSA1	MRSA2	MRSA3	MRSA4	SA 25923	SA 29213
P0915	16.3	16.6	16.5	18.3	19.2	14.8	13.3	14.4	16.3	14.9	19.4	18.7

AB= *Acinetobacter baumannii* AB 045

PA 3=*Pseudomonas aeruginosa* PA 3

PA 8=*Pseudomonas aeruginosa* PA 8

PA 10= *Pseudomonas aeruginosa* PA 10

PA 14=*Pseudomonas aeruginosa* PA 14

BS =*Bacillus subtilis*

MRSA1=Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 001R

MRSA2=Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 002R

MRSA3=Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 003R

MRSA4= Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 004R

SA 25923 =*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

SA 29213=*Staphylococcus aureus* ATCC 29213

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพของสารสกัด ethyl acetate ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ  
P0915 culture

แหล่งที่มาของสารสกัด	ขนาด inhibition zone (mm)						
	<i>V. parahaemolyticus</i> PSU 1681	<i>E. coli</i> PSU 95	<i>S. Typhimurium</i> PSU 101	<i>S. aureus</i> PSU106	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Aspergillus</i> sp. F33	<i>Aspergillus</i> sp. F36
freeze dried cell free supernatant	-	-	-	-	-	-	-
whole cell pellets	-	-	-	9.0	-	-	-
cell suspension	14.3	11.0	11.0	13.0	13.7	-	-
freeze dried cell suspension	9.9	-	-	9.4	1.0	-	-
control DMSO	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ; - = ไม่มีวงใส

ตารางที่ 12 ค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดจาก cell suspension ของไอโซเลท P0915 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

จุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ ในการทดสอบ	ค่า MIC และ MBC/MFC (µg/mL) ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ											
	Methanol		Methanol + chloroform		Hexane		Ethyl Acetate		Chloramphenicol		Amphotericin B	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC
VP	-	-	-	-	-	-	512	-	2	8	NT	NT
EC	-	-	-	-	-	-	-	-	4	16	NT	NT
ST	-	-	-	-	-	-	-	-	4	32	NT	NT
SA	-	-	-	-	-	-	512	1,024	8	32	NT	NT
SA 25923	-	-	-	-	-	-	512	1,024	16	32	NT	NT
SA 29213	-	-	-	-	-	-	256	1,024	16	32	NT	NT
MRSA1	-	-	-	-	-	-	256	1,024	256	-	NT	NT
MRSA2	-	-	-	-	-	-	256	-	256	-	NT	NT
MRSA3	-	-	-	-	-	-	512	1,024	32	-	NT	NT
MRSA4	-	-	-	-	-	-	512	1,024	32	-	NT	NT

VP = *Vibrio parahaemolyticus* PSU 1681

EC = *Escherichia coli* PSU 95

ST = *Salmonella* Typhimurium PSU 101

SA = *Staphylococcus aureus* PSU 106

SA 25923 = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

หมายเหตุ; - หมายถึง ไม่ยับยั้ง

NT หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

SA 29213 = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

MRSA1 = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 001R

MRSA2 = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 002R

MRSA3 = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 003R

MRSA4 = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* NPRC 004R

ตารางที่ 12 (ต่อ) ค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดจาก cell suspension ของไอโซเลท P0915 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

จุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ ในการทดสอบ	ค่า MIC และ MBC/MFC ( $\mu\text{g/mL}$ ) ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ												
	Methanol		Methanol + chloroform		Hexane		Ethyl Acetate		Chloramphenicol		Amphotericin B		
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MFC	
AB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	256	-	NT	NT
PA 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	256	-	NT	NT
PA 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	256	-	NT	NT
PA 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	256	-	NT	NT
PA 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	256	-	NT	NT
BS	-	-	-	-	-	-	256	512	4	8	NT	NT	
F33	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	2	2	
F36	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	4	6	

PA 3 = *Pseudomonas aeruginosa* PA 3

PA 8 = *Pseudomonas aeruginosa* PA 8

PA 10 = *Pseudomonas aeruginosa* PA 10

PA 14 = *Pseudomonas aeruginosa* PA 14

หมายเหตุ; - หมายถึง ไม่ยับยั้ง

NT หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

AB = *Acinetobacter baumannii* AB 045

BS = *Bacillus subtilis*

F33 = *Aspergillus* sp. F33

F36 = *Aspergillus* sp. F36

จากผลการทดสอบที่ได้ทำให้เห็นว่า ไอโซเลท P0915 มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถยับยั้ง MRSA ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่ดื้อยาได้ จึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยการนำ P0915 ไปทดสอบการยับยั้งราก่อโรคพืช และ ไชยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8305 ซึ่งมีผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13 – 15

### 3.8 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยวิธี agar well diffusion

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคพืชโดยวิธี agar well diffusion พบว่า P0915 สามารถยับยั้ง *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นราก่อโรคในลำต้นและรากเน่าในทุเรียนและพืชอื่นๆ โดยมี ค่า inhibition zone เท่ากับ 12.1 mm แต่ไม่สามารถยับยั้งราก่อโรคอื่นๆที่นำมาทดสอบเพิ่มเติมได้ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ผลการยับยั้งราก่อโรคในพืชของ P0915 cell suspension โดยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)

ไอโซเลท	ขนาด inhibition zone (mm)							
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Phytophthora botryosa</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Rigidoporus microporus</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
P0915	-	-	-	12.1	-	-	-	-

<i>Sclerotium rolfsii</i>	ก่อโรค รากเน่า
<i>Pythium aphanidermatum</i>	ก่อโรค เน่าคอดินหรือเน่าระดับดิน
<i>Magnaporthe grisea</i>	ก่อโรค ไหม้ที่คอรวงในข้าว
<i>Phytophthora palmivora</i>	ก่อโรค ลำต้นและรากเน่าในทุเรียนและพืชอื่นๆ
<i>Phytophthora botryosa</i>	ก่อโรค ลำต้นและรากเน่าในทุเรียนและพืชอื่นๆ
<i>Ganoderma lucidum</i>	ก่อโรค ยางพารา, ชา, ปาล์มน้ำมัน
<i>Rigidoporus microporus</i>	ก่อโรค รากขาวในยางพารา
<i>Rhizoctonia solani</i>	ก่อโรค โรคในพืชตระกูลถั่ว



### 3.9 ผลการทดสอบความสามารถของ P0915 ในการยับยั้งไซยาโนแบคทีเรีย

#### *M. aeruginosa* TISTR 8305 โดยวิธี microdilution method

ผลทดสอบความสามารถ P0915 ในการยับยั้งไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8305 โดยวิธี microdilution method พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์สาหร่ายร่วมกับ P0915 เซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 มีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ control ซึ่งมี *M. aeruginosa* TISTR 8305  $1.15 \times 10^5$  cells/mL เมื่อใช้ P0915 ที่ความเข้มข้น  $10^8$  CFU/mL นับเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ที่เหลือได้  $2.8 \times 10^4$  cells/mL เซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของ P0915 และที่  $10^8$  CFU/mL นับเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ได้  $1.5 \times 10^3$  cells/mL ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ที่ทำการทดสอบกับปริมาณเซลล์ของ P0915 ที่  $10^8$  CFU/mL กับ control ที่มีเซลล์อยู่  $1.15 \times 10^5$  cells/mL พบว่า เซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ลดลงไป 98.69% ซึ่งถือว่า ปริมาณเซลล์ของ P0915 ที่  $10^8$  CFU/mL (ตารางที่ 14) สามารถทำลายเซลล์สาหร่ายได้เกือบทั้งหมด โดย *M. aeruginosa* TISTR 8305 มีลักษณะการถูกทำลายที่ผนังเซลล์และพบเศษซากเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8305 เป็นจำนวนมาก ดังแสดงในรูปที่ 3

### 3.10 ผลการทดสอบความสามารถของสารสกัด ethyl acetate จาก P0915

#### cell suspension ในการยับยั้ง *M. aeruginosa* TISTR 8305 โดยวิธี microdilution method

จากผลการทดสอบความสามารถของสารสกัด ethyl acetate จาก P0915 cell suspension ในการยับยั้ง *M. aeruginosa* TISTR 8305 ที่ทดสอบโดยวิธี microdilution method พบว่า *M. aeruginosa* TISTR 8305 เริ่มต้นที่  $2.80 \times 10^6$  cells/mL เมื่อเติมสารสกัด ethyl acetate จาก P0915 cell suspension  $500 \mu\text{g/mL}$  เซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ลดลงเหลือ  $4.7 \times 10^4$  cells/mL ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ control ซึ่งนับเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ได้  $1.15 \times 10^5$  cells/mL แสดงว่าเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ลดลงไปหนึ่ง log และที่ความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้น เซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 มีจำนวนลดลงไปเรื่อยๆตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้นและที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ  $4,500 \mu\text{g/mL}$  พบว่าเซลล์สาหร่ายเหลืออยู่  $7.0 \times 10^3$  cells/mL ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ  $4,500 \mu\text{g/mL}$  กับ control (ตารางที่ 15) พบว่า เซลล์สาหร่ายลดลงไป 93.91% และพบเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 มีรูปร่างที่ผิดปกติเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ SEM ดังแสดงในรูปที่ 3

ตารางที่ 14 ผลการยับยั้ง *M. aeruginosa* TISTR 8305 ของไอโซเลท P0915 ที่  
ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังเลี้ยงร่วมกันที่ 30°C เป็นเวลา 3 วัน

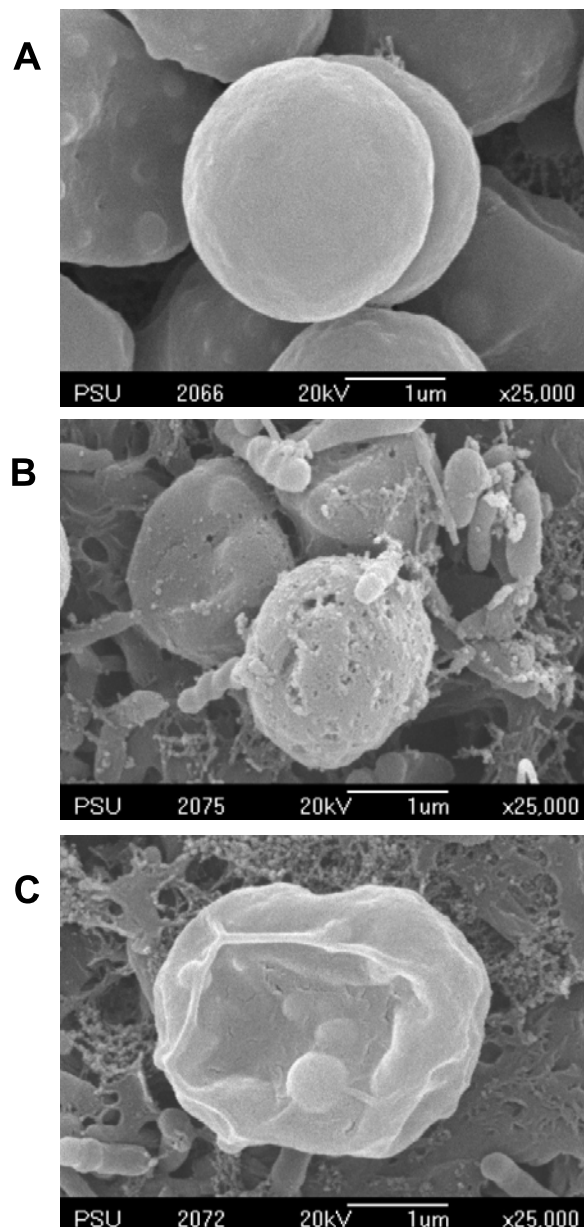
ปริมาณเชื้อ P0915 (CFU/mL)	ปริมาณเซลล์ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8305 คงเหลือ (cells/mL)
0= ชุดควบคุม	$1.15 \times 10^5$
$10^1$	$2.8 \times 10^4$
$10^2$	$2.0 \times 10^4$
$10^3$	$1.8 \times 10^4$
$10^4$	$1.3 \times 10^4$
$10^5$	$8.3 \times 10^3$
$10^6$	$6.3 \times 10^3$
$10^7$	$9.5 \times 10^3$
$10^8$	$1.5 \times 10^3$

หมายเหตุ ; เซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 เริ่มต้น  $2.80 \times 10^6$  cells/mL

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบสารสกัด ethyl acetate ของ cell suspension ของไอโซเลท  
P0915 ในการยับยั้ง *M. aeruginosa* TISTR 8305

ความเข้มข้นของ สารสกัด ( $\mu\text{g/mL}$ )	ปริมาณเซลล์ <i>M. aeruginosa</i> TISTR 8305 คงเหลือ ( cells/mL)
0= ชุดควบคุม	$1.15 \times 10^5$
500	$4.7 \times 10^4$
1,500	$2.0 \times 10^4$
2,500	$1.1 \times 10^4$
3,500	$1.9 \times 10^4$
4,500	$7.0 \times 10^3$

หมายเหตุ ; เซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 เริ่มต้น  $2.80 \times 10^6$  cells/mL



**รูปที่ 3** ลักษณะเซลล์ปกติและเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงภายใต้กล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) หลังจากการเลี้ยงร่วมกับไอโซเลท P0915 ( $10^8$  CFU/mL) เป็นเวลา 3 วันและหลังการเติมสารสกัด ethyl acetate ของ cell suspension ของไอโซเลท P0915 ( $4,500 \mu\text{g/mL}$ ) เป็นเวลา 3 วัน

- A. เซลล์ปกติของไซยาโนแบคทีเรียในชุดควบคุม (x25,000)
- B. เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการเลี้ยงร่วมกับไอโซเลท P0915 (x25,000)
- C. เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงหลังการเตรียมสารสกัดสารสกัด ethyl acetate ของ cell suspension ของไอโซเลท P0915 (x25,000)

### 3.11 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท P0915

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท P0915 โดยใช้ API ZYM Kit (by Biomerieux) พบว่า ไอโซเลท P0915 สามารถผลิตเอนไซม์ 11 ชนิด จากที่ทดสอบทั้งหมด 19 ชนิด แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ phosphatase, lipase, arylamidase, trypsin, phosphohydrolase, glucosaminidase โดยที่ไอโซเลท P0915 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 5 กลุ่ม (ตารางที่ 16, รูปที่ 4)

ตารางที่ 16 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลท P0915 ด้วย API ZYM Kit

