สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำของประเทศไทยในถังหมัก

โดย

ศิริโฉม ทุ่งเก้า

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

เริ่มบริการ
19 ส.ค. 2552

AQ00546569
14 พ.ค. 2552
254652 QK911.7018

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปี พ.ศ. 2549-2550

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2549-2550 ผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย ได้แก่ นายคุณากร เชื้อสุวรรณ์ นางสาวพัชรี คุ้มหอม และนางสาวนารถฤดี สวัสดิ์ล้น และขอบคุณ ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา ผู้ร่วมโครงการวิจัยและผู้อำนวยการแผนงานวิจัย ที่มีส่วนร่วมในโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัยจนโครงงานวิจัยสำเร็จลุล่วงลงได้

ศิริโฉม ทุ่งเก้า
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล 3 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียรหัส CDF04, SMF04 และ CDF07 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรและศึกษาผลของปัจจัย ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ การกวน การให้อากาศและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของแบคทีเรีย ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านจุลชีพของ CDF04 ใน Marine broth คือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 มีการกวนที่อัตรา 150 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่ 1.0 ลิตรต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ SMF04 และ CDF07 นั้นเมื่อเพาะเลี้ยงด้วย ORI medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสพบว่า SMF04 ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดีเมื่อควบคุมพีเอชที่ 7.5 มีการกวนที่ 150 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่ 1.0 ลิตรต่อนาทีในขณะที่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับ CDF07 คือที่พีเอช 7.0 อัตราการกวน 100 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่ 1.0 ลิตรต่อนาที เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน โดยพบว่าสารที่ได้จากการสกัดส่วนน้ำหมักด้วยเอธิลแอซีเตทของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Vibrio alginolyticus* ได้ เมื่อทดสอบด้วยสารปริมาณ 0.46-10.0 มิลลิกรัม ผลการจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำพบว่า SMF04 อยู่ในสกุล *Corynebacterium* และ CDF07 อยู่ในสกุล *Photobacterium*

Abstract

In this research, 3 strains of bacteria isolated from marine sponge, namely CDF04, SMF04, and CDF07 were cultivated in a 5-L fermenter for study the effect of various parameters, i.e pH, temperature, agitation, aeration and fermentation time on growth and production of antibacterial substances. The results revealed that the optimum conditions for antibacterial substances production of CDF04 in Marine broth were cultivation at 30°C, pH 7.0 with 150 rpm agitation and 1.0 L/min aeration for 48 hrs. For SMF04 and CDF07 when cultivated in ORI medium at 30°C for 48 hrs SMF04 produced high amount of antibacterial substances at pH 7.5 with 150 rpm agitation and 1.0 L/min aeration while the favored conditions for CDF07 were cultivation at pH 7.0 with 100 rpm agitation and 1.0 L/min aeration The ethyl acetate extract of culture supernatant of all strains showed inhibition against the following tested bacteria: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Vibrio alginolyticus* when tested with 0.46-10.0 mg substances. SMF04 was indentified as *Corynebacterium* sp. while CDF07 was a member of *Photobacterium.*

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
บทคัดย่อ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	13
บทที่ 4 ผลการวิจัย	21
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล	50
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก ก	60
ภาคผนวก ข	63
ภาคผนวก ค	65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	ปริมาณจุลินทรีย์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่แยกได้จากแหล่งที่อยู่ต่างๆ ในทะเล	4
2-2	ความชุกของสารเคมีแต่ละกลุ่มที่พบจากจุลินทรีย์ทะเล	6
2-3	ฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบจากจุลินทรีย์ทะเล	7
2-4	กระบวนการเมแทบอลิซึม ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในแบคทีเรียทะเลบางชนิด	8
4-1	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CDF 04 ในถังหมักที่ควบคุมพีเอชค่าต่างๆ	22
4-2	การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากส่วนน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียรหัส CDF04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ที่ควบคุมพีเอชต่างๆ	22
4-3	น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียรหัส CDF04 ในถังหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth โดยมีการควบคุมความเร็วการกวนที่ค่าต่างๆ	23
4-4	การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CDF04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ที่ควบคุมความเร็วในการกวนต่างๆ	24
4-5	น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CDF04 ในถังหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth โดยมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส	26
4-6	การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CDF04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส	26
4-7	น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในถังหมักด้วย Marine broth และมีการให้อากาศที่อัตรา 1.0 1.5 และ 3.0 ลิตรต่อนาที	28
4-8	การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในถังหมักด้วย Marine broth และมีการให้อากาศที่อัตรา 1.0 1.5 และ 3.0 ลิตรต่อนาที	28
4-9	น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 04 ด้วย Marine broth ที่ระยะเวลาต่างๆ	29

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4-10 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 04 ด้วย Marine broth ที่ระยะเวลาต่างๆ 30

4-11 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง SMF04 ด้วย ORI mediumในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 31

4-12 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ใน ORI mediumในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชต่างๆ 32

4-13 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง SMF04 ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการกวนต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 33

4-14 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการกวนต่างๆ 35

4-15 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง SMF04 ในถังหมักด้วย ORI medium ที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 37

4-16 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศต่างๆ 38

4-17 ลักษณะโคโลนี การย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียรหัส SMF 04 39

4-18 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 41

4-19 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07ในถังหมักด้วย ORI medium ที่มีการควบคุมพีเอชต่างๆ 42

4-20 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง CDF07 ในถังหมักด้วย ORI medium ที่มีการควบคุมอัตราการกวนต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 43

4-21 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการกวนต่างๆ 44

4-22 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4-23 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศต่างๆ	46
4-24 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ	48
4-25 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่ระยะเวลาต่างๆ	48
4-26 การย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียรหัส CDF 07	49
ค-1 การทดสอบทางชีวเคมีและการอ่านผลบวกและผลลบของชุดทดสอบ API 20NE	67
ค-2 การทดสอบทางชีวเคมีและการอ่านผลบวกและผลลบของชุดทดสอบ API Coryne	68

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	การอยู่ร่วมกันแบบ Symbiosis ของจุลินทรีย์และฟองน้ำทะเล	5
4-1	ลักษณะบริเวณยับยั้ง *V. alginolyticus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอชที่ค่าต่างๆ	23
4-2	ลักษณะบริเวณยับยั้ง *V. alginolyticus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการกวนที่ค่าต่างๆ	25
4-3	ลักษณะบริเวณยับยั้ง *B. subtilis* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการกวนที่ค่าต่างๆ	27
4-4	บริเวณยับยั้งต่อ *V. alginolyticus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ที่พีเอช 7.5	33
4-5	บริเวณยับยั้งต่อ *E.coli* ATCC 25922 ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ที่อัตราการกวน 100 150 และ 200 รอบต่อนาที	36
4-6	บริเวณยับยั้งต่อ *V. alginolyticus* ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ที่มีอัตราการให้อากาศที่ 1.0 1.5 และ 2.0 ลิตรต่อนาที	39
4-7	ผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API Coryne ของแบคทีเรียรหัส SMF 04	40
4-8	ลักษณะบริเวณยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอชที่ค่าต่างๆ	42
4-9	ลักษณะบริเวณยับยั้ง *B. cereus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการกวนที่ค่าต่างๆ	44
4-10	ลักษณะบริเวณยับยั้ง *V. alginolyticus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศที่ค่าต่างๆ	47
4-11	ผลการทดสอบ API 20 NE kit ของแบคทีเรีย CDF07	49
ค-1	ชุดถังหมักพร้อมชุดควบคุมที่ใช้ในการทดลอง	65