No.	ENZYME ASSAYED FOR	results
1.	Control	-
2.	Alkaline phosphatase	>5
3.	Esterase (C 4)	3
4.	Esterase Lipase (C 8)	2
5.	Lipase (C 14)	1
6.	Leucine arylamidase	5
7.	Valine arylamidase	1
8.	Cystine arylamidase	1
9.	Trypsin	0
10.	$\alpha$ -chymotrypsin	1
11.	Acid phosphatase	5
12.	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	5
13.	$\alpha$ -galactosidase	0
14.	$\beta$ -galactosidase	0
15.	$\beta$ -glucuronidase	0
16.	$\alpha$ -glucosidase	0
17.	$\beta$ -glucosidase	0
18.	N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	2
19.	$\alpha$ -mannosidase	0
20.	$\alpha$ -fucosidase	0

หมายเหตุ; สามารถเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแผนภูมิที่ 6 (ภาคผนวก ข)



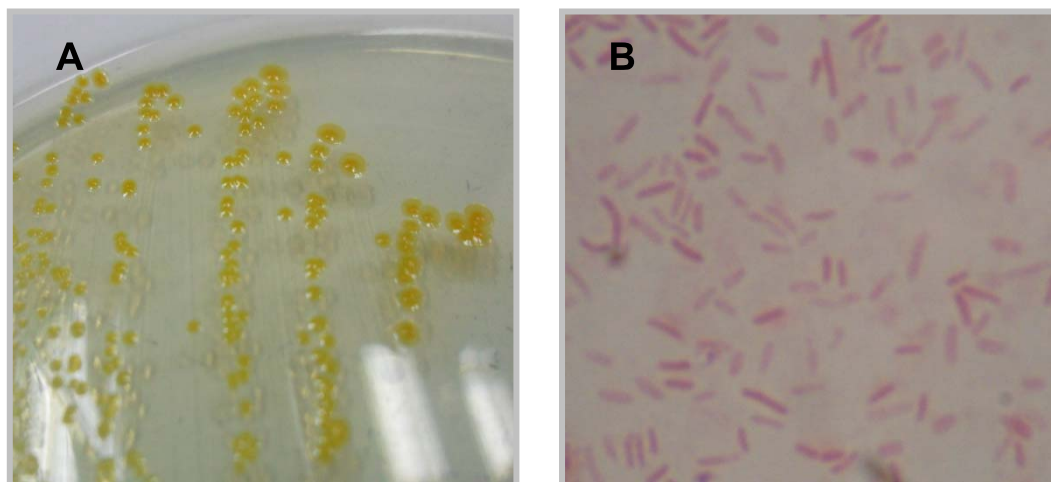
รูปที่ 4 แถบทดสอบเอนไซม์ API ZYM Kit

A. ชุดควบคุม ทดสอบกับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

B. ชุดทดสอบกับไอโซเลท P0915 cell suspension

### 3.12 ผลการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

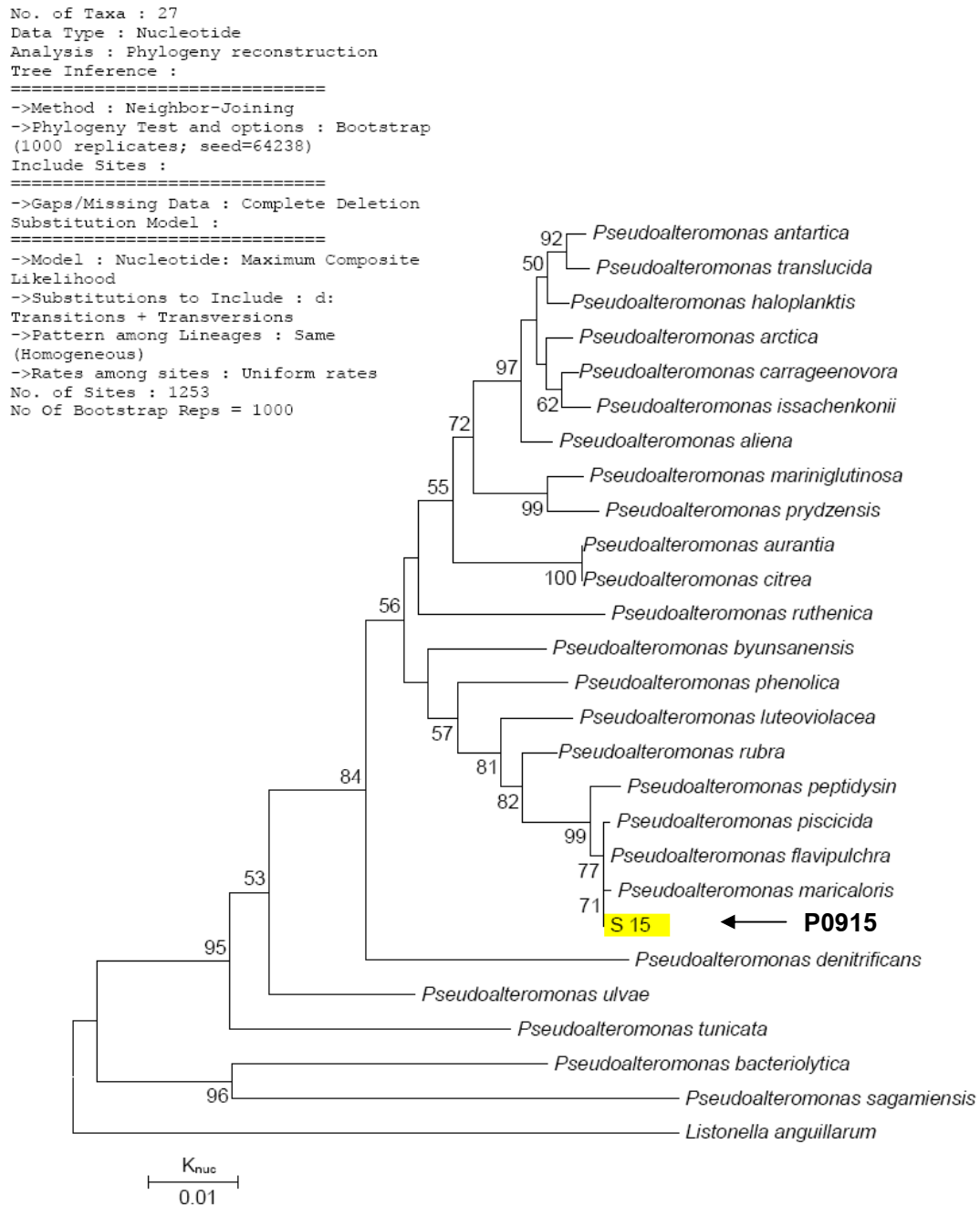
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นเพื่อบ่งชี้ชนิดของไอโซเลท P0915 พบว่า ไอโซเลท P0915 มีโคโลนีสีเหลืองบนอาหาร ASW agar และเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (รูปที่ 5) ผลการบ่งชี้ชนิดของไอโซเลท P0915 โดยการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลด้วย 16S rRNA analysis ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) พบว่าลำดับเบสของ 16S rRNA gene ของ ไอโซเลท P0915 มีความเหมือนกับ *Pseudoalteromonas flavipulchra* 99.9 % (รูปที่ 6)



รูปที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท P0915 บนอาหาร ASW agar และเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

A. ลักษณะโคโลนีของไอโซเลท P0915 บนอาหาร ASW agar

B. ลักษณะของไอโซเลท P0915 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (x100)



รูปที่ 6 Phylogenic Tree แสดงตำแหน่งไอโซเลท P0915 ใน genus *Pseudoalteromonas* ที่ได้ทำการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (16S rRNA analysis) (ภาคผนวก ค)



## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียทั้งหมด 514 ไอโซเลท โดยสามารถแยกแบคทีเรียแกรมลบได้ 299 ไอโซเลท (58%) และแยกแบคทีเรียแกรมบวกได้ 215 ไอโซเลท (42%) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fenical and Jensen (1993) ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมลบได้เป็นกลุ่มหลักจากทะเล ส่วน Bernen *et al.* (1997) รายงานว่า 36 % ของแบคทีเรียที่สามารถแยกได้เป็น แกรมลบ รูปแท่งที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จากแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างที่ต่างกันไป มี 29 ไอโซเลท (5.64 %) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวก แกรมลบและรา ทดสอบโดยใช้ culture suspension ด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งถือได้ว่ามีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ Wilson *et al.* (2009) ที่สามารถแยกแบคทีเรียทะเลที่ยึดเกาะพื้นผิวที่มีฤทธิ์ยับยั้งด้วยวิธี well diffusion โดย 9.6% ของแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ ซึ่งจากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าเราสามารถทำการแยกแบคทีเรียจากสิ่งมีชีวิตต่างๆในทะเลได้ซึ่งนั่นบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ ของการอยู่ร่วมกันระหว่าง แบคทีเรียกับ host ในทะเล สิ่งมีชีวิตในทะเลส่วนใหญ่จะมีแบคทีเรียที่มีความหลากหลายยึดเกาะที่พื้นผิว (Rohwer *et al.*, 2002) ซึ่งแบคทีเรียที่เกาะติดบนพื้นผิวของสิ่งมีชีวิตอื่นจะมีความสามารถในการหลั่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่าแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตแบบอิสระ (Burgess *et al.*, 1999; Long and Azam, 2001; Lemos *et al.*, 1985; Zheng *et al.*, 2005) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียยึดเกาะพวกนี้ต้องผลิตสารต่างๆ ออกมาเพื่อยับยั้งคู่แข่งที่จะแย่งพื้นที่ในการสร้างโคโลนีบนตัว host (Thomas *et al.*, 2008)

ปัญหาหลักที่พบในการศึกษานี้คือแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีฤทธิ์ยับยั้งน้อยลงและทำการเลี้ยงเชื้อใหม่ไม่ขึ้น ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากแบคทีเรียเหล่านี้ทำการคัดแยกมาจากทะเล จึงมีข้อจำกัดในเรื่องสารอาหารและสภาวะแวดล้อมที่ใช้เลี้ยง กอปรกับแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่กันเป็นชุมชนในแบบ symbiotic ระหว่างแบคทีเรียด้วยกันหรือแบคทีเรียกับ host (Friedrich *et al.*, 1999) เมื่อทำการแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ จึงไม่มีการปฏิสัมพันธ์กันในรูปแบบดังกล่าวอีก จึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องผลิตสารยับยั้งออกมาและบางสายพันธุ์อาจไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ โดยที่ไม่ปฏิสัมพันธ์กับสายพันธุ์หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่ก็ยังมีแบคทีเรีย 1 ไอโซเลทนั่นคือ ไอโซเลท P0915 ที่แยกได้จากเพรียงที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่โดดเด่นกว่าไอโซเลทอื่นๆ ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบทั้งแกรมบวก แกรมลบและร่าก่อโรคและยังมีความคงตัวของฤทธิ์ยับยั้งอีกด้วย จึงได้มีการเพิ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบขึ้นโดยทำการทดสอบกับแบคทีเรียดี้อย่า เช่น MRSA, *Acinetobacter baumannii* (สายพันธุ์ดี้อย่า), *P. aeruginosa* (สายพันธุ์ดี้อย่า) และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน และร่าก่อโรคพีชอีกด้วย ผล

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคเพิ่มเติมดังกล่าวด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า ไอโซเลท P0915 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทุกสายพันธุ์ทั้งแกรมลบ และแกรมบวก และสามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 1 สายพันธุ์คือ *Phytophthora palmivora* แต่ไม่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชสายพันธุ์อื่นๆ ได้

ถึงแม้ว่า cell suspension ของ P0915 จะมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลาย แต่เมื่อนำ cell free supernatant มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์กลับพบว่า P0915 มีกิจกรรมลดลงมาก เมื่อเทียบกับการทดสอบด้วย cell suspension ซึ่งเป็นไปได้ว่า cell suspension มีตัวเซลล์ เซลล์เหล่านั้นสามารถสร้างสารได้ตลอดเวลาทำให้มีปริมาณสารมากกว่า cell free supernatant

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์แบบ agar well diffusion จัดเป็นการทดลองเบื้องต้นเท่านั้น ผลที่ได้ อาจจะไม่แม่นยำและไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งที่แท้จริงได้ จึงนำไปสู่การสกัดสารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เพื่อหาค่า MIC, MBC และ MFC ผลการสกัดสารจาก P0915 cell suspension ด้วย ethyl acetate เพื่อนำไปทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC โดยวิธี broth micro-dilution กับเชื้อทดสอบทั้งหมดข้างต้นและราก่อโรคพืชเนื่องจาก P0915 ไม่สามารถยับยั้งได้ ส่วน *Phytophthora palmivora* มีขนาดวงใสที่แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งที่น้อย จึงไม่ได้ทำการทดสอบหาค่า MIC และ MFC ซึ่งเมื่อนำสารสกัด ethyl acetate ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 2-1,024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  มาทดสอบกับเชื้อทดสอบพบว่า สารสกัด ethyl acetate สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมด 9 สายพันธุ์ จากจุลินทรีย์ทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ที่นำมาทำการทดสอบด้วยวิธี broth micro-dilution โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 8 สายพันธุ์คือ *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* PSU 106, MRSA NPRC 001R-004R, *B. subtilis* และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ 1 สายพันธุ์คือ *V. parahaemolyticus* PSU 1681 โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 256-512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สารสกัด ethyl acetate จากเชื้อ P0915 cell suspension ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* PSU 95, *S. Typhimurium* PSU 101, *Acinetobacter baumannii* AB 045, *P. aeruginosa* PA 3, PA 8, PA 10, PA 14 ในช่วงความเข้มข้นสูงสุดของสารที่ 1,024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ซึ่งจะเห็นได้ว่าการทดสอบด้วยวิธี broth micro-dilution ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์บางส่วนหายไปเมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion จากทั้งสองวิธีมีผลสอดคล้องกันในส่วนของฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวกซึ่ง P0915 แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีเมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion และยังคงพบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี broth micro-dilution

ไอโซเลท P0915 เป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเหลืองใส เมื่อดูภายใต้กล้องเป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมลบ ซึ่งเมื่อนำไปบ่งชี้ชนิดโดยการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (16 rDNA analysis) พบว่า ไอโซเลท P0915 มีความเหมือนกับ *Pseudoalteromonas flavipulchra* 99.9 % ซึ่ง