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) จากสิ่งมีชีวิตในทะเลเริ่มขึ้นตั้งแต่ปลายยุค ค.ศ. 1960 เป็นต้นมา (Proksch และคณะ, 2002) เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลมีประโยชน์ที่หลากหลาย เช่น ใช้เป็นยารักษาโรค เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เป็นอาหารเสริม ใช้เป็นตัวติดตามทางโมเลกุล (Molecular Probes) ใช้ผลิตเป็นเอนไซม์ และใช้เป็นสารที่มีประโยชน์ทางการเกษตร (Agrichemicals) โดยการศึกษาในช่วงแรกจะทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrates) เช่น สาหร่ายขนาดใหญ่ (Macroalga) ปะการัง (Corals) และฟองน้ำ (Sponges) หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1995 จึงเริ่มมีการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีข้อสันนิษฐานว่า จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์ทะเลที่ไม่กระดูกสันหลังน่าจะมีความสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติคล้ายกับสารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากสัตว์ทะเลเหล่านั้น ซึ่งพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมีคุณสมบัติคล้ายกับสารที่แยกได้จากสัตว์ทะเล โดยทำการศึกษาแบคทีเรีย และราที่แยกจากสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ฟองน้ำ หอย (Mollusks) สัตว์จำพวก Tunicates Coelenterates และ Crustacean พบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์จากฟองน้ำได้มาก ชนิดที่สุด (Kelecom, 2002) โดยจุลินทรีย์เหล่านั้นได้แก่ แบคทีเรีย (Bacteria) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) สาหร่ายสีเขียว(Green alga) สาหร่ายสีแดง(Red alga) คริปโตไฟต์ (Cryptophytes) ไดโนแฟลกเจลเลต (Dinogagellates) และไดอะตอม (Diatoms) (Lee และคณะ, 2001) จึงเป็นที่มาของการศึกษาแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลในประเทศไทย เนื่องจากแบคทีเรียสามารถนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ และการควบคุมสภาวะการผลิตทำได้ค่อนข้างง่ายกว่าสัตว์ทะเลหรือจุลินทรีย์อื่น ๆ หลังจากแยกได้จุลินทรีย์ที่ผลิตสารที่ต้องการได้แล้ว ขั้นต่อไปที่ควรศึกษาได้แก่ การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกได้ ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่ ปัจจัยทางด้านสารอาหาร เช่น ชนิดและความเข้มข้นคาร์บอน ไนโตรเจน และธาตุอาหารอื่นๆ นอกจากนั้นยังมีปัจจัยด้านสภาวะการเพาะเลี้ยง เช่น พีเอช อุณหภูมิ ออกซิเจน ตลอดจนรูปแบบการเพาะเลี้ยง เป็นต้น โดยการศึกษาปัจจัยดังกล่าวเหล่านี้อาจดำเนินการในระบบการเพาะเลี้ยงขนาดเล็ก เช่น ฟลาสก์ (Flask) หรือดำเนินการในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ (Laboratory fermenter) ก็ได้ ซึ่งการศึกษาในถังหมักจะสามารถศึกษาปัจจัย

บางอย่างที่ไม่สามารถดำเนินการในฟลาสก์ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการควบคุมปัจจัยให้คงที่ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ การกวน และการให้อากาศต่อการผลิตสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลในถังหมักที่มีการกวน (Stirred tank reactor) ขนาด 5 ลิตร เพื่อหาสภาวะที่ทำให้แบคทีเรียผลิตสารได้ดีที่สุดเพื่อเป็นการนำร่องถึงความเป็นไปได้ในการผลิตในขนาดใหญ่ขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของพีเอช อุณหภูมิ การกวน การให้อากาศและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลในถังหมักแบบมีการกวนขนาด 5 ลิตร

สมมติฐานของการวิจัย

อุณหภูมิ พีเอช การกวน การให้อากาศ และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้สภาวะที่ทำให้แบคทีเรียที่นำมาศึกษาเจริญและผลิตสารต้านจุลชีพได้ดี
2. สามารถผลิตสารต้านจุลชีพได้ปริมาณมากเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลด้วยอาหาร Marine broth หรือ ORI medium ในถังหมักที่มีการกวนขนาด 5 ลิตร ปริมาตรรวม 3 ลิตรในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอช อุณหภูมิ อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่างๆ วัดการเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพเพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ทำให้แบคทีเรียผลิตสารได้ดี โดยวัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและตรวจวัดการผลิตสารต้านจุลชีพกับแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทะเล

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากธรรมชาติ มีประโยชน์มากมาย เช่น ใช้เป็นอาหาร ผลิตน้ำหอม ผลิตสารให้สี (Pigment) ผลิตยาฆ่าแมลง (Inscticides) ผลิตยารักษาโรค (Medicines) โดยในการศึกษาเริ่มแรกจะทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บนบก เช่น พืชและจุลินทรีย์ แต่ในปลายยุคปี ค.ศ. 1960 เป็นต้นมาได้มีการศึกษาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrates) เช่น สาหร่ายขนาดใหญ่ ปะการัง และฟองน้ำ (Proksch *et al.*, 2002) และจากปี ค.ศ. 1995 เป็นต้นมา จึงเริ่มมีการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แบคทีเรีย และรา มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และสามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่า 10,000 ชนิด โดยมีมากกว่า 100 ชนิด ที่ถูกนำมาใช้เป็นสารต้านจุลชีพ สารต้านเนื้องอก และสารเคมีที่ใช้ในการเกษตร โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้เป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (Kelecom, 2002)

จุลินทรีย์ทะเลกับแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เป็นที่ทราบกันเป็นอย่างดีว่าสารเมแทบอไลท์ที่มีฤทธ์ทางชีวภาพที่มีการศึกษามานานและมีการนำมาใช้ประโยชน์ในปัจจุบันอย่างกว้างขวาง มีแหล่งที่มาจากแบคทีเรียและราที่มีถิ่นที่อยู่บนบก ปัจจุบันยาปฏิชีวนะที่สำคัญมากกว่า 120 ชนิดที่ใช้กันอยู่ เช่น Penicillins, Cyclosporine A, Adnamycin เป็นต้น ได้มาจากแหล่งดังกล่าว เนื่องจากจุลินทรีย์ทะเลก็มีความหลากหลายสูงเช่นกัน ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะค้นหาเพื่อเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแหล่งใหม่โดยการศึกษาเริ่มจากการแยก Cophalosporins C และ P1 ได้จากรา *Cephalosporium* sp. ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทะเลที่เก็บมาจากใกล้ชายฝั่งของ Sardinia ในช่วงปลาย ค.ศ. ที่ 14 ต่อมามีแนวคิดว่าเมแทบอไลท์ที่พบในสาหร่ายและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง อาจถูกผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น (associated microorganisms) จากข้อสมมุติฐานดังกล่าวจึงทำให้มีความสนใจคัดแยกจุลินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตในทะเลและนำมาทดสอบการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกันมากขึ้น

จากการตรวจสอบบทความวิจัยทางทะเลในระยะเวลากว่ากว่า 20 ปี (1984-1999) ที่ผ่านมา พบว่า ปี 1978-1987 มีทั้งหมด 2070 ฉบับที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล ในจำนวนนี้มี

เพียง 1% ที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์ โดยรายงานวิจัยจากการศึกษาเมแทบอไลท์ 3076 ชนิด มีเพียง 22 ชนิด (0.7%) ที่ได้จากแบคทีเรียและรา ต่อมาช่วง 1988-1997 รายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์มีเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว จนปัจจุบันมีแนวโน้มศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียและราที่แยกได้จากทะเล เช่น น้ำทะเล ดิน ตะกอน สาหร่าย ปลาและที่สำคัญ คือ สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ฟองน้ำ mollusles

จุลินทรีย์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จุลินทรีย์จากทะเลที่มีการศึกษาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตกลุ่ม Invetebrates โดยคิดเป็น 33 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด รองลงมาคือ จุลินทรีย์จากดินตะกอน สาหร่ายและปลา โดยพบ 23 10 และ 9 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 2-1

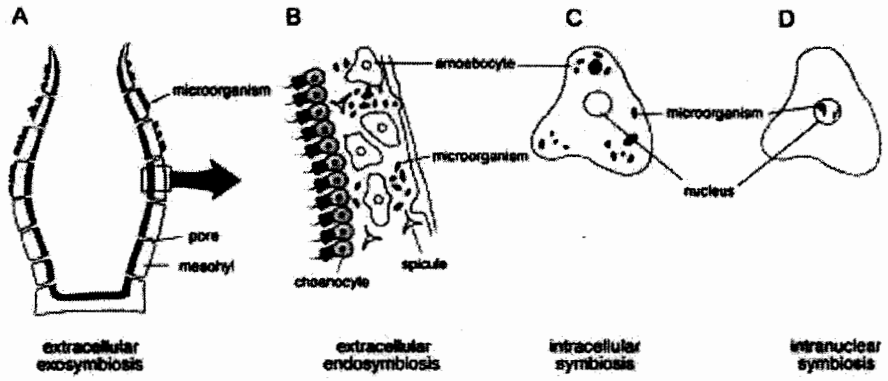
ตารางที่ 2-1 ปริมาณจุลินทรีย์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่แยกได้จากแหล่งที่อยู่ต่างๆ ในทะเล

Origin	%
Seawater	2
Sediment	23
Algae	10
Fish	9
Invertebrates	47
- sponges	33
- mollusks	5
- tunicates	5
- coelenterates	2
- crustacean	2
Other worm, reefs, wood…	9
Total	100

(ที่มา : Kelecom, 2002, p. 155)

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำได้แก่ จุลินทรีย์กลุ่ม Archae, Heterotrophic bacteria, Cyanobacteria, Dinoflagellats และ Diatoms ซึ่งลักษณะการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ จะอาศัยอยู่ร่วมกันแบบ Symbiosis โดยแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ Exosymbiosis คือ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ที่ชั้นผิวของฟองน้ำ (Outer layers) และ Endosymbiosis คือ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในฟองน้ำ (Inner layers) โดยการอยู่ร่วมกันแบบ Endosymbiosis ยังแบ่งเป็นภายในเซลล์หรือภายในนิวเคลียสของฟองน้ำ (Intracellular endosymbiosis or Intranuclear endosymbiosis) ดังภาพที่ 2-1



<u>ภาพที่ 2-1</u> การอยู่ร่วมกันแบบ Symbiosis ของจุลินทรีย์และฟองน้ำทะเล

A: Extracellular exozymbiosis; B: Extracellular endosymbiosis;

C: Intracellular symbiosis; D: Intranuclear symbiosis

(ที่มา : Lee *et al.*, 2001, p. 258)

สาเหตุที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ เนื่องจากบนชั้นผิวภายนอกและภายในช่องว่างในลำตัวของฟองน้ำ จะมีสารอาหารสะสมอยู่เป็นจำนวนมากจากการที่ฟองน้ำได้ทำการดักจับและกรองเอาไว้ ทำให้มีปริมาณสารอาหารมากกว่าบริเวณตะกอนในทะเล และแหล่งที่อยู่อื่นๆ ของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ฟองน้ำยังเป็นที่อยู่ที่ปลอดภัย การที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำนอกจากจะได้สารอาหารจากฟองน้ำแล้ว จุลินทรีย์เหล่านั้นยังมีส่วนช่วยในกระบวนการย่อยอาหารให้ฟองน้ำด้วย เช่นในกระบวนการตรึงไนโตรเจน ไนตริฟิเคชั่น และการสังเคราะห์แสง ช่วยเป็นโครงร่างค้ำจุนให้กับฟองน้ำ และผลิตสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการต่อสู้กับสัตว์นักล่าที่เป็นอันตรายกับฟองน้ำ ดังนั้นจุลินทรีย์เหล่านี้จึงน่าจะสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Lee *et al.*, 2001)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งรวมฟองน้ำสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด โดยเมื่อจำแนกออกเป็นกลุ่มตามวิธีการสังเคราะห์จะได้กลุ่มสาร 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือกลุ่ม Nitrogenated, Acetate, Mevalonate และ Chiquimate โดยมีสารกลุ่ม Nitrogenated ปริมาณมากสุด รองลงมาคือกลุ่ม Acetate กลุ่ม Mevalonate และ Chiquimate ตามลำดับ (Kelecom, 2002) ซึ่งเมื่อทำการแยกสารสกัดออกเป็น Classes ตามคุณสมบัติทางเคมีจะได้จำนวนชนิด ดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ความชุกของสารเคมีแต่ละกลุ่มที่พบจากจุลินทรีย์ทะเล

Chemical classes	Microorganisms	
	No.	%
Amines and amides	43	16.7
Indole ikaloids	36	13.9
Acetogeines	33	12.8
Cyclic peptides	25	9.7
Polypropionates	25	9.7
Macrolides	17	6.6
Sesquiterpenes	16	6.2
Phenazines	11	4.3
Diletopiperazines	10	3.9
Diterpenes	10	3.9
Carotenes	4	1.5
Guanidines	4	1.5
Benzothiazoles	4	1.5
(Iso) qiunolines	4	1.5
Dihalotyrosines	3	1.2
Macrolactames	2	0.8
Dipheylethers	1	0.4
Steroids	1	0.4
Others	9*	3.5
Total	258	100

(ที่มาดัดแปลงจาก : Kelecom, 2002, p. 156)

จากตารางที่ 2-2 พบว่าสารเคมีจากจุลินทรีย์ทะเลผลิตได้มีมากกว่า 18 กลุ่ม โดยเป็นกลุ่ม Amines and amides มีมากที่สุดคือ 43 ชนิด (16.7%) รองลงมาคือสารกลุ่ม Indole ikaloids, Acetogeines, Cyclic peptidase และ Polypropinoates ซึ่งพบ 36 ชนิด (13.9%) และสารเคมีชนิด Steroids มีปริมาณน้อยที่สุดคือ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อแบ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้ตามฤทธิ์ที่แสดงออกจะได้ดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 ฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบจากจุลินทรีย์ทะเล

Biological activities	**Bacteria**			**Fungi**		
	No.	%	Origin	No.	%	Origin
Antitumor	17	37	Alcyonarian(2), alga(1), Fish(1), mollusk(2). Sediment(8), sponge(1), tunicate(1), wood(1)	18	57	Alga(6), fish(2), mollusk(1), reef(1), sediment(2), sponge(5), wood(1)
Antibacterial	21	45	Algae(3), mollusk(1), sediment(8), sponge(4), tunicate(1), water(3), worm(1)	7	22	Sediment(2), sponge(5)
Antiviral	2	4	Sediment(2)	1	3	Phanerogame(1)
Antifungal	-	-	-	2	6	Alga(1), wood(1)
Anti-inflammatory	1	2	Jellyfish(1)	1	3	Crab(1)
Enzymatic inhibition	4	8	Mollusk(1), sediment(1), undefined(1), water(1)	2	6	Sponge(10), wood(1)
Others	2	4	Mollusk(1), undefined(1)	1	3	Sediment(1)
Sub-total Sub-total Sub-total	19 5 4	40 11 9	Sediments only Sponges only Algae only	5 20 7	16 62 22	Sediments only Sponges only Algae only
Total	47	100		32	100	

(ที่มา : Kelecom, 2002, p. 161)

จากตารางที่ 2-3 พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียจากทุกแหล่งจะมีจำนวนทั้งหมด 47 ชนิดและที่สกัดได้จากรามีจำนวนทั้งหมด 32 ชนิด ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารออก

ฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียมีจำนวนมากกว่าที่ได้จากรา สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากทั้งแบคทีเรียและราที่อาศัยอยู่ในทะเลและในสัตว์ทะเลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก ยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งไวรัส ฯลฯ ตัวอย่างเช่น ในการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียมีจำนวน 17 ชนิด คิดเป็น 37เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมด ซึ่งแยกได้จากสาหร่าย ปลา ฟองน้ำทะเล ฯลฯ ส่วนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากรามีจำนวน 18 ชนิด คิดเป็น 57 เปอร์เซ็นต์ โดยแยกได้จากสาหร่าย ปลา ฟองน้ำทะเล ฯลฯ และเมื่อพิจารณาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียโดยแบ่งตามกระบวนการเมแทบอลิซึม ชนิดของสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ที่แสดงออกมาจะได้ดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 กระบวนการเมแทบอลิซึม ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในแบคทีเรียทะเลบางชนิด

Microorganism	PW	Chemical class	Activity
Actinomycete			
- Coastal sediment	Ac	Lactone	-
- Coelenterate	N	Depsipeptide	Anti-inflammatory
- Deep-sea sediment	Ac	Bromonaphtoquinone	Antibiotic
- Sediment (underfined)	Ac	Lactonized FA	-
- Shallow water	Ac	Bromonaphtoquinone and lactone	Antibiotic
sediment	Ter	Sesquiterpene	-
- Undefined	Ac	Glyceosylated macrolide	-
Alteromonas			
- Crustacean	N	Indole	Antifungal
- Open sea	N	Cyclic peptide	-
- Sponge	N	Macrolactame and amide ester	Cytotoxic
- Underfined	N	Dipyrrole	Antibiotic
	N	Guanidine	Toxic
	N	Amide ester	Antimicrobial
	Ac	Cyclic aromatic FA	Bronchodilatator

ตารางที่ 2-4 (ต่อ)

Microorganism	PW	Chemical class	Activity
Bacillus			
- Deep waters	N	Aminoglycoside	Antimicrobial
- Mollusk	N	Despsipeptide	Cytotoxic
- Polychaete	N	Cyclic peptide	Antimicrobial
- Sediment	N	N-isocoumarine and cyclic peptide	Antimicrobial
- Sponge	N	Cyclic despsipeptide	-
Bacteria Gram +			
- Deep sea sediment C-237	Ac	Macrolide	Antiviral
- Undefined	N	Cyclic lysine	Cytotoxic
Pseudomonas			
- Fish skin	N	Guanidine	Toxic
- Polychaete	N	Cyclic peptide	Antimicrobial
- Red algae	N	Cyclic peptide	Antimicrobial
- Sponge	Ter	C50 carotene	-
	N	Diketopiperazine and phenazine	-
- Tunicate	N	Amide	-
- Underfined	N	Indole and quinolinol	Antimicrobial and antibiotic
	N	Guanidine diketopiperazine	Chitinase inhibitor
Streptomyces			
- Estuarine sediment	N	N-glycosylated flavonoide	-
- Fish	N	Peptide	-
- Gorgonian	Ac	FA lactone	Cytotoxic
- Mollusk	N	Macrolactame	Superoxide
- Shallow water	N	Phenazine	inhibitor
sediment	Ac	FA lactone	Antimicrobial
	N	Diketopiperazine, pyrrole	-
- Sediment	N	Phenazine and lactone amide	ezyme innhibitor
- Sponge	Ac	Naphtoquinone	Antimicrobial and antibiotic
- Underfined			-

ตารางที่ 2-4 (ต่อ)

Microorganism	PW	Chemical class	Activity
Vibrio			
- Fish	N	Indole	-
- Fish pathogen	N	Amide	-
- Sponge	Ac	Bromo diphenyl ether	Antimicrobial
	N	Indole and lactame	Antimicrobial
- Underfined	N	Guanidine and lactame	Toxic

PW = Pathway; N = Nitrogenated compound, Ac = Acetate-derived compound,

Ter = Terpenoid; FA = Fattyacid

(ที่มา : Kelecom, 2002, p. 163)

จากตารางที่ 2-4 พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากแบคทีเรียมาจากแบคทีเรียทั้งหมด 7 กลุ่มคือ Actinomycete, *Alteromonas*, *Bacillus*, Bacteria Gram +, *Pseudomonas*, *Streptomyces* และ *Vibrio* ซึ่งแบ่งเป็น 4 กลุ่มได้แก่ Nitrogenated compound, Acetate-derived compound, Terpenoid และ Fatty acid ตัวอย่างเช่น ใน *Bacillus* ที่แยกได้จากน้ำทะเลลึกเป็นสารกลุ่ม Nitrogenated ชนิดของสารออกฤทธิ์คือ Aminoglycoside และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Besson และคณะ (1987) ได้ทำการทดลองผลิต inturin A ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยทำการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ถ้าใช้น้ำตาลฟรักโตส ซูโครส และ มอลโตส เป็นแหล่งคาร์บอนแทน น้ำตาลกลูโคส จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต inturin A ได้ดี และพบว่าเมื่อเติมกรดอะมิโน L-asparagine ลงไปเป็นแหล่งไนโตรเจน จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต inturin A ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าเติมเกลือแอมโมเนียมลงไปก็จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ inturin A

Yegneswaran และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนต่อการเจริญและการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ Cephamycin จากแบคทีเรีย *Streptomyces clavuligerus* โดยมีการปรับการให้ออกซิเจน 3 แบบ คือ แบบที่ 1 จะไม่มีการให้ออกซิเจน แบบที่ 2 จะทำการให้ออกซิเจนตลอดการหมัก และแบบที่ 3 จะทำการให้ออกซิเจนในช่วงที่แบคทีเรียมีการเจริญอย่างรวดเร็ว (growth phase) พบว่า การให้ออกซิเจนแบบสุดท้ายจะช่วยให้แบคทีเรียมีการใช้

ออกซิเจนได้อย่างเหมาะสม และช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตของ Cephamycin ได้สูงถึง 2.4 เท่า เมื่อเทียบกับการไม่ให้ออกซิเจน

Large, Ison และ Williams (1998) ศึกษาผลของอัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต Clavulamic acid ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ ß-lactamase ของ *Streptomyces clavuligerus* ในถังหมักขนาด 7 ลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 ลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วปลายใบพัด (Tip speed) จาก 1.88 เป็น 2.83 เมตรต่อนาที จะทำให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้น แต่เมื่อความเร็วเพิ่มถึง 3.77 เมตรต่อวินาที การเจริญของเชื้อจะชะลอลง สำหรับการผลิต Clavulamic acid นั้นพบว่าไม่ขึ้นอยู่กับความเร็วปลายใบพัด โดยค่าที่เหมาะสมคือ 2.36 เมตรต่อวินาที

Chen และคณะ (1999) ศึกษาการผลิต Rapamycin ซึ่งเป็นเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. ในถังหมักขนาด 130 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ลิตร โดยควบคุมอัตราการกวน อัตราการให้อากาศ ความดันภายในถัง อุณหภูมิและพีเอช ด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อไม่ให้ระบบเกิดการจำกัดออกซิเจน (DO limitation) พบว่าเชื้อผลิต Rapamycin ได้ในช่วงพีเอช 6.2-6.8 และภายใต้สภาวะเหมาะสมที่หาได้จะทำให้ระยะเวลาการหมักลดลงและอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

Shioya และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิต Virginiamycin โดยทำการให้อากาศและกวน เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Dissolved Oxygen ; DO) ให้มีค่าคงที่ ผลที่ได้พบว่าเมื่อปรับความเร็วในการกวนให้สูงขึ้นเพื่อรักษาความเข้มข้นของออกซิเจนจะสามารถผลิต Virginiamycin ได้มากขึ้น ส่วนการรักษาระดับความเข้มข้นของออกซิเจนจะไม่ส่งผลต่อการผลิต Virginiamycin

Pfefferle, Theobald, Gurtler และ Fiedler (2000) รายงานหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Streptosporangium* ในถังหมักเพื่อผลิตสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ โดยเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 250 มิลลิลิตร พบว่าค่า Dissolved oxygen tension (pO_2) เป็นพารามิเตอร์สำคัญ การเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์นี้ โดยการเปลี่ยนการให้อากาศและการกวนมีผลต่อผลผลิตสารที่ได้ และพบว่าอัตราการผลิตสารจะเพิ่มขึ้น 20 เท่า เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายให้มากเกินพอ