แบคทีเรียชนิดนี้พบบ่อยๆว่ามีความเกี่ยวข้องกับ host ที่เป็นยูคาริโอต มักเป็นพวกที่ต้องการอากาศ มีแฟลกเจลลาและเป็นพวก heterotroph (Holmstrom *et al.*, 1999) ในการศึกษาของ Thomas *et al.* (2008) เกี่ยวกับจีโนมของแบคทีเรียในจินัสเดียวกันคือ *Pseudoalteromonas tunicata* พบว่ามีการสร้างโคโลนีบนพื้นผิว eukaryotic host เช่น สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลและสาหร่าย ซึ่งเป็นเรื่องปกติที่เกิดขึ้นในทะเล ที่คาดว่าจะเป็นการสร้างแข่งขันหรือเพื่อการปฏิสัมพันธ์กับแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่ง *Pseudoalteromonas tunicata* เป็นสายพันธุ์ที่แข่งขันกับสายพันธุ์อื่นๆ ได้ดี ในการครอบครองพื้นผิวต่างๆ ในทะเล เนื่องจากความสามารถในการผลิตโมเลกุลสารยับยั้งได้ จึงกลายเป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในการศึกษากระบวนการสร้างโคโลนีบนพื้นผิว eukaryotic host และการมีปฏิสัมพันธ์กับ eukaryotic host จึงต้องทำการหาลำดับเบสและทำการวิเคราะห์จีโนมของ *Pseudoalteromonas tunicata* และเปรียบเทียบกับจีโนมของสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด เพื่อให้เข้าใจถึงการปรับตัวที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตแบบยึดเกาะบนพื้นผิว พบว่า *Pseudoalteromonas tunicata* มีจีโนมที่ประกอบไปด้วยยีนส์หลายยีนส์และเป็นยีนส์ที่มีส่วนร่วมในการผลิตสารยับยั้งคู่แข่งบนพื้นผิว คุณลักษณะการตอบสนองความเครียด แบบ oxidative ของ *Pseudoalteromonas tunicata* การขับไอออน และแสดงการเข้ายึดครองสารอาหาร ซึ่งสิ่งมีชีวิตจะปรับตัวแบบนี้ก็ต่อเมื่อมีความหนาแน่นของประชากรสูงบนพื้นผิว การเกาะติดบนพื้นผิวดูเหมือนว่าจะมีสื่อกลาง เช่น curli, novel pili, โพลีเมอร์ที่ถูกปล่อยออกมาข้างนอกและอื่นๆ เช่น โปรตีนที่ผิวเซลล์ จีโนมของ *Pseudoalteromonas tunicata* แสดงให้เห็นรูปแบบการใช้ประโยชน์จากสารโพลีเมอร์เพื่อหลีกเลี่ยงการย่อยจาก host ในขณะที่สารนั้นๆ อาจจะไปมีผลต่อ host ชนิดอื่นๆ

ที่ผ่านมามีผู้ศึกษาพบว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในจินัสนี้ สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Gauthier *et al.*, 1995; Gauthier, 1976; Gauthier and Breittmayer, 1979; Hanefeld *et al.*, 1994; Holmstrom and Kjelleberg, 1999; James *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 1985) แม้กระทั่งในปัจจุบันมีผู้ศึกษาและพบว่าแบคทีเรียในจินัสนี้มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น พบว่าสารสกัดจาก *Pseudoalteromonas phenolica* มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus*, *B. subtilis*, *Enterococcus serolicida*, *V. alginolyticus*, *P. aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* ได้ (Isnansetyo and Kamei, 2009) ขณะที่ Longeon *et al.* (2004) ได้ทำการคัดแยก *Pseudoalteromonas* sp. X153 ที่สามารถยับยั้ง *Vibrio* sp. และเชื้อก่อโรคในมนุษย์ได้ และมีการแยก *P. luteoviolacea* ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีโมเลกุลใหญ่จากทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (Gómez *et al.*, 2008) ส่วน Hayashida *et al.* (2008) สามารถแยก *P. haloplanktis* ได้จากหอยเชลล์ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทะเล 6 สายพันธุ์ และแบคทีเรียก่อโรคอีก 9 สายพันธุ์ จากรายงานดังกล่าวพบว่ามีผลสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ด้วยเนื่องจาก *Pseudoalteromonas flavipulchra* P0915 ก็สามารถยับยั้ง

จุลินทรีย์ในจลิน์ข้างต้นได้เช่นกัน และจากการศึกษาของ Bowman (2007) พบว่า แบคทีเรียในจลิน์ *Pseudoalteromonas* sp. สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ได้หลายกลุ่มทั้งที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ และขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น toxic proteins, polyanionic exopolymers, สารกลุ่ม phenolic, สารประกอบกลุ่ม alkaloids, cyclic peptides และสารประกอบ bromine เป็นต้น จากการศึกษาของ Yu *et al.* (2012) พบว่าสารสกัด ethyl acetate ของเชื้อ *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1 เป็นโปรตีนโมเลกุลเล็กซึ่งแยกสารสกัดดังกล่าวได้ 5 ส่วน ประกอบไปด้วย *p*-hydroxybenzoic acid (Niu *et al.*, 2003), *trans*-cinnamic acid (Yang *et al.*, 2000) 6-bromoindolyl-3-acetic acid (Rasmussen *et al.*, 1993), *N*-hydroxybenzoisoxazolone (Kuberski and Gebicki, 1992) และ 29-deoxyadenosine (Shi *et al.*, 2009) ซึ่งก็มีรายงานการค้นพบสารดังกล่าวก่อนหน้านี้เช่นกัน โดยสารสกัดดังกล่าวที่ Yu *et al.* (2012) แยกได้นั้น มีฤทธิ์ยับยั้ง *V. anguillarum* ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารสกัด ethyl acetate ในการศึกษาในครั้งนี้ อาจจะเป็นโปรตีนโมเลกุลเล็กที่มีความใกล้เคียงกับสารที่ Yu *et al.* (2012) แยกได้ เพราะสามารถยับยั้งเชื้อในจลิน์เดียวกัน นั่นก็คือ *Vibrio* sp. ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* PSU 1681 ได้ และที่มากกว่านั้น ในการศึกษาครั้งนี้ *Pseudoalteromonas flavipulchra* ที่แยกได้ยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ ได้คือด้วย เช่น *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน, *S. aureus* PSU 106, MRSA NPRC 001R-004R และ *B. subtilis* ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งสำหรับแบคทีเรียทะเลชนิดนี้

จากผลของค่า MIC ที่สูงในช่วง 256-512  $\mu\text{g/mL}$  จึงได้มีการทดสอบสกัด P0915 cell suspension เพิ่มเติม โดยใช้ตัวทำละลายอื่นๆ ที่มีขั้วแตกต่างกัน คือ hexane, methanol และ methanol ผสม chloroform (1:1) เพื่อแยกสารต้านจุลินทรีย์ต่างกลุ่มกันจาก cell culture เมื่อนำมาหาค่า MIC พบว่า สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารอยู่ในช่วง 2-1,024  $\mu\text{g/mL}$  ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค ดังนั้นจึงมีเพียง ethyl acetate เพียงชนิดเดียวที่สามารถแยกสารต้านจุลินทรีย์ออกมาจากน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ นอกจากนี้มีการนำสารสกัด ethyl acetate ของ P0915 cell suspension และตัวเชื้อ P0915 มาทำการทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งไซยาโนแบคทีเรีย เพราะถึงแม้ว่าการควบคุมการเพิ่มจำนวนของไซยาโนแบคทีเรีย โดยวิธีการทางเคมีและทางกายภาพจะได้ผลดี แต่ก็ถือได้ว่าเป็นวิธีที่อันตราย ซึ่งสารเคมีอาจจะก่อให้เกิดผลร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิดในน้ำ ทำให้ระบบนิเวศในน้ำเปลี่ยนแปลง และส่งผลกระทบต่อธรรมชาติในที่สุด (Jeong *et al.*, 2003) ตัวแทนทางชีวภาพซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรีย (Mayali and Azam, 2004) ไวรัส (Nagasaki *et al.*, 2004) โปรโตซัว (Jeong *et al.*, 2003) และ macrophyte (Jin and Dong, 2003; Nakai *et al.*, 1999) ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ถือเป็น suppressors ที่มีศักยภาพในการควบคุมการระบาดของไซยาโนแบคทีเรียได้ จึงมีความสนใจที่จะนำ ไอโซเลท P0915 มาทำการยับยั้งไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากมีความเป็นไปได้สูงที่จะ

นำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้เพราะแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวแยกมาได้จากทะเล ซึ่งเป็นสิ่งแวดล้อมปกติที่จะเกิดปัญหาการแพร่กระจายของไซยาโนแบคทีเรียขึ้น ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ ไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ซึ่ง *M. aeruginosa* เป็นไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่โดดเด่นที่เกิดการแพร่กระจายเพิ่มปริมาณขึ้นทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เช่น ในทะเลสาบไท ประเทศจีน ซึ่งส่งผลไปถึงน้ำดื่ม น้ำประปาและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์เนื่องจาก *M. aeruginosa* ก่อให้เกิดสารพิษประเภท hepatotoxins เช่น microcystins (MCs) ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกปล่อยออกมาสู่ธรรมชาติหลังจากเซลล์ *M. aeruginosa* แตกแล้ว (Dai *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2006; Zurawell *et al.*, 2005) ผลการทดสอบพบว่า สารสกัด ethyl acetate ของ P0915 และตัวเชื้อ P0915 สามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียดังกล่าวได้ ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียมักพบว่าอยู่ในกลุ่ม *Myxobacteria*, *Flavobacterium*, *Bacteroidetes*, *Cytophaga*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio* และ *Pseudomonas* ในอดีตมักพบกลุ่มแบคทีเรียเหล่านี้แพร่หลายอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียทะเลและน้ำจืด (Kang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007; Mu *et al.*, 2007; Roth *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2007) ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียจะยับยั้งการเจริญหรือฆ่าสาหร่ายได้ โดยทางตรงและทางอ้อม แต่ส่วนใหญ่แบคทีเรียเหล่านี้จะยับยั้งสาหร่ายโดยการต่อต้านการเจริญหรือทำให้เซลล์สาหร่ายแตก โดยเกิดจากการที่แบคทีเรียจะปล่อยสารประกอบบางอย่างออกมา ซึ่งจะเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่าย สารประกอบเหล่านั้นอาจจะเป็น โปรตีน (Lee *et al.*, 2000; Mitsutani *et al.*, 2001), เปปไทด์ (Banin *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 1998), อะมิโนแอซิด (Yoshikawa *et al.*, 2000), สารปฏิชีวนะ (Dakhama *et al.*, 1993), ไบโอะเซอแฟกแตนท์ (Gustafsson *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005), bacillamide (Jeong *et al.*, 2003), hydroxylamine (Paul *et al.*, 1979), lipid peroxidation (Wang *et al.*, 2008) และอื่นๆ มีเพียง Shi *et al.* (2006) เท่านั้นที่รายงานว่าแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียผ่านการสัมผัสกับเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียโดยตรงหรือการเจาะเข้าสู่เซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย จากผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์ของ P0915 พบว่า P0915 สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม phosphatase, lipase, arylamidase, trypsin, phosphohydrolase และ glucosaminidase ซึ่งความสามารถในการยับยั้ง *M. aeruginosa* TISTR 8305 อาจเกิดจากการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่มีลักษณะผนังเซลล์เหมือนกับทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบซึ่งประกอบด้วย cytoplasmic membrane, serrated external layer, outer membrane, peptidoglycan layer และยังมี cyanobacterial porins ซึ่งเป็นโปรตีนที่ห่อหุ้มอยู่ชั้นนอกอีกด้วย (Hoiczky and Hansel, 2000) เอนไซม์ที่ P0915 ผลิตได้ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่ม phosphatase, lipase, arylamidase, trypsin,

phosphohydrolase, glucosaminidase ซึ่งสามารถใช้ส่วนของผนังเซลล์เหล่านี้เป็น substrate ได้ จึงอาจไปมีผลทำลายองค์ประกอบบางส่วนของผนังเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ทำให้การควบคุมการไหลเข้าออกสารของเซลล์เสียไปไซยาโนแบคทีเรียจึงตายในที่สุด จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าหลังจากการเลี้ยง *M. aeruginosa* TISTR 8305 ร่วมกับ P0915 เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน เมื่อทำการศึกษาเซลล์ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscope หรือ SEM) เห็นได้ชัดเจนว่าผนังเซลล์ของ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ถูกทำลาย

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้จัดทำขึ้น เนื่องจากตระหนักถึงปัญหาโรคติดเชื้อและการดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรค จึงได้ทำการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ จากแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมุ่งเน้นการค้นหาว่าไปที่ทรัพยากรทางทะเล ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียในครั้งนี้ประกอบไปด้วย กัลปังหา, ฟองน้ำ, ปะการัง, เพรียง รวมทั้งสิ้น 26 ตัวอย่าง ใน 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดภูเก็ต, จังหวัดกระบี่, จังหวัดตรัง, จังหวัดสตูล ซึ่งเป็นจังหวัดที่ตั้งอยู่ในแถบชายฝั่งทะเลอันดามันของประเทศไทย โดยสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 514 ไอโซเลท พบแบคทีเรียที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมด 29 ไอโซเลท (5.64 %) และทำการแยกได้ ไอโซเลท P0915 ซึ่งสารสกัด ethyl acetate ของ P0915 cell suspension สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ 8 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* PSU 106, MRSA NPRC 001R-004R, *B. subtilis* และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ 1 สายพันธุ์คือ *V. parahaemolyticus* PSU 1681 โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 256-512 µg/mL และมีค่า MBC อยู่ระหว่าง 512-1,024 µg/mL และยังสามารถยับยั้งไซยาโนแบคทีเรีย *M. aeruginosa* TISTR 8305 ได้ 93.91 % ที่ความเข้มข้นสาร 4,500 µg/mL

ผลการบ่งชี้ชนิดของไอโซเลท P0915 โดยการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล (16 rDNA analysis) สามารถจำแนกชนิดของไอโซเลท P0915 ได้เป็น *Pseudoalteromonas flavipulchra*

#### ปัญหาและข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาโครงสร้างสารออกฤทธิ์ ของ P0915 เพิ่มเติม หากโครงสร้างส่วนที่ออกฤทธิ์เป็นสารตัวใหม่ อาจจะไปปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อลดค่า MIC ลงได้
2. ควรมีการสกัด pigment ของ P0915 เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เนื่องจากมีรายงานว่า pigment ของแบคทีเรีย มีความเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์
3. ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งไซยาโนแบคทีเรียของ P0915 ควรใช้สารอื่น เช่น peptone water ในการเจือจางจุลินทรีย์ทดสอบแทน NSS เนื่องจาก *M. aeruginosa* TISTR 8305 เป็นไซยาโนแบคทีเรีน้ำจืดไม่ทนต่อ NaCl จึงทำให้ผลของชุดควบคุมมีไซยาโนแบคทีเรียลดลงกว่าไซยาโนแบคทีเรียเริ่มต้น

4. ในขั้นตอนการนำไปใช้จริง ควรมีการศึกษาวิธีการเพื่อลดผลกระทบจากสารพิษที่ *M. aeruginosa* TISTR 8305 ปล่อยออกมา เนื่องจาก P0915 มีกลไกในการยับยั้ง *M. aeruginosa* TISTR 8305 โดยการทำให้เซลล์เกิดรู

5. แบคทีเรียทะเลที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้โดยการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและบางไอโซเลทสามารถเพาะเลี้ยงต่อได้แต่มีฤทธิ์การยับยั้งที่น้อยลง ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้เลี้ยงในห้องปฏิบัติการกับสภาวะในทะเลมีความแตกต่างกัน กอปรกับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียทะเลส่วนใหญ่จะอยู่ร่วมกันเป็นชุมชน เมื่อแยกออกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แบคทีเรียจึงสูญเสียความสัมพันธ์ในรูปแบบดังกล่าวไป บางส่วนจึงไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ และ บางส่วนที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่อไม่มีการปฏิสัมพันธ์กับสายพันธุ์อื่นจึงไม่มีความจำเป็นต้องการผลิตสารบางอย่างที่มีความจำเป็นจะต้องใช้ในการอยู่ร่วมกันเป็นชุมชน



## เอกสารอ้างอิง

- ศักดิ์อนันต์ ปลาทอง, ศุภะสิทธิ์, บุญเพียรผล และพงศ์ธีระ บัวเพชร. ชีววิทยาและการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมที่ได้รับผลกระทบจากคลื่นสึนามิ. สืบค้นจาก <http://www.sc.psu.ac.th/units/cbipt/Document/crab%20paper/Re-reef.doc>; 4 February, 2010.
- ศิรินุช ต้วงสุข. 2550. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางพารา. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- สิตา ปรีदानนท์. 2551. การคัดเลือกและการจำแนกชนิดของเชื้อราที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จากกัลปังหา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- สุเมตต์ ปุจฉาการ, สุชา มั่นคงสมบูรณ์, ธิดารัตน์ น้อยรักษา, พิชัย สนแจ้ง. 2547. การศึกษาความหลากหลายของชนิดสัตว์ทะเลในแนวปะการังในภาคตะวันออก (จังหวัดชลบุรี). หน่วยวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์. 2551. การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อราและเอนไซม์เซลลูเลสจากกัลปังหาและปะการัง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Aceret, J.C., Coll, Y.U. and Paul, W.S. 1998. Antimicrobial activity of the diterpenes flexibilide and sinularioidide derived from *Sinularia flexibilis* Quoy and Gaimard 1833 (Coelenterata: Alcyonacea, Octocorallia). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 120: 121–126.
- Alker, A.P., Smith, G.W. and Kim, K. 2001. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan coral. *Hydrobiology*. 460: 105-111.

- Al-Zereini, W. 2006. Natural products from marine bacteria. Ph.D thesis, Universität Kaiserslautern Alemania.
- Anand, T., Abdul, W.B., Yogesh, S., Shouche, U.R., Jay, S. and Siddhartha, P.S., 2005. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*. 16: 252-262.
- Banin, E., Khare, S.K., Naider, F. and Rosenberg, E. 2001. Proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of Zooxanthellae. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1536–1541.
- Bernen, V.S., Greenstein, M. and Maiese, W.M., 1997. Marine microorganisms as a source of new natural products. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 43. Academic Press, New York, pp. 57–90.
- Bowman, J.P. 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs*. 5: 220–41.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. and Noller, H.F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 148: 107-127.
- Blunt, J.W., Copp, B.R.M., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2004. Marine natural products. *Natural Product Reports*. 21: 1-49.
- Burgess, J.G., Jordan, E.M., Bregu M., Mearns-Spragg, A. and Boyd, K.G. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology*. 70: 27–32.
- Chelossi, E., Milanese, M., Milano, A., Pronzato, R. and Riccardi, G. 2004.

- Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 309: 21-33.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard. CLSI documents M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition. CLSI documents M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- Colwell, R.R. 2002. Fulfilling the promise of biotechnology. *Biotechnology Advances*. 20: 215-228.
- Dakhama, A., Delanou, E.J. and Lavoie, M.C. 1993. Isolation and identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*. 5: 297–306.
- Dai, R., Liu, H., Qu, J., Ru, J. and Hou, Y. 2008. Cyanobacteria and their toxins in Guanting Reservoir of Beijing, China. *Journal of Hazardous Materials*. 153(1–2): 470–477.
- Donia, M. and Hamann, M.T. 2003. Marine natural product and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Oncology*. 3: 338–348.
- Ely, R., Supriya, T. and Naik, C.G. 2004. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 309: 121– 127.

- Fenical, W. and Jensen, P.R. 1993. Marine microorganisms: A new Biomedical Resource. In: Attaway, D.H. and Zaborsky, O.R. (Eds.), Marine Biotechnology, Vol. I. Pharmaceutical and bioactive natural products, Plenum press, New York, pp. 500.
- Friedrich, A.B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P. and Hentschel, U. 1999. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina caverniucola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Marine Biology*. 134: 461–470.
- Galeno, E. and Martínez, A. 2006. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Columbian Caribbean region. *Activite natimicrobienne des éponges marines du Golfe d'Urá, region des Caraïbes Colombiennes*. *Journal of Medical Mycology*. 17: 21-14.
- Gandhimathi, M., Arunkumar, J., Selvin, T., Thangavelu, S., Sivaramakrishnan, G.S., Kiran, S. and Shanmughapriya, K.N. 2008. Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *Journal of Medical Mycology*. 18: 16-22.
- Gauthier, G., Gauthier, M. and Christen, R. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequence and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combination. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45: 755–761.
- Gauthier, M. J. 1976. *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26: 459-466.
- Gauthier, M. J. and Breittmayer, V. A. 1979. A new antibiotic-producing bacterium from seawater: *Alteromonas aurentia* sp. nov. *International Journal of Systematic*

Bacteriology. 29: 366–372.

Groombridge, B. (Ed.). 1992. Global Biodiversity: status of the Earth's living resources. A report compiled by the World Conservation Monitoring Centre, Chapman and Hall.

Gómez, D., Espinosa, E., Bertazzo, M., Lucas, G.P., Solano, F. and Sanchez, A.A. 2008. The macromolecule with antimicrobial activity synthesized by *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strains is an L-amino acid oxidase. Applied Microbiology and Biotechnology. 79: 925–930.

Gustafsson, S., Hultberg, M., Figueroa, R.I. and Rengefors, K. 2009. On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations. Harmful Algae. 8: 857-863.

Hanefeld, U., Floss, H.G. and Laatsch, H. 1994. Biosynthesis of the marine antibiotic pentabromopseudilin. 1. The benzene ring. Journal of Organic Chemistry. 59: 3604–3608.

Hayashida, K., Sano, M., Ohsawa, I., Shinmura, K., Tamaki, K., Kimura, K., Endo, J., Katayama, T., Kawamura, A., Kohsaka, S., Makino, S., Ohta, S., Ogawa, S. and Fukuda, K. 2008. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. Biochemical and Biophysical Research Communications. 373(1): 30-35

Hoiczky, E. and Hansel, A. 2000. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. Journal of Bacteriology. 182(5): 1191-1199.

Holmstrom, C. and Kjelleberg, S. 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiology Ecology. 30: 285–293.

Imamura, O., Fujita, K., Shimamoto, A., Tanabe, H., Takeda, S., Furuichi, Y. and

- Matsumoto, T. 2001. *Oncogene*, 20, 1143–1151.
- Isnansetyo, A. and Kamei, Y. 2009. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of MC21-B, an antibacterial compound produced by the marine bacterium *Pseudoalteromonas phenolica* O-BC30T. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34: 131-135.
- James, S., Holmsstro, C.M. and Kjelleberg, S. 1996. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2783–2788.
- Jeong, S.Y., Ishida, K., Ito, Y., Okada, S. and Murakami, M. 2003. Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *Tetrahedron Letters*. 44: 8005–8007.
- Jin, Q. and Dong, S. 2003. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *Ulva pertusa* on *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 293: 41–55.
- Kang, Y.K., Cho, S.Y., Kang, Y.H., Katano, T., Jin, E.S., Kong, D.S. and Han, M.S. 2008 Isolation, identification and characterization of algicidal bacteria against *Stephanodiscus hantzschii* and *Peridinium bipes* for the control of freshwater winter algal blooms. *Journal of Applied Phycology*. 20: 375–386.
- Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 74(1): 151-170.
- Kim, Y.S., Lee, D.S., Jeong, S.Y., Lee, W.J. and Lee, M.S. 2009. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the harmful raphidophyceae *Chattonella marina*. *The Journal of Microbiology*. 47(1): 9-18.
- Kim, J.D., Kim, B. and Lee, C.G. 2007. Alga-lytic activity of *Pseudomonas fluorescens*

against the red tide causing marine alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Biological Control*. 41: 296–303.

Kobayashi, M. and Kitagawa, I. 1994. Bioactive substances isolated from marine sponge, a miniature conglomerate of various organisms. *Pure and Applied Chemistry*. 66(4): 819-826.

Kuberski, S. and Gebicki, J. 1992. Evidence for a ketene intermediate in the photochemical transformation of matrix-isolated o-nitrobenzaldehyde. *Journal of Molecular Structure*. 275: 105–110.

Lee, S.O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A. and Ohtake, H. 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (10): 4334–4339.

Lemos, M.L., Toranzo, A.E. and Barja, J.L. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecology*. 11(2): 149–63.

Li, Y.Z., He, L.M., Wu, J. and Jiang, Q. 2005. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 329: 75-85.

Lie, J. and Zhou, J. 2002. A marine natural product database. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 42 (3): 742–748.

Long, R.A. and Azam, F. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(11): 4975–4983.

Longeon, A., Peduzzi, J., Barthelemy, M., Corre, S., Nicolas, J.L. and Guyot, M. 2004. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Marine Biotechnology*. 6: 633–641.

- Lorian, V. 1996. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4<sup>th</sup> Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. pp. 28-32, 57-58. สืบค้นจาก ลิตา ปริดานนท์. 2551. การคัดเลือกและการจำแนกชนิดของเชื้อราที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์จากกัลปังหา. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.
- Malakoff, D. 1997. Extinction on the high seas. *Science*. 277: 486-488.
- Mangano, S., Luigi, M., Consolazione, C., Matteo, B., Vivia, B., Renato, F. and Angelina, L.G. 2009. Antagonistic interactions between psychrotrophic cultivable bacteria isolated from Antarctic sponges: a preliminary analysis. *Research in Microbiology*. 160: 27-37.
- Mayali, X. and Azam, F. 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 51: 139 –144.
- Menezes, C.B., Bonugli-Santos, R.C., Miqueletto, P.B., Passarini, M.R., Silva, C.H., Justo, M.R., Leal, R.R., Garboggini, F.F., Oliveira, V.M., Berlinck, R.G. and Sette, L.D. 2010. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of Sao Paulo state, Brazil. *Microbiological Research*. 165: 466-482
- Mitsutani, A., Yamasaki, I., Kitaguchi, H., Kato, J., Ueno, S., and Ishida, Y. 2001. Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25 by two-dimensional electrophoresis. *Phycologia*. 40(3): 286–291.
- McCarthy, S.A., Johnson, R.M., Kakimoto, D. and Sakata, T. 1985. Effects of various agents on the pigment (violacein) and antibiotic production of *Alteromonas luteoviolacea*. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*. 51: 1115–1121.



- Monks, N.R., Lerner, C., Henriques, A.T., Farias, F.M., Schapoval, E.E.S., Suyenaga, E.S., Rocha, A.B.D., Schwartzman, G. and Mother, B. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activity of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 281: 1-12.
- Munro, L. and Munro, C. 2003. Climate impacts on sea fan populations. *Reef Research*. 08: 1-9.
- Mu, R.M., Fan, Z.Q., Pei, H.Y., Yuan, X.L., Liu, S.X. and Wang, X.R. 2007. Isolation and algae-lysing characteristics of the algicidal bacterium B5. *Journal of Environmental Sciences*. 19: 1336-1340.
- Nagasaki, K., Tomaru, Y., Katanozaka, N., Shirai, Y., Nishida, K., Itakura, S. and Yamaguchi, M. 2004. Isolation and characterization of a novel single stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 704-711.
- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M. and Murakami, A. 1999. Growth inhibition of blue green algae by allelopathic effects of macrophyte. *Water Science and Technology*. 39: 47-53.
- Niu, X.M., Li, S.H., Na, Z., Mei, S.X., Zhao, Q.S. and Sun, H.D. 2003. Studies on Chemical constituents of *Isodon eriocalyx* var. *laxiflora*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 34: 300-303.
- Paul, S.B., Jinnque, R. and Haim, B.G. 1979. Bacterial suppression of *Chlorella* by hydroxylamine production. *Water Research*. 13(1): 267-273.
- Phongpaichit, S., Preedanant, S., Rungjindama, N., Sakayaroj, J., Benzies, C., Chuaypat, J. and Plathong, S. 2006. Aspergillosis of gorgonian seafan

*Annella* sp. after the tsunami at Mu Ko Similan National park, Andaman Sea, Thailand. *Coral Reefs*. 25(2): 296-296.

Pomponi, S.A. 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology*. 70: 5-13.

Proksch, P., Edrada, R.A. and Ebel, R. 2002. Drugs from the sea-current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 125–134.

Purushothaman A. and Jayalakshmi S. 2010. International Training Course on Mangrove Biodiversity and Ecosystems. Centre of Advanced Studies in Marine Biology Annamalai University.

Rafai, S., Fassouane, A., El-Abbouyi, A., Wardani, A., Kijjoa, A. and Sorst, R.V. 2004. Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts. *Journal of Medical Mycology*. 15: 33-38.