Padma และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต Vancomycin จาก *Amycolatopsis orientalis* พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ การให้พีเอชเท่ากับ 7.6 ให้อุณหภูมิเท่ากับ 29 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร กวนด้วยความเร็ว 255 รอบต่อนาที และให้อากาศในอัตราส่วนการให้อากาศต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 10 : 1

Jamil และคณะ (2007) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MH-4 จากดิน โดยพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิต Polypeptide ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และจึงนำมาเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต พบว่า การใช้เวลาในการผลิตนาน 96 ชั่วโมง

ปรับพีเอชเท่ากับ 8 ใช้ กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ L-glutamic acid เป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้อุณหภูมิในการผลิต 37 องศาเซลเซียส จะช่วยให้สามารถผลิต Polypeptide ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี

Liang *et.al*, (2007) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Streptomyces gilvosporeus* LK-196 เพื่อผลิต Natamycin ซึ่งทำการทดลองในฟลาสก์และถังหมักขนาด 30 ลิตรพบว่าผลของ Dissolved oxygen และแรงเฉือน (Shear force) มีอิทธิพลในการผลิต Natamycin โดยจะให้ผลผลิต Natamycin 2.03 กรัมต่อลิตรในการทดลองในฟลาสก์และสำหรับการทดลองในถังหมักขนาด 30 ลิตร โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมในการควบคุมคือ 6.0 ในระหว่างกระบวนการหมักและระดับออกซิเจนจะมีความเข้มข้นมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้จากอัตราการให้อากาศและการกวนซึ่งทำให้ผลิต Natamycin ได้มากขึ้นเป็น 3.94 กรัมต่อลิตร

Yu และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาปัจจัยของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารต้านการเจริญของราจากแบคทีเรีย *Streptomyces rimosus* MY02 โดยทำการทดลองในฟลาสก์ พบว่าถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แป้ง 53.323 กรัม แป้งถั่ว 9.376 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 6.244 กรัม และ NaCl 5.836 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 6.0 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และใช้เวลาในการเจริญนาน 120 ชั่วโมง จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านการเจริญของรา จากแบคทีเรีย *Streptomyces rimosus* MY02

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

แบคทีเรีย : แบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำและผ่านการคัดกรองเบื้องต้นแล้วว่าผลิตสารต้านแบคทีเรียทดสอบได้ดี ได้แก่

(1) แบคทีเรียรหัส CDF 04

(2) แบคทีเรียรหัส SMF 04

(3) แบคทีเรียรหัส CDF 07

แหล่งที่มาของแบคทีเรีย :ชุดโครงการวิจัยสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากฟองน้ำ และแบคทีเรียทะเลที่อาศัยจากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคภาคตะวันออกของประเทศไทย

แบคทีเรียทดสอบ : ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้แก่

(1) *Bacillus cereus*

(2) *Escherichia coli* ATCC 25922

(3) *Micrococcus luteus*

(4) *Pseudomonas aeruginosa*

(5) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

(6) *Vibrio alginolyticus*

สารเคมี

(1) Ethyl acetate

(2) HCL 1 N

(3) NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์

(4) NaOH 4 N

(5) Dimethyl sulfoxide (DMSO)

(6) น้ำยาทดสอบ Oxidase

(7) H_2O_2 3 เปอร์เซ็นต์

(8) Polypropylene glycol P1'200, Fluka Chemie GmbH CH-9471 Buchs, Switzerland.

อาหารเลี้ยงเชื้อและชุดทดสอบสำเร็จรูป

(1) Marine agar (Difco)

(2) Marine broth (Difco)

(3) Ocean Research Institute (ORI) medium (Difco)

(4) Tryptic soy broth (TSB) (Difco)

(5) Muller Hinton Agar (MHA) (Difco)

(6) ชุดจำแนกแบคทีเรีย API (Biomerieux)

ดิสก์ยามาตรฐาน

(1) Neomycin, 30 µg/disc (Oxoid)

(2) Chloramphenicol , 30 µg/disc (Oxoid)

(3) Tetracycline, 30 µg/disc (Oxoid)

เครื่องมือทดลอง

(1) ถังหมัก (Fermenter) BIOSTAT®B B.Braun, Biotech International, Germany ขนาด 5 ลิตร มีใบพัดแบบ Disc Rushton Turbine เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร 6 ใบกวน จำนวน 2 ชุดเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Model CP224S Sartorius, Sartorius AG., Germany.

(2) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Model CP3202S Sartorius, Sartorius AG., Germany.

(3) ตู้อบ (Hot air oven) Model 500D 0601, Memmert GmbHt Co., KG.

(4) เครื่องระเหยแห้งด้วยสูญญากาศ (Rotary Evaporator) Model Buchi Rotavapor R-205, Switzerland.

(5) กรวยแยกสารขนาด 2 ลิตร

(6) เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) Model SORVAL® EVOLUTION, Kendo lab Product, U.S.A.

(7) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Orbital Shaker Incubator) Model LM-57OR, YIH Der Co. Ltd., Japan.

(8) เครื่องดูดความชื้น (Desiccator)

(9) เครื่องทำให้เซลล์แตกโดยคลื่นความถี่สูง (Sonicator)

(10) ดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร Whatman®, Whatman International Ltd., England.

(11) เครื่องวัดความขุ่น(Portable Turbidity Meter) Model BioMerieux Italia S.p.A.

KO11100, Italy.

(12) เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixer) Model Scientific industries, Metrology Technical Co. Ltd.,U.S.A.

(13) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Model Thermo Spectronic Helios Gamma, England.

วิธีการทดลอง

1. การเตรียม Stock culture

1.1 เพาะแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในฟลาสก์ขนาด 150 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth หรือ ORI Medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 2 มิลลิลิตร เตรียมส่วนผสมทั้งหมด จำนวน 50 หลอดต่อ 1 เชื้อ และนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น (Starter culture)

2.1 เพาะแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จาก Stock culture ที่เก็บในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ลงใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth หรือ ORI Medium ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์

2.2 บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Orbital Shaker Incubator) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเป็น 5 McFarland หรือความขุ่นที่เหมาะสมโดยการวัดด้วยเครื่องวัดความขุ่น (Portable Turbidity Meter)

3. การศึกษาผลของพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth หรือ ORI Medium ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2700 มิลลิลิตร

3.2 ทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ โดยควบคุมอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อนาที แต่ละแบตช์ทำการควบคุม พีเอชที่ 7.0 7.5 และ 8.0 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะทำการเพาะเลี้ยงหากมีฟองเกิดขึ้นให้เติมสาร

กำจัดฟองปริมาตร 5 มิลลิลิตร เมื่อครบกำหนดเวลานำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำส่วนตะกอนเซลล์ไปหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำส่วนน้ำหมักไปสกัดสารต้านจุลชีพ

4. การศึกษาผลของอุณหภูมิ

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมพีเอชเหมาะสมที่จากข้อ 3 ได้ โดยผันแปรอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส และควบคุมการกวนที่อัตรา 200 รอบต่อนาที ให้อากาศที่อัตรา 1 ลิตรต่อนาที เมื่อครบกำหนดเวลา 48 ชั่วโมง นำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำส่วนตะกอนเซลล์ไปหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำส่วนน้ำหมักไปสกัดสารต้านจุลชีพ

5. การศึกษาผลของการกวน

5.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI medium หรือ Marine broth ปริมาตรรวม 3 ลิตรตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3