Rasmussen, T., Jensen, J., Anthoni, U., Christophersen, C. and Nielsen, P. 1993. Structure and synthesis of bromoindoles from the marine sponge *Pseudosuberites hyalinus*. *Journal of Natural Products*. 56: 1553–1558.

Rohwer, F., Seguritan, V., Azam, F. and Knowlton, N. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*. 243: 1–10.

Ross, C., Vazquez, L.S. and Paul, V. 2006. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*. 78: 66–73.

Roth, P.B., Twiner, M.J., Mikulski, C.M., Barnhorst, A.B. and Doucette, G.J. 2008. Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Harmful Algae*. 7: 682–691.

- Shi, S.Y., Liu, Y.D. and Shen, Y.W. 2006. Lysis of *Aphanizomenon xosaquae* (Cyanobacterium) by a bacterium *Bacillus cereus*. *Biological Control*. 39: 345–351.
- Shi, X., Tang, X., Li, G., Wang, C. and Guan, H. 2009. Studies on chemical constituents of gorgonian *Muriceides collaris* from the South China Sea. *Chinese Journal of Marine Drugs*. 28: 18–21.
- Sponga, F., Cavaletti, L., Lazzarini, A., Borghi, A., Ciciliato, I., Losi, D. and Marinelli, F. 1999. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. *Journal of Biotechnology*. 70: 65-69.
- Su, J.Q., Yang, X.R., Zheng, T.L., Tian, Y., Jiao, N.Z., Cai, L.Z. and Hong, H.S. 2007. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*. 6: 799–810.
- Tadesses, M., Gulliksen, B., storm, B.M., Styrvoid, O.V. and Haug, T. 2008. Screening for antimicrobial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *Journal of Invertebrate Pathology*. 128: 488-498.
- Thiel, V. and Imhoff, J.F. 2003. Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges. *Biomolecular Engineering*. 20: 421-423.
- Thomas, T., Evans, F.F., Schleheck, D., Mai-Prochnow, A., Burke, C., Penesyan, A., Dalisay, S.D., Braid, S.S., Saunders, N., Johnson, J., Ferreira, S., Kjelleberg, S. and Egan, S. 2008. Analysis of the *Pseudoalteromonas tunicata* genome reveals properties of a surface-associated life style in the marine environment. *Public Library of Science ONE*. 3(9):e3252. doi:10.1371/ journal.pone.0003252.

- Touati, I., Chaieb, K., Bakhrouf, A. and Gaddour, K. 2007. Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts collected from Tunisian coast. *Journal of Medical Mycology*. 17: 183-187.
- Wang, X.L., Gong, L.Y., Liang, S.K., Han, X.R., Zhu, C.J. and Li, Y.B. 2005. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae*. 4: 433–443.
- Wang, H., Liu, Z.P., Mehta, S.K. and Zhao, G.M. 2008. Algicidal activity of *Achromobacter* sp. (strain YZ) isolated from yellow sea: An assessment with bloom causing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*. 136(S1): S563.
- Wilson, G.S., Rftos, D.A., Corrigan, S.L. and Nair, S.V. 2009. Diversity and antimicrobial activities of surface-attached marine bacteria from Sydney Harbour, Australia. *Microbiological Research*. 165: 300—311.
- Winton, J.E. 1988. The systematists' perspective. In: Fautin DG (ed) *Biomedical importance of marine organisms*. California Academy of Science, San Francisco. pp 1-6.
- Woese, C.R. and Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain. The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74: 5088.
- Wright, A.E. 1998. Isolation of marine natural products. In: Cannell, R.J.P. (Ed.), *Methods in Biotechnology*, vol. 4. Humana Press, New Jersey, USA. pp. 365-408.
- Yamamoto, Y., Kouchiwa, T. and Hodoki, Y. 1998. Distribution and identification of actinomycetes lysing cyanobacteria in a eutrophic lake. *Journal of Applied Phycology*. 10(2): 391–397.

- Yang, H., Hou, A., Jiang, B., Lin, Z. and Sun, H. 2000. Serratumin A, a novel compound from *Clerodendrum serratum*. *Acta Botanica Yunnanica*. 22: 75–80.
- Yoshikawa, K., Adachi, K., Nishijima, M., Takadera, T., Tamaki, S., Harada, K., Mochida, K. and Sano, H. 2000. b-Cyanoalanine production by marine bacteria on cyanide free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacter. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2): 718–722.
- Yu, M., Wang, J., Tang, K., Shi, X., Wang, S., Zhu, W.M. and Zhang, X.H. 2012. Purification and characterization of antibacterial compounds of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1. *Physiology and Biochemistry*. DOI 10.1099/mic.0.055970-0.
- Zheng, L., Han, X., Chen, H., Lin, W. and Yan, X. 2005. Marine bacteria associated with Marine microorganisms: the potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology*. 55(2): 119–24.
- Zurawell, R.W., Chen, H., Burke, J.M. and Prepas, E.E. 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Part B: Critical Reviews*. 8: 1–37
- <http://www.dnp.go.th/npo/html/Research/Coralreef/Coralreef.html>; January 7, 2009
- <http://www.lib.kmutt.ac.th/st4kid/nonFlash/services/getText.jsp?id=142>; March 3, 2010
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; March 1, 2010
- <http://www.scitour.most.go.th>; April 20, 2012
- [http://www.smccrc.go.th/kokra\\_spong.html](http://www.smccrc.go.th/kokra_spong.html); March 1, 2010
- <http://www.TalayThai.com>; January 7, 2009
- <http://th.wikipedia.org/wiki>; January 7, 2009

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก.

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ, ยาและสารเคมีและการทดสอบสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรีย

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

**Artificial sea water**

Sodium chloride	24.60 g
Potassium chloride	0.67 g
Calcium chloride	1.36 g
Magnesium chloride	4.66 g
Magnesium sulfate	6.29 g
Sodium bicarbonate	0.18 g

ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่น 1000 mL. ให้เข้ากัน โดยเติมสารเคมีตามลำดับ นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Artificial sea water agar**

Sodium chloride	24.60 g
Potassium chloride	0.67 g
Calcium chloride	1.36 g
Magnesium chloride	4.66 g
Magnesium sulfate	6.29 g
Sodium bicarbonate	0.18 g
Peptone	4.00 g
Yeas extract	2.00 g
Potassium hydrogen phosphate	1.00 g
Agar	15.00 g

ซึ่งอาหาร ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่น 1000 mL. ให้เข้ากัน ต้มให้ละลาย นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รออุณหภูมิลดลง 45-50 °C เทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 15-20 ml. รอให้วุ้นแข็ง

**Artificial sea water broth**

Sodium chloride	24.60 g
Potassium chloride	0.67 g
Calcium chloride	1.36 g
Magnesium chloride	4.66 g
Magnesium sulfate	6.29 g
Sodium bicarbonate	0.18 g
Peptone	4.00 g
Yeast extract	2.00 g
Potassium hydrogen phosphate	1.00 g
Agar	15.00 g

ซังอาหาร ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่น 1000 mL. ให้เข้ากัน ต้มให้ละลาย นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**Marine agar**

Peptic digest of animal tissue	5.00 g
Yeast extract	1.00 g
Ferric citrate	0.10 g
Magnesium chloride	8.80 g
Sodium chloride	19.45 g
Calcium chloride	1.80 g
Sodium sulfate	3.24 g
Potassium chloride	0.55 g
Sodium bicarbonate	0.16 g
Potassium bromide	0.08 g
Strontium chloride	0.034 g
Boric acid	0.022 g
Sodium silicate	0.004 g
Sodium fluoride	0.0024 g
Ammonium nitrate	0.0016 g
Disodium phosphate	0.008 g
Agar	15.00 g



ซึ่งอาหาร ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่น 1000 mL. ให้เข้ากัน ต้มให้ละลาย นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รออุณหภูมิลดลง 45-50 °C เทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 15-20 mL. รอให้วันแข็ง

#### **Mueller-Hinton agar (MHA), Difco**

Meat infusion	2.0 g
Cesein hydrolysate	17.5 g
Starch	1.5 g
Agar	15.0 g

ซึ่งอาหาร ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่น 1000 mL. ให้เข้ากัน ต้มให้ละลาย นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รออุณหภูมิลดลง 45-50 °C เทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 15-20 mL. รอให้วันแข็ง

#### **Nutrient agar + 1%NaCl**

Nutrient agar	23 g
Sodium chloride	10 g

ซึ่งอาหาร ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่น 1000 mL. ให้เข้ากัน ต้มให้ละลาย นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รออุณหภูมิลดลง 45-50 °C เทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 15-20 mL. รอให้วันแข็ง

#### **Potato dextrose agar (PDA), Difco**

Potato infusion	200 g
Bacto dextrose	20 g
Agar	15 g

ซึ่งอาหาร ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่น 1000 mL. ให้เข้ากัน ต้มให้ละลาย นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รออุณหภูมิลดลง 45-50 °C เทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 15-20 mL. รอให้วันแข็ง

#### **Sabouraud dextrose broth (SDB), Difco**

Peptone	10 g
D(+) glucose	40 g

ซึ่งอาหาร ละลายส่วนประกอบด้วยน้ำกลั่น 1000 mL. ให้เข้ากัน ต้มให้ละลาย นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### **Tryptic Soy Agar (TSA)**

Pancreatic Digest of Casein	15	g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	15	g
Sodium Chloride	5	g
Distilled water	1000	mL
pH	7.3±0.2	

ซึ่งอาหาร 40 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL. ให้เข้ากัน ต้มให้ละลาย นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รออุณหภูมิลดลง 45-50 °C เทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 15-20 mL. รอให้วุ้นแข็ง

### **Soft agar**

Agar 0.75% (7.5 g)+ Luria-Bertani 20 ml ในน้ำกลั่น 1000 mL แบ่งเป็นหลอดหลอดละ 4 mL นำเข้า Autoclave ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ใน water bath อุณหภูมิ 45-50 °C

### **ยาและสารเคมี**

#### **การเตรียมยา**

#### **amphotericin B 10 mg/mL**

ซึ่งยา amphotericin B 20 mg ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง หลังจากนั้นละลายยาโดยใช้ 10% DMSO ปริมาตร 2 mL แล้วแบ่งใส่หลอด eppendorf เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ 4 °C

#### **chloramphenicol 10 mg/mL**

ซึ่งยา chloramphenicol 20 mg ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง หลังจากนั้นละลายยาโดยใช้ 10% DMSO ปริมาตร 2 mL แล้วแบ่งใส่หลอด eppendorf เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ 4 °C

### การเตรียมสี resazurin

เตรียม 1.8 % resazurin โดยใช้ น้ำกลั่น ในการละลายและกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45  $\mu\text{m}$  เก็บไว้ในหลอด eppendorf และห่อด้วย aluminium foil เพื่อป้องกันแสง เก็บเป็น stock solution ที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อต้องการใช้นามาเจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

### สี

- Crystal violet
- Iodine
- Safranin
- Resazurin

### ตัวทำละลาย

- Ethyl acetate
- Hexane
- Methanol
- Methanol:chloroform (1:1)

### Kit

- API ZYM Kit (by Biomerieux)

### สารเคมีอื่น ๆ

- 70% และ 95% (Ethyl alcohol)
- 20% Glycerol
- 1% Tween-80
- Artificial Sea Water (ASW)
- Sterile normal saline solution (0.85% NaCl)
- Sodium sulfate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- 1% tetramethyl- p-phenylenediamine dihydrochloride
- 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$

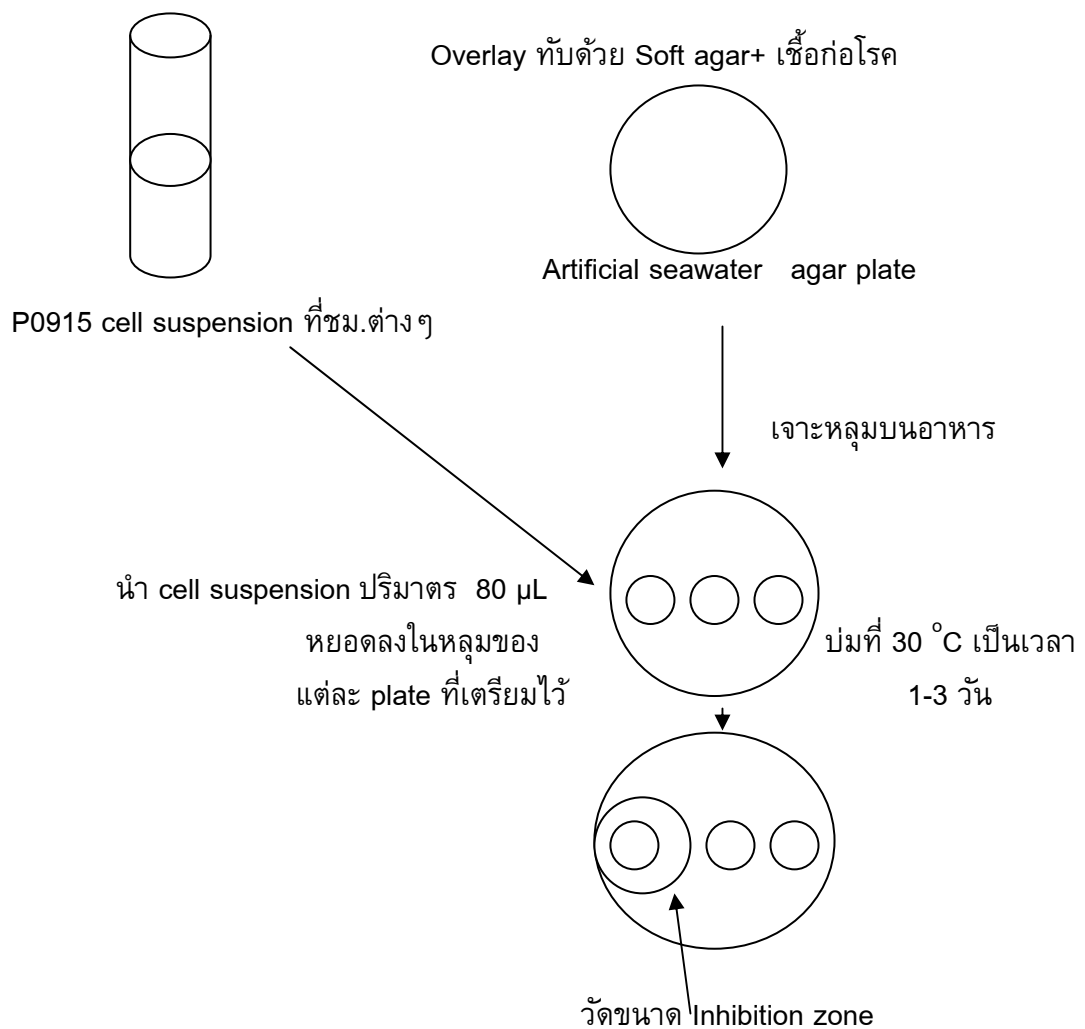
## ทดสอบลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรีย

### การย้อมสีแกรม

หยดน้ำกลั่น sterile ลงบนสไลด์ ประมาณ 1 หยด ใช้ลูป (loop) เขี่ยเชื้อแล้วเกลี่ยเชื้อ (smear) บนสไลด์ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆไม่ให้หนาแน่นมากเกินไปและปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry) ตรึงเชื้อ (fix) โดยการนำสไลด์ผ่านไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง หยดสี คริสตอล ไวโอเลต (crystal violet) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อไว้ให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออก หยดสารละลายไอโอดีน (iodine) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออก หยดเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (ethyl alcohol) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ หยดสีซาฟรานิน (safranin) บริเวณที่เกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

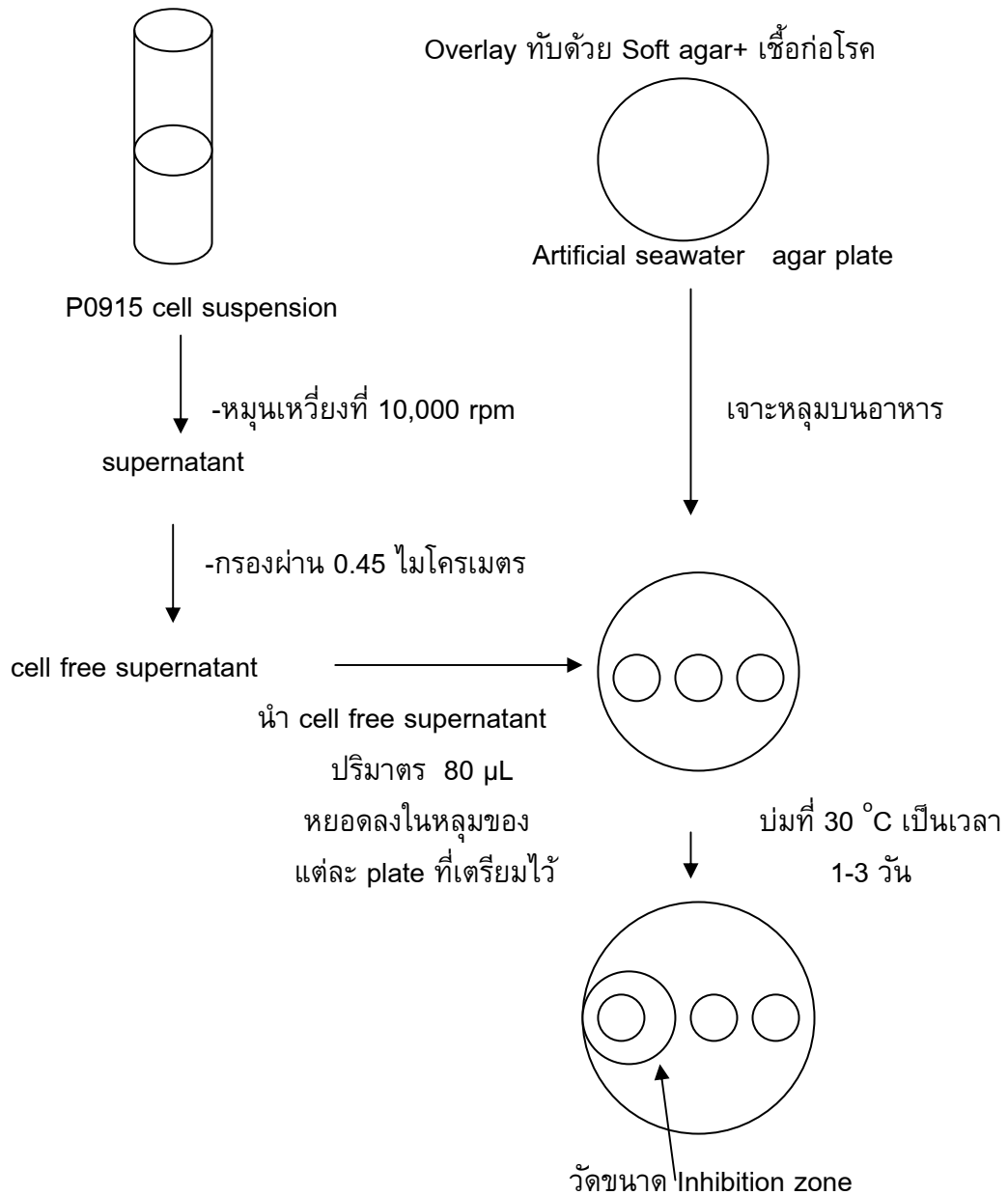
## ภาคผนวก ข.

## แผนภูมิที่ 1



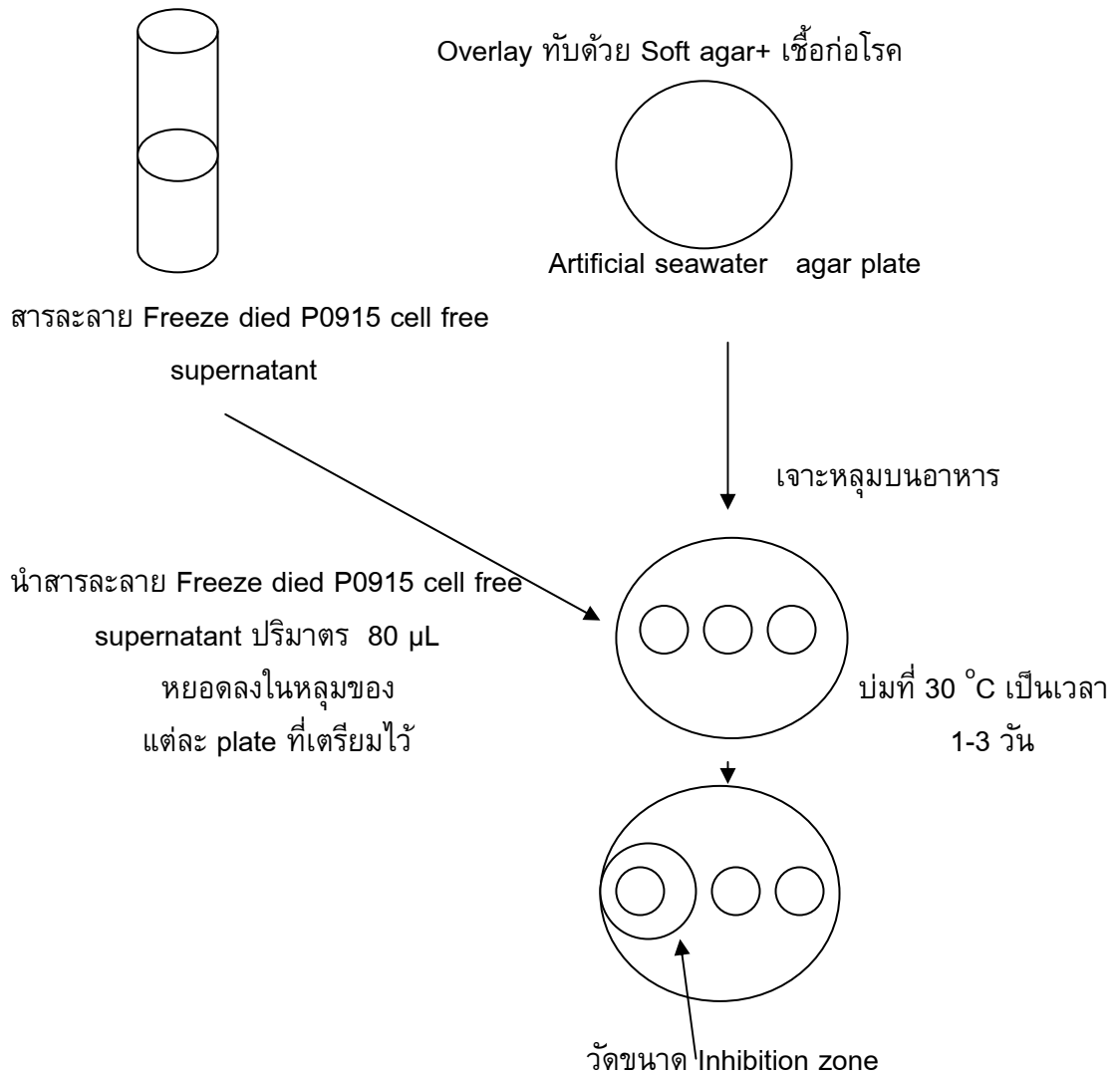
แผนภูมิที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell suspension จากการบ่มที่ระยะเวลาต่างๆ

## แผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell free supernatant

### แผนภูมิที่ 3

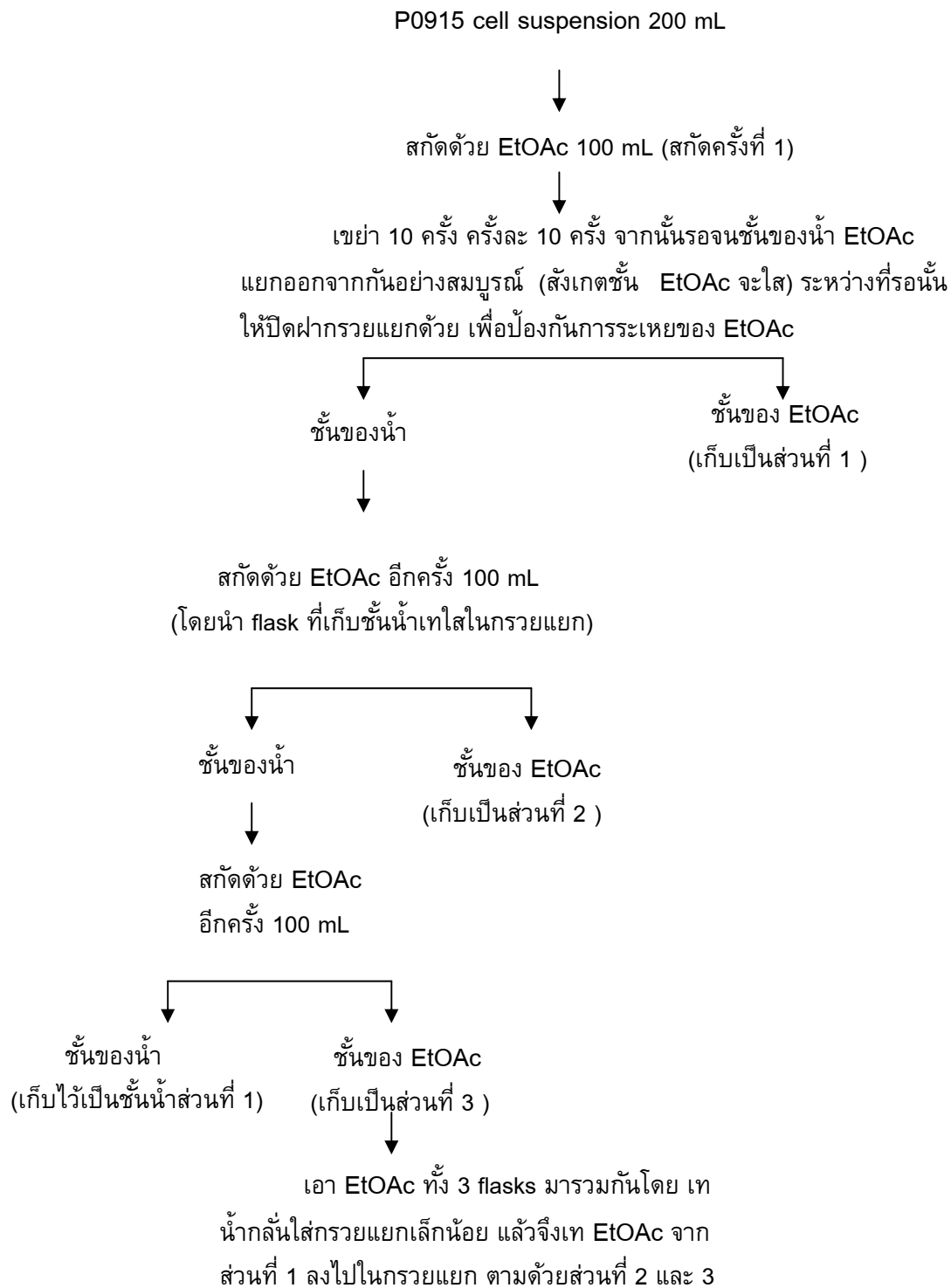


แผนภูมิที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ P0915 cell free supernatant เข้มข้น

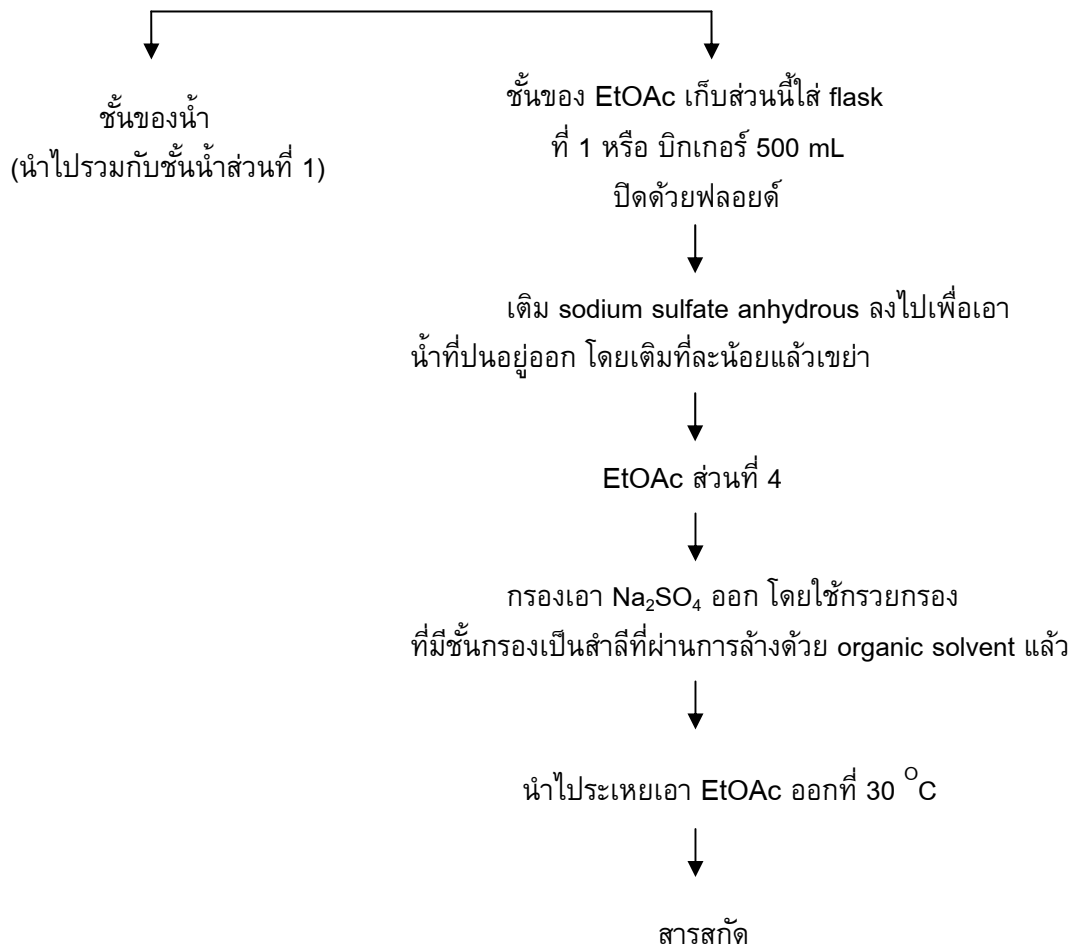
## แผนภูมิที่ 4

ขั้นตอนการสกัด

## ขั้นตอนการสกัดสารต้านจุลินทรีย์ ด้วย EtOAc







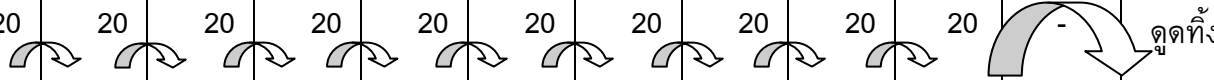
\* ในส่วนของชั้นน้ำนำมาวัดปริมาตรและนำมาหาฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค

แผนภูมิที่ 4 แสดงขั้นตอนการสกัดสารตัวอย่างด้วย Ethyl Acetate (EtOAc) ดัดแปลงมาจากวิธี  
ของ Al-Zereini (2006)

### แผนภูมิที่ 5

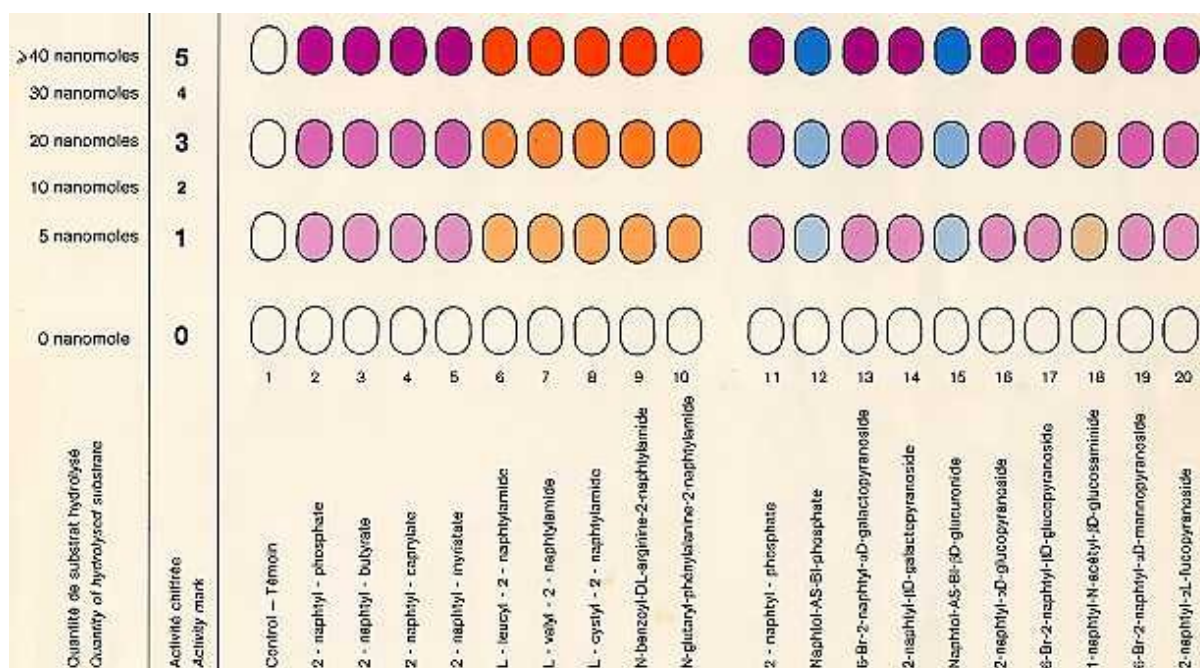
#### ตารางแสดงวิธีการหาค่า MIC

สิ่งที่ใส่/หลุม	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Control อาหาร												Control DMSO
สารสกัด (µL)	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	-
DMSO (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
MHB(µL)	180	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	180
อาหาร+เชื้อก่อโรค (µL)	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ความเข้มข้น สุดท้ายของ สารสกัด (µg/mL)	-	1,024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	-



## แผนภูมิที่ 6

### แถบสีเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์



\*\*หมายเหตุ เนื่องจากปฏิกิริยาไวต่อแสงทำให้ผลบวมสีได้ในตอนแรกที่ถูกแสง แต่สีจะหายไป  
ในที่สุด ส่วนผลบวมจะให้สีที่ถาวร เทียบปริมาณเอนไซม์คร่าวๆ ได้จากแถบสีมาตรฐาน โดยมี  
ช่วงความเข้มสีตั้งแต่ 0-5 เมื่อ 0 = ไม่มีสี, 5 = สีเข้มที่สุด

ที่มา: <http://www.didier-pol.net/2apizym.html>

**วิธีสกัดสารด้วย Methanol และ Methanol ผสม chloroform (ดัดแปลงมาจากวิธีของ  
Isnansetyo, A. และ Kamei, Y. (2003))**

นำโคโลนี P0915 ที่มีอายุ 48 ชม. ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) ใน NSS ตูดเชื้อ 1 mL spread ลงบน ASW agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม. ชูดโคโลนีเชื้อจาก plate ที่เลี้ยงไว้ใส่กรวยแยก 5 g เติมตัวทำละลายลงไป 200 mL ปิดฝากรวย คลายกรวย เขย่าแล้วคลายกรวย จนกว่าแรงดันในกรวยจะเหลือน้อยลง หนีบกรวยไว้กับขาตั้ง รอซัก 10-15 นาที เทตัวทำละลายที่มีเชื้ออยู่ใส่ ขวดเพื่อทำการหมุนเหวี่ยง 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเทตัวทำละลายเก็บไว้ นำตะกอนที่ได้ไปทำการสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเดิม ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง แล้วนำตัวทำละลายทั้ง 3 ส่วนมารวมกัน แล้วทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Evaporator



เอกสารแนบ / Attached document 1

วิธีการจำแนกชนิด / Method of identification

16S rDNA sequencing

1. PCR amplification of 16S rDNA

DNA templates for PCR amplification were prepared by using "Genomic DNA mini kit (Blood/culture cell)" (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan). DNA coding for 16S rRNA regions was amplified by means of PCR with *Taq* polymerase, as described by Kawasaki et al. (1993), Yamada et al. (2000) and Katsura et al. (2001). A PCR product for sequencing 16S rDNA regions was prepared by using the following two primers, 20F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3', positions 9-27 on 16S rDNA by the *E. coli* numbering system; Brosius et al., 1981) and 1500R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3', position 1509-1492 on 16S rDNA by the *E. coli* numbering system; Brosius et al., 1981). The PCR amplification was carried out with DNA Engine Dyad<sup>®</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories). One hundred  $\mu$ l of a reaction mixture contained 15-20 ng of template DNA, 2.0  $\mu$ moles each of the two primers, 2.5 units of *Taq* polymerase, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP and 10  $\mu$ l of 10x*Taq* buffer, pH 8.8, containing (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, which was comprised of 750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.1% Tween 20. The PCR amplification was programmed to carry out an initial denaturation step at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min and elongation at 72°C for 2 min, followed by a final amplification step at 72°C for 3 min. The PCR product was analyzed by 0.8% (w/v) agarose gel electrophoresis and purified with a QIAquick<sup>®</sup> PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). The purified PCR product was stored at -20°C for further step.

2. Direct sequencing of 16S rDNA

Direct sequencing of the single-banded and purified PCR products (ca. 1500 bases, on 16S rDNA by the *E. coli* numbering system; Brosius et al., 1981) was carried out. Sequencing of the purified PCR products was carried out with an ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (version 3.0, Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') and 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3') for partial sequencing, and additional 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') and 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') for full length sequencing were used for sequencing of 16S rDNA. Ten  $\mu$ l of a sequencing reaction mixture contained 5-20 ng of template DNAs, 2.0  $\mu$ l of BigDye<sup>™</sup> terminator ready reaction mixture, 5-20 ng of DNA template, 1.6 pmole of sequencing primer, 1.5  $\mu$ l of 5xBigDye<sup>™</sup> sequencing buffer and deionized water. The PCR reactions were carried out as follows: an initial denaturation step at 96°C for 30 sec, 25 cycles of denaturation at 96°C for 10 sec, annealing at 50°C for 5 sec and elongation at 60°C for 4 min. Eighty  $\mu$ l of freshly prepared ethanol/acetate solution was added to the sequencing reaction mixture in 1.5 ml microcentrifuge tube, and mixed well with a brief vortex. The mixture was left to stand at room temperature for 15 min and centrifuged at the maximum speed or 14,500 rpm for 20 min at room temperature. The ethanol solution was immediately removed carefully from the tube with an aspirator equipped with a fine tip. The resulting DNA pellets were washed by adding 250  $\mu$ l of 70% ethanol to the tube, and vortexed briefly. The precipitated DNA was collected by centrifugation for 5 min at the maximum speed. The remaining ethanol was carefully removed from the tube with an aspirator equipped with a fine tip. The DNA obtained was dried in a heat box at 90°C for 1 min, and the dried DNA was stored at either 4°C or -20°C. The DNA pellets were suspended in 20  $\mu$ l of a terminator sequencing reagent, mixed on a vortex and spun down. The double-stranded DNA was completely separated by heating at 95°C for 2 min, and immediately placed on ice, until ready to load on instrument. The DNA sequencing was performed on an ABI Prism<sup>®</sup> 3730xl DNA Sequence (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

3. Sequence analyses

The nucleotide sequences obtained from all primers were assembled using Cap contig assembly program, an accessory application in BioEdit (Biological sequence alignment editor) Program (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). Homology search was performed by using the standard nucleotide BLAST (BLASTn) from the NCBI web server <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> against previously reported sequences at the GenBank/EMBL/DBJ database for determination of the nearest sequences.

**References**

- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. and Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**, 107-127.
- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. (2001). *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 559-563.
- Kawasaki, H., Hoshino, Y., Hirata, A. and Yamasato, K. (1993). Is intracytoplasmic membrane structure a generic criterion? It does not coincide with phylogenetic interrelationships among photosynthetic purple non-sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **160**, 358-362.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., and Komagata, K. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 823-829.

BIOTEC Culture Collection (BCC)  
 113 Thailand Science Park, Paholyothin Road,  
 Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand  
 Tel: +66-2-564-6700 ext 3336 Fax: +66-2-564-6707



**เอกสารแนบ / Attached document 2**  
**ลำดับนิวคลีโอไทด์ / Nucleotide sequence(s)**

ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Sample No.	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ Nucleotide region of	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3') Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	S 15	16S rDNA	>8 15 CTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACATTTCTAGCTTGCTAGAAGATG ACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGACAAACCAT GGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCTCGCCT TTAGATTGGCCCAAGTGGGATAGCTAGTTGGTGGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGACGAT CCTAGCTGGTTTGGAGGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCACCCATGCCGC GTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGTAGT TAATACTCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCA GCGCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTAATCCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTACGCA GCGCGGTTGTTAAGCGGAGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAA CTGGCAAACTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTACGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GAGTCTGAAGGAATACCGATGGCGRAGGCCAGCCACTGGGTCAACACTGACCGCTCATGT ACGAAAGCCTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTGTCCACCCGTAACCGATGT CTACTAGGAGCTGGGCTCTTCGGCAACTTTTCCAAAGCTAACCGATTAAAGTAGACCGCC TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAATGAATTCAGGGGGCCCGCACAAAGCGGT GGAGCATGTGGTTTAAATCCGATCCCAACCGCAAGAACCTTACCTACACTTGACATACAGAG AACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTC GTCAGCTCCTGTTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTA GTTGCCAGCGATTCCGTCGGGAACCTTAAGGAGACTGCCGGTGAATAACCGGAGGAAAGT GGGACACGCTCAAGTCATCATGGCCCTTACGCTAGGGCTACACACCTGCTACAAATGGC AGGTACAGAGAGCAGCGAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCTTAAAGCCTGCTGATGCC GGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAAATCAGAA TGTTCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTGGG TTGCTCCAGAAGTGGATAGTCTAACCTTCGGGAGGACGTTTACCACCGGAGTATTATGA CTGGGTGTTTC

BIOTEC Culture Collection (BCC)  
 113 Thailand Science Park, Paholyothin Road,  
 Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand  
 Tel: +66-2-564-6700 ext 3336 Fax: +66-2-564-6707



เอกสารแนบ / Attached document 3

อื่นๆ (โปรดระบุ) / Other (please specify) : % Similarity of 16S rDNA compared with closely related species