5.2 ทำการหมักแบบแบตช์ โดยควบคุมอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อนาที ควบคุมพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเหมาะสมที่ได้จากการทดลองผลของพีเอช แต่ละแบตช์ทำการควบคุมอัตราการกวนเป็น 100 150 และ 200 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนดเวลา 48 ชั่วโมง นำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำส่วนตะกอนเซลล์ไปหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำส่วนน้ำหมักไปสกัดสารต้านจุลชีพ

6. การศึกษาผลของการให้อากาศ

6.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI medium หรือ Marine broth ปริมาตรรวม 3 ลิตรตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3

6.2 ทำการหมักแบบแบตช์ โดยควบคุมอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส ควบคุมความเร็วในการกวนและพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าเหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า แต่ละแบตช์ทำการควบคุมอัตราการให้อากาศเป็น 1 1.5 และ 2 ลิตรต่อนาที เมื่อครบกำหนดเวลา 48 ชั่วโมง นำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำส่วนตะกอนเซลล์ไปหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และนำส่วนน้ำหมักไปสกัดสารต้านจุลชีพ

7. การศึกษาผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

7.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในถังหมักโดยควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

7.2 เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ นำไปหาการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้งและสกัดส่วนน้ำหมักด้วย Ethyl acetate และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัด

8. การวัดการเจริญ

ทำการวัดการเจริญของแบคทีเรียในถังหมักโดยการวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้งดังนี้

8.1 นำแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์อบในตู้อบ (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง Desiccators และทำการชั่งน้ำหนักแผ่นอะลูมิเนียม

8.2 ทำการถ่ายส่วนตะกอนทั้งหมดที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงใส่ลงในแผ่นอะลูมิเนียมที่ได้ทำการชั่งน้ำหนักไว้แล้ว จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นอะลูมิเนียมมาใส่ในเครื่อง Desiccators แล้วจึงนำมาชั่งหาค่าน้ำหนักแห้ง

8.3 คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร) = (b-a)/3

เมื่อ a = น้ำหนักอะลูมิเนียมเปล่า (มิลลิกรัม)

b = น้ำหนักอะลูมิเนียมที่มีเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม)

9. การตรวจวัดสารต้านจุลชีพ

9.1 การสกัดสารสกัดจากน้ำหมัก

9.1.1 ถ่ายน้ำหมักทั้งหมดลงในกรวยแยกขนาด 2 ลิตร 2 กรวยๆ ละปริมาณ 1500 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Ethyl acetate ลงไปในกรวยแยกกรวยละ 300 มิลลิลิตร

9.1.2 ทำการเขย่าให้สารละลายน้ำหมักและสารละลาย Ethyl acetate เข้ากัน จากนั้นจึงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายในตู้ดูดควัน 3 ชั่วโมง

9.1.3 ทำการถ่ายสารละลายส่วนที่แยกชั้นอยู่ชั้นล่างออกทางก้นของกรวยแยกประมาณ 1000 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ที่เตรียมไว้ แล้วจึงเขย่ากรวยแยกอีกครั้งและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

9.1.4 ถ่ายสารละลายที่แยกอยู่ส่วนล่างลงในฟลาสก์ที่เตรียมไว้ ส่วนสารละลายน้ำใสด้านบน (ชั้น Ethyl acetate) ให้เก็บในขวดเก็บสารเพื่อนำไปทำการระเหยแห้งแบบสูญญากาศ

(Evaporator) ต่อไป จากนั้นนำสารละลายน้ำหมักในฟลาสก์ที่แยกไว้มาทำการทดลองซ้ำตามขั้นตอนที่ 9.1.1-9.1.4 จนน้ำหมักหมด

9.1.5 นำสารละลายใสที่แยกได้มาเทลงในฟลาสก์ก้นกลม (สำหรับการทำระเหยแห้งแบบสูญญากาศ) ประมาณ 1 ใน 3 ของปริมาตรฟลาสก์ แล้วนำไปติดตั้งที่เครื่อง Evaporation ทำการตั้งค่าโดยตั้งอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วในการหมุนที่ระดับ 4 เมื่อสารละลายในฟลาสก์แห้งให้เติมสารละลายใสลงไปอีก และทำการระเหยแห้งต่อจนกระทั่งสารละลายใสถูกระเหยแห้งหมดจนได้สารสกัดแห้งออกมา

9.1.6 ทำการเก็บสารสกัดแห้งโดยหยดสารละลาย Ethyl acetate ปริมาตรเล็กน้อยลงใน ฟลาสก์ก้นกลม เพื่อละลายสารสกัดแห้งออกมา โดยค่อยๆ เพิ่มปริมาตร Ethyl acetate ลงไปทีละน้อย นำฟลาสก์ก้นกลมไปจุ่มลงอ่างที่มีเครื่อง Sonicator เพื่อช่วยในการละลายของสารสกัดแห้ง ทำการสกัดจนไม่มีสารสกัดแห้งเหลือติดอยู่ในฟลาสก์ก้นกลม จากนั้นจึงดูดสารละลายใส่ลงในขวดที่ชั่งน้ำหนักแล้ว รอให้สารละลายแห้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้ก็จะได้สารสกัด Ethyl acetate

9.2 การเตรียมดิสก์และคำนวณความเข้มข้นของสารสกัด

9.2.1 วิธีการเตรียมดิสก์

9.2.1.1 ทำการละลายสารสกัดแห้งด้วยสารละลาย DMSO โดยเติมสารละลายลงไปทีละน้อยจนกระทั่งสารสกัดแห้งละลายจนหมด แล้วจึงดูดสารสกัดมาใส่ลงในหลอดที่ทราบน้ำหนักแล้ว โดยระหว่างดูดก็จะมีการชั่งน้ำหนักหลอดด้วย

9.2.1.2 ทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ตวงมาโดยจะต้องทิ้งให้สารสกัดระเหยจนมีน้ำหนักแห้งตามที่ต้องการ เมื่อได้น้ำหนักที่ต้องการแล้วจึงดูดสารละลาย DMSO ปริมาตรที่ต้องการลงไปละลายจนสารละลายจนหมดแล้วจึงดูดสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงไปบนแผ่นกระดาษกรองจากนั้นนำ แผ่นกระดาษกรอง ไปผึ่งให้แห้ง

9.2.2 วิธีการคำนวณความเข้มข้นสารสกัด

ถ้าต้องการเตรียมสารสกัดในดิสก์ให้ได้ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อดิสก์ มีวิธีการดังนี้

1 ดิสก์ใช้สารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์คือ 100/20 = 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อดิสก์ คือ 200/20 = 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อดิสก์คือ 400/20 = 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

1 สารสกัดจะใช้สารละลายปริมาตร = 1x2x6x20 = 240 ไมโครลิตร

จะต้องเตรียมสารสกัดปริมาณเผื่อไว้ = 400 ไมโครลิตร

ทำการเตรียมสารสกัด stock ที่ระดับความเข้มข้น = 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
ทำการคำนวณปริมาณของสารสกัด stock ที่ต้องใช้ ดังนี้
ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

$N_1V_1 = N_2V_2$

$V_1 = (5x400)/20 = 100$ ไมโครลิตร

ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

$N_1V_1 = N_2V_2$

$V_1 = (10x400)/20 = 200$ ไมโครลิตร

ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

$N_1V_1 = N_2V_2$

$V_1 = (20x400)/20 = 400$ ไมโครลิตร

ดังนั้นปริมาณสารสกัด stock ทั้งหมด = 100+200+400 = 700 ไมโครลิตร
ดังนั้นจึงเตรียมปริมาณสารสกัดเผื่อไว้ = 1000 ไมโครลิตร
จากสารสกัด stock 20 ไมโครลิตร ใช้เนื้อสาร = 20 ไมโครลิตร
สารสกัด stock 1000 ไมโครลิตร ใช้เนื้อสาร = 20x1000
= 20000 ไมโครกรัม
= 20 มิลลิกรัม

9.3 การทดสอบสารสกัดด้วยวิธี Disc Diffusion Test

9.3.1 เพาะเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *B. cereus, E. coli* ATCC 25922, *M. luteus, P.aeruginosa, S. aureus* ATCC 25923 และ *V. alginolyticus* ใน Tryptic soy broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

9.3.2 ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด แต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar โดยใช้ไม้พันสำลีจุ่มเชื้อขีดบนผิวอาหารให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

9.3.3 วางแผ่นกระดาษกรองที่หยดสารสกัดที่ได้จากแต่ละสภาวะปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นบนอาหาร Muller Hinton Agar ที่เพาะแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด วางแผ่นควบคุม (DMSO) และดิสก์ยาปฏิชีวนะลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบวงใส

หมายเหตุ : ในการทดสอบ 1 สารสกัดจะประกอบด้วยแผ่นกระดาษกรองที่มีสารสกัด แผ่นควบคุม (DMSO) และดิสก์ยาปฏิชีวนะวางทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 2 จาน

10. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล

เพาะแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์บน ORI agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนี ทำการย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น เช่น การผลิตเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์ออกซิเดส เลือกชุดจำแนกเชื้อสำเร็จรูปที่เหมาะสมกับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์เพื่อจำแนกยืนยันเชื้อต่อไป ดังรายละเอียดในภาคผนวก ค

บทที่ 4
ผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของปัจจัยทางต่างๆ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ การกวน การให้อากาศรวมทั้งระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ รหัส CDF04, SMF04 และ CDF07 ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวแยกได้จากฟองน้ำที่เก็บจากทะเลบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทยและแบคทีเรียเหล่านี้ได้ผ่านการทดสอบเบื้องต้นแล้วว่าสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียได้ดี โดยได้นำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรรวม 3 ลิตร โดยเติมหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวหรือแบบแบทช์ (Batch) ลักษณะของถังหมักและชุดควบคุมที่ใช้ในการศึกษาแสดงในภาคผนวก ค ภาพที่ ค-1 ผลการศึกษามีดังนี้

แบคทีเรียรหัส CDF 04

ผลของพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ CDF04

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียรหัส CDF 04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ปริมาตรรวม 3 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ความขุ่น 1.0 McFarland (มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 3.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการกวน 200 รอบต่อนาทีและมีการให้อากาศที่อัตรา 1 ลิตรต่อนาที โดยมีการควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 7.5 และ 8.5 และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำส่วนน้ำหมักสกัดด้วย Ethyl acetate ทำการระเหยสิ่งที่สกัดได้ให้แห้งและหาน้ำหนักสารสกัด ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียเจริญได้น้ำหนักเซลล์แห้งระหว่าง 16.4-69.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสูงสุดเมื่อควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่ 7.0 และเจริญได้น้อยที่สุดเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 8.0 สำหรับน้ำหนักของสารสกัดจากส่วนน้ำหมักนั้นพบว่าอยู่ในช่วง 57.4-123.2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณสูงสุดเมื่อควบคุม pH อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.5 ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CDF 04 ในถังหมักที่ควบคุมพีเอชค่าต่างๆ

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
7.0	38.2	87.9
7.5	69.1	123.2
8.0	16.4	57.4

เมื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัด โดยวิธี Disc diffusion โดยใช้สารสกัดปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ พบว่าสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมพีเอชเป็น 7.0 ยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิดและให้ขนาดการยับยั้งกว้างที่สุด โดยอยู่ในช่วง 16.0-28.0 มิลลิเมตร รองลงมาคือสารสกัดน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-2 ลักษณะการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 04 ที่พีเอชต่างๆ แสดงตัวอย่างในภาพที่ 4-1

ตารางที่ 4-2 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากส่วนน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียรหัส CDF04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ที่ควบคุมพีเอชต่างๆ

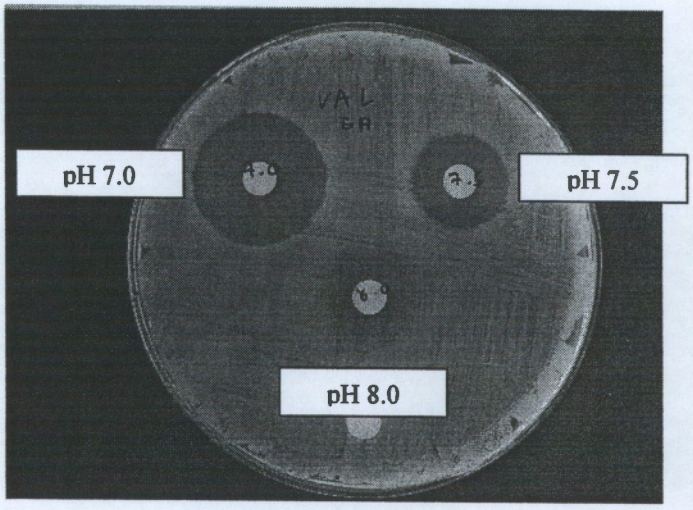
พีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร±SD)[a]					
	B. subtilis	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*V. alginolyticus*
7.0	24.0±1.1	25.5±1.2	28.0±1.4	16.0±0.2	27.0±0.8	28.0±0.8
7.5	14.5±0.6	10.5±0	20.5±0.7	-	17.5±0.2	17.5±0.2
8.0	17.0±0.5	-	21.5±0.6	-	-	17.5±0.2
Tetracycline (30 µg/disc)	25.5+2.0	21.5+1.0	20.2+0.7	19.0+1.0	20.5+0.7	29.5+2.0
ควบคุม[b]	-	-	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่พบการยับยั้ง

[a] สารสกัดปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์

[b] หมายถึงเมื่อทดสอบด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



ภาพที่ 4-1 ลักษณะบริเวณยับยั้ง *V. alginolyticus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอชที่ค่าต่างๆ

ผลของการกวนต่อ CDF04

จากข้อมูลที่ได้พบว่าแบคทีเรียรหัส CDF04 ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่พีเอช 7.0 ดังนั้นในการศึกษาปัจจัยต่อไปคืออัตราการกวนจึงได้ควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ไว้ที่ 7.0 และผันแปรอัตราการกวนของใบพัดเป็น 100 150 และ 200 รอบต่อนาที ให้อากาศที่อัตรา 1 ลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสเช่นเดิม ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและวัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปั่นเหวี่ยงแยกส่วนเซลล์ออกจากส่วนน้ำหมัก สกัดส่วนน้ำหมักด้วย Ethyl acetate ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีการกวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 33.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสารสกัดจากน้ำหมักนั้นมีค่าอยู่ระหว่าง 40.2-58.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียรหัส CDF04 ในถังหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth โดยมีการควบคุมความเร็วการกวนที่ค่าต่างๆ

ความเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
100	22.3	40.2
150	33.1	58.3
200	20.4	43.2

579.3
ส451ก
ฉ.2
254652

สำหรับการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ 6 ชนิดของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีการควบคุมความเร็วในการกวนต่างๆ โดยใช้สารสกัดปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ พบว่าสารสกัดทั้งหมดยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดได้เช่นเดียวกัน ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* ที่ไม่พบบริเวณยับยั้ง โดยสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมความเร็วในการกวนเป็น 150 รอบต่อนาที มีผลยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด โดยให้ค่าการยับยั้งขนาด 9.5-20.5 มิลลิเมตร รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4-4 และลักษณะการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 04 ที่ควบคุมอัตราการกวนต่างๆ แสดงตัวอย่างในภาพที่ 4-2

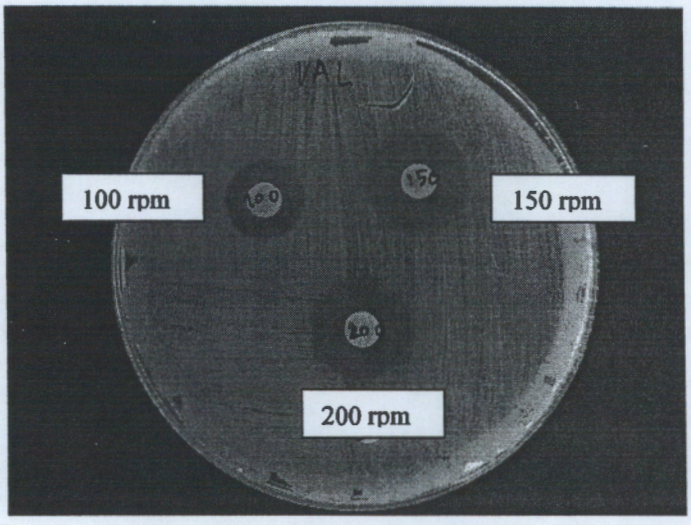
ตารางที่ 4-4 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CDF04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ที่ควบคุมความเร็วในการกวนต่างๆ

ความเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	บริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)[a]					
	B. subtilis	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*V. alginolyticus*
100	14.0±0	11.5±0	15.0±0.1	9.5±0.1	10.5±0	15.0±0.1
150	19.5±0.2	9.5±0	20.5±0.2	-	10.5±0	19.5±0.2
200	15.0±0.1	10.5±0	16.5±0.1	-	12.5±0	18.0±0.2
Tetracycline (30 µg/disc)	25.0+1.0	22.0+1.0	21.0+1.0	19.0+1.0	20.0+0.7	30.0+2.0
ควบคุม[b]	-	-	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่พบการยับยั้ง

[a] ปริมาณสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์

[b] หมายถึงเมื่อทดสอบด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide



ภาพที่ 4-2 ลักษณะบริเวณยับยั้ง *V. alginolyticus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการกวนที่ค่าต่างๆ

ผลของอุณหภูมิต่อ CDF04

จากการศึกษาผลของพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อและอัตราการกวนต่อการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียสายพันธุ์ CDF04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยใช้ Marine broth ปริมาตร 3 ลิตรเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อผลิตสารได้ดีเมื่อควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 และใช้ความเร็วในการกวน 150 รอบต่อนาที ปัจจัยต่อไปที่ศึกษาก็คืออุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยการหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและสกัดน้ำหมักด้วย Ethyl acetate และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ 6 ชนิดของสารสกัดตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ได้ผลดังตารางที่ 4-5 จากข้อมูลพบว่าเชื้อสายพันธุ์ CDF04 เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 62.4 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสารสกัดจากน้ำหมักนั้นมีค่า 25.0 และ 51.8 กรัมต่อลิตรที่การเพาะเลี้ยงที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ตารางที่ 4-5 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CDF04 ในถังหมักด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth โดยมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
25	62.4	25.0
30	46.2	51.8

จากการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ 6 ชนิดของสารสกัดน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองอุณหภูมิโดยทดสอบด้วยสารสกัดปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์พบว่าให้ผลใกล้เคียงกันโดยมีขนาดการยับยั้ง 12.0-25.0 มิลลิเมตร และไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้ รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4-6 ลักษณะการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 04 ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียสแสดงตัวอย่างในภาพที่ 4-3

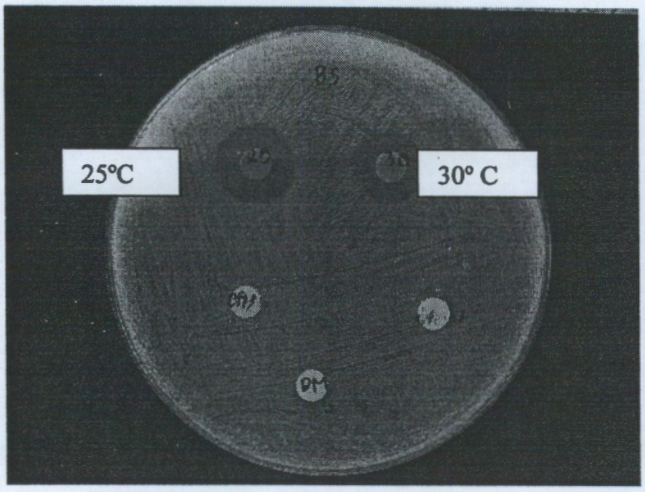
ตารางที่ 4-6 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CDF04 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)[a]					
	B. subtilis	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*V. alginolyticus*
25	16.0±0.4	12.5±0	25.0±0.8	-	12.0±0	16.0±0.4
30	15.5±0.4	15.0±0	20.5±0.8	-	14.5±0	18.5±0.2
Tetracycline (30 µg/disc)	25.5+2.0	21.5+1.0	20.2+0.7	19.0+1.0	20.5+0.7	29.5+2.0
ควบคุม[b]	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการยับยั้ง

[a] ปริมาณสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์

[b] หมายถึงเมื่อทดสอบด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide



ภาพที่ 4-3 ลักษณะบริเวณยับยั้ง *B. subtilis* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการกวนที่ค่าต่างๆ

จากข้อมูลการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจึงเหมาะสมกว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเนื่องจากแบคทีเรียผลิตสารยับยั้งได้ไม่แตกต่างกันแต่สิ้นเปลืองพลังงานไฟฟ้าในการควบคุมอุณหภูมิน้อยกว่า

ผลของการให้อากาศต่อ CDF04

จากการศึกษาผลของการให้อากาศที่อัตรา 1.0 1.5 และ 3.0 ลิตรต่อนาที ต่อการเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของแบคทีเรีย CDF04 ในถังหมักเมื่อเพาะเลี้ยงด้วย Marine broth ปริมาตรรวม 3 ลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส และควบคุมพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 และมีการกวนด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรียจะมีการเจริญดีที่อัตราการให้อากาศ 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อนาทีโดยได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 47.2 และ 45.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อให้อากาศเพิ่มขึ้นเป็น 3.0 ลิตรต่อนาที การเจริญจะลดลง โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 35.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณสารสกัดนั้นพบว่ามีปริมาณลดลง เมื่ออัตราการให้อากาศเพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงสุด 45.1 มิลลิกรัมต่อลิตรที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อนาที ดังตารางที่ 4-7 และจากการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแต่ละสภาวะโดยใช้สารสกัดปริมาณ 0.46 2.5 และ 4.1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ตามลำดับ พบว่าสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้อากาศที่อัตรา 1 ลิตรต่อนาทียับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-8

ตารางที่4-7 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในถังหมักด้วย Marine broth และมีการให้อากาศที่อัตรา 1.0 1.5 และ 3.0 ลิตรต่อนาที

อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1.0	47.2	45.1
1.5	45.1	38.3
3.0	35.0	28.0

ตารางที่ 4-8 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF04 ในถังหมักด้วย Marine broth และมีการให้อากาศที่อัตรา 1.0 1.5 และ 3.0 ลิตรต่อนาที

อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อนาที)	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	B. subtilis	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*V. alginolyticus*
1.0[(a)]	13.5±0	-	20.5±0.6	-	-	10.5±0
1.5[(b)]	10.5±0.3	9.0±0	13.0±0	8.0±0	9.0±0	9.0±0
3.0[(c)]	10.5±0	-	24.0±0.6	-	-	6.0±0
Tetracycline (30 µg/disc)	25.5+2.0	21.5+1.0	20.2+0.7	19.0+1.0	20.5+0.7	29.5+2.0
ควบคุม*	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการยับยั้ง

* หมายถึงเมื่อทดสอบด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide

[a] หมายถึงสารสกัดปริมาณ 0.46 มิลลิกรัมต่อดิสก์

[b] หมายถึงสารสกัดปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์

[c] หมายถึงสารสกัดปริมาณ 4.1 มิลลิกรัมต่อดิสก์

ผลของระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อต่อ CDF04

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 04 ใน Marine broth ปริมาตรรวม 3 ลิตรในถังหมักที่มีการควบคุมอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวนที่ 150 รอบต่อนาที และให