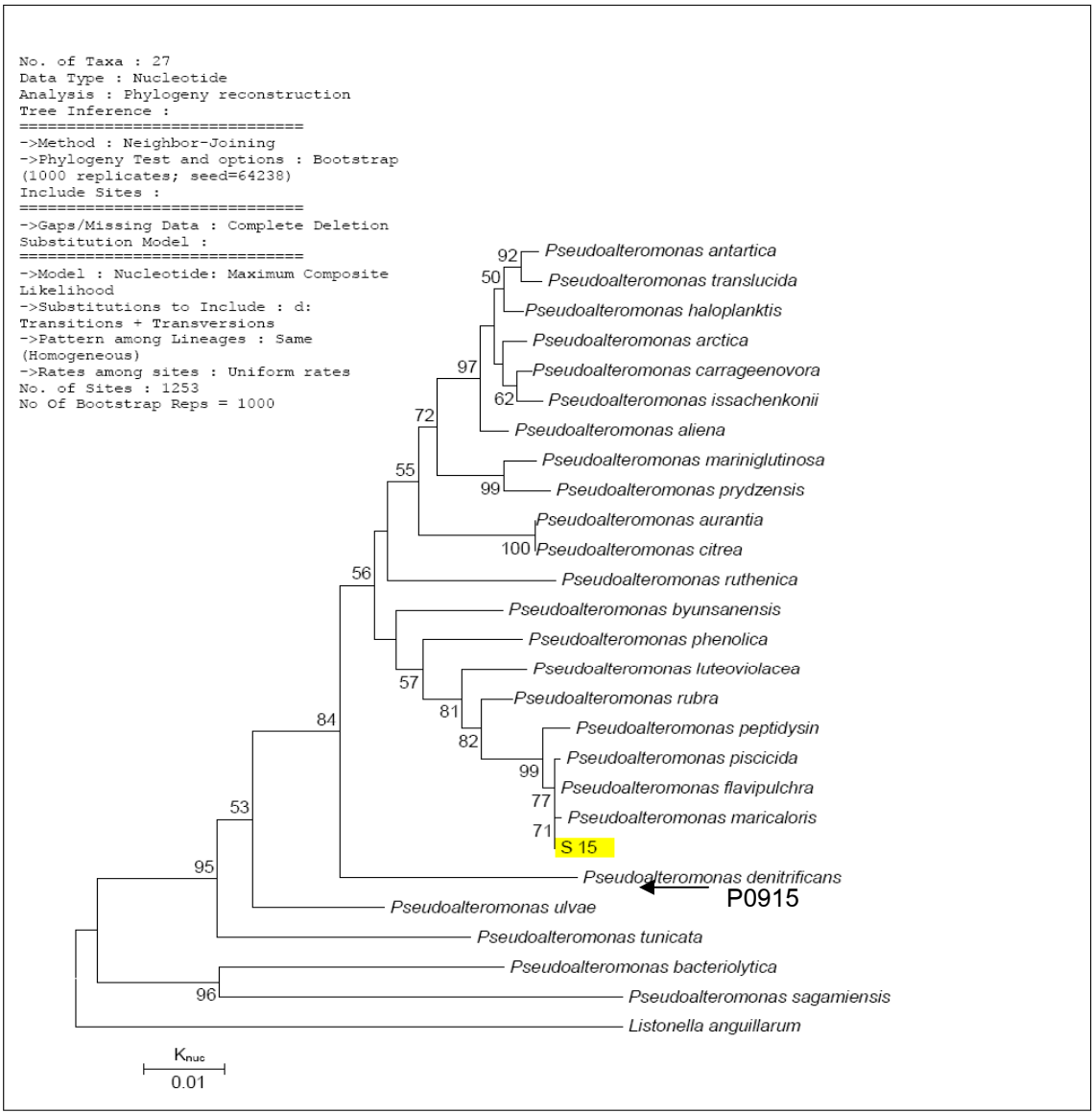
% Similarity of 16S rDNA compare with closely related species					
Seq->	1	2	3	4	5
1 <i>P. peptidysin</i>	100.0	99.0	98.9	98.7	98.8
2 <i>P. piscicida</i>	99.0	100.0	99.9	99.7	99.8
3 <i>P. flavipulchra</i>	98.9	99.9	100.0	99.8	99.9
4 <i>P. maricaloris</i>	98.7	99.7	99.8	100.0	99.7
5 s 15	98.8	99.8	99.9	99.7	100.0



BIOTEC Culture Collection (BCC)  
 113 Thailand Science Park, Paholyothin Road,  
 Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand  
 Tel: +66-2-564-6700 ext 3336 Fax: +66-2-564-6707



เอกสารแนบ / Attached document 4  
 อื่นๆ (โปรดระบุ) / Other (please specify) : Phylogenetic relationship compare with closely related species



## เอกสารอ้างอิงการทดสอบเอนไซม์โดย API ZYM Kit (by Biomerieux)

### REF 25 200

07883D - GB - 2004/01



System for the research of enzymatic activity

#### SUMMARY AND EXPLANATION

API ZYM is a semi-quantitative micromethod designed for the research of enzymatic activities. The technique is applicable to all specimens (microorganisms, cell suspensions, tissues, biological fluids, etc.). It allows the systematic and rapid study of 19 enzymatic reactions using very small sample quantities. The system consists of a strip with 20 microwells (cupules), the base of which contains the enzymatic substrate and its buffer. This base allows contact between the enzyme and the generally insoluble substrate.

API ZYM has not been developed in view of achieving the precision of spectrophotometric or electrophoretic procedures but has mainly been developed to permit the detection of enzymatic activities in a complex sample which has not been purified. It can be used to screen specimens, thus providing a spectrum of enzymatic determinations which can be further tested by spectrophotometric and/or electrophoretic procedures.

#### PRINCIPLE

The API ZYM strip is composed of 20 cupules, specially designed for the study of enzymatic reactions. The base of the strip, containing synthetic substrates, is made of non-woven fibers. This base allows enzymatic reactions to take place, even if the substrates are insoluble.

The enzymatic tests are inoculated with a dense suspension of organisms, which is used to rehydrate the enzymatic substrates. The metabolic end products produced during the incubation period are detected through colored reactions revealed by the addition of reagents.

The reactions are read according to the Reading Table.

#### CONTENT OF THE KIT (Kit for 25 tests) :

- 25 API ZYM strips
- 25 incubation boxes
- 25 result sheets
- 1 package insert

#### COMPOSITION OF THE STRIP

The composition of the API ZYM strip is given in the Reading Table of this package insert.

#### REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

##### Reagents :

- API Suspension Medium, 2 ml (Ref. 70 700) or API NaCl 0.85 % Medium, 2 ml (Ref. 20 070)
- ZYM A + ZYM B Reagents (Ref. 70 472)
- McFarland Standard (ref. 70 900) or DENSIMAT (ref. 99 234)

##### Material :

- Pipettes or PSipettes
- Ampule rack
- Ampule protector
- General microbiology laboratory equipment

#### WARNINGS AND PRECAUTIONS

- **This system is designed for the research of enzymatic activity only. Not for use in diagnostic procedures.**
- **For professional use only.**
- All specimens, microbial cultures and inoculated products should be considered infectious and handled appropriately. Aseptic technique and usual precautions for handling the bacterial group studied should be observed throughout this procedure. Refer to "NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline – Current revision*". For additional handling precautions, refer to "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Latest edition", or to the regulations currently in use in each country.
- Do not use reagents past the expiration date.
- Before use, check that the packaging of the various components is intact.
- Do not use strips which have been damaged : cupules deformed, etc.

#### STORAGE CONDITIONS

The strips should be stored at 2-8°C until the expiration date indicated on the packaging.

### SPECIMEN PREPARATION

Dilute the specimen in a minimum volume of 2 ml of distilled water or in another diluter such as normal saline **without any buffer**.

- **For microorganisms :**

Prepare a suspension with a turbidity of 5-6 McFarland in API Suspension Medium (2 ml) (open the ampule as indicated in the paragraph "Warnings and Precautions" of the package insert for this medium), distilled water or an isotonic medium. Pure growth from an agar slant or sediment from a centrifuged broth culture can be used to prepare the suspension. In order to obtain reproducible results, it is important that the microorganisms to be compared be initially grown on the same isolation medium, the diluter be the same and the suspension be of the same optical density. This technique assays for constitutive enzymes. Inductive enzymes can be detected by adding the corresponding inducer(s) to the culture medium.

- **For other specimens (cell suspensions, tissues, biological fluids, ...):**

Refer to literature or develop a specific procedure.

Based on the applications, the user must determine what test conditions are appropriate and how to interpret the results of API ZYM.

### INSTRUCTIONS FOR USE

#### Preparation of the strip

- Prepare an incubation box (tray and lid) and distribute about 5 ml of distilled water or demineralized water [or any water without additives or chemicals which may release gases (e.g. Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc.)] into the honey-combed wells of the tray to create a humid atmosphere.
- Record the sample reference on the elongated flap of the tray. (Do not record the reference on the lid as it may be misplaced during the procedure.)
- Remove the strip from its individual packaging.
- Place the strip in the incubation box.

#### Inoculation of the strip

- Using a pipette or PSlipette, dispense 65 µl of specimen into each cupule.
- After inoculation, place the plastic lid on the tray and incubate generally for 4 - 4 ½ hours at 37°C (optimum temperature). The time of incubation and temperature may vary depending on the sample to be tested. However, when samples are being compared, all test conditions (time, temperature, growth media, density of suspension) must be the same. The inoculated strip should not be placed in bright light.

### READING AND INTERPRETATION

#### Reading the strip

After incubation :

- Add 1 drop of ZYM A reagent and 1 drop of ZYM B reagent to each cupule.  
By placing a surface-active agent (ZYM A reagent) in the cupule, solubilization of the ZYM B reagent in the medium is facilitated.
- Let the color develop for at least 5 minutes.
- If possible, put the strip under a powerful light source (1000 W bulb) for about 10 seconds with the bulb placed about 10 cm (4") above the cupules. The procedure will eliminate any yellow color which may appear in the cupules due to any excess of Fast Blue BB which has not reacted. After light exposure, negative reactions become colorless. Placing the strip in daylight for a few minutes will produce comparable results.

#### Recording the reactions

Read the reactions and record the results on the result sheet. A value ranging from 0-5 can be assigned, corresponding to the colors developed : 0 corresponds to a negative reaction, 5 to a reaction of maximum intensity and values 1, 2, 3 or 4 are intermediate reactions depending on the level of intensity (3, 4 or 5 being considered as positive reactions).

The colors remain stable for several hours after the strip has been inoculated with the reagents. After 24 hours, colors may deteriorate, interfering with test interpretation.

### QUALITY CONTROL

For all applications, we strongly recommend that quality control be performed, prior to using API ZYM, which is adapted to the specimen analyzed and the procedure adopted.

The suspension media, strips and reagents are systematically quality controlled at various stages of their manufacture. The API ZYM quality control is performed using bacterial strains or purified enzymes, such as those indicated in the table below :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3.	-	-	+	V	-	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC\* 27853 (Profile obtained after 18-24 hr. culture on trypticase soy agar. Inoculum adjusted to between 5 and 6 McF using DENSIMAT.)
2. β-glucosidase Sigma G0395 (Profile obtained using a concentration of 0.2 g/l.)
3. α-chymotrypsin Sigma C4129 (Profile obtained using a concentration of 1 g/l.)

- Reading and interpretation 7-10 minutes after addition of the reagents.

\* ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

**LIMITATIONS OF THE METHOD**

- API ZYM should not be considered as an identification product.
- API ZYM is a research product and is not designed to produce biological analysis results for patients.
- All applications, other than those which have been quality controlled by bioMérieux, are under the responsibility of the user. We recommend that you follow your institution's internal policies and procedures to verify and validate the methodology and accuracy of API ZYM.
- bioMérieux refuses to accept any responsibility concerning the use of results obtained with API ZYM.

**WASTE DISPOSAL**

Unused reagents may be considered as non hazardous waste and disposed of accordingly.  
Dispose of used reagents as well as any other contaminated disposable materials following procedures for infectious or potentially infectious products.  
It is the responsibility of each laboratory to handle waste and effluents produced according to their type and degree of hazardousness and to treat and dispose of them (or have them treated and disposed of) in accordance with any applicable regulations.

**WARRANTY**

bioMérieux disclaims all warranties, express or implied, including any implied warranties of MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR USE. bioMérieux shall not be liable for any incidental or consequential damages. IN NO EVENT SHALL BIOMERIEUX'S LIABILITY TO CUSTOMER UNDER ANY CLAIM EXCEED A REFUND OF THE AMOUNT PAID TO BIOMERIEUX FOR THE PRODUCT OR SERVICE WHICH IS THE SUBJECT OF THE CLAIM.

**READING TABLE**

No.	ENZYME ASSAYED FOR	SUBSTRATE	pH	RESULT	
				POSITIVE	NEGATIVE
1	Control			Colorless or color of the sample if it has an intense coloration	
2	Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	8.5	Violet	Colorless or Very pale yellow *
3	Esterase (C 4)	2-naphthyl butyrate	6.5	Violet	
4	Esterase Lipase (C 8)	2-naphthyl caprylate	7.5	Violet	
5	Lipase (C 14)	2-naphthyl myristate	"	Violet	
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	"	Orange	
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	"	Orange	
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	"	Orange	
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	8.5	Orange	
10	$\alpha$ -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	7.5	Orange	
11	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	5.4	Violet	
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	"	Blue	
13	$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside	"	Violet	
14	$\beta$ -galactosidase	2-naphthyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	"	Violet	
15	$\beta$ -glucuronidase	Naphthol-AS-BI- $\beta$ -D-glucuronide	"	Blue	
16	$\alpha$ -glucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	"	Violet	
17	$\beta$ -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	"	Violet	
18	N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide	"	Brown	
19	$\alpha$ -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside	"	Violet	
20	$\alpha$ -fucosidase	2-naphthyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside	"	Violet	

\* Colorless or color of the control if the strip has been exposed to an intense light source after addition of the reagents ; if the strip has not been exposed to intense light, a very pale yellow color is obtained.

BIBLIOGRAPHY p. I  
INDEX OF SYMBOLS p. II



**bioMérieux<sup>®</sup> SA**  
au capital de 11 879 045 €  
673 620 399 RCS LYON  
69280 Marcy-l'Etoile / France  
Tel. 33 (0)4 78 87 20 00  
Fax 33 (0)4 78 87 20 90  
<http://www.biomerieux.com>

**bioMérieux, Inc**  
Box 15969,  
Durham, NC 27704-0969 / USA  
Tel. (1) 919 620 20 00  
Fax (1) 919 620 22 11

Printed in France

The logo is a registered and protected trademark of bioMérieux SA or one of its subsidiaries.

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวอัมพรรัตน์ ประไพวงศ์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5210220111	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2551

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Prapaiwong, A. and Umsakul, K. 2010. Screening of bacteria with antimicrobial activity from marine macro-organisms. Proceeding of 2<sup>nd</sup> Graduate Reserch Conference. Chiangmai University, November 26<sup>th</sup> 2010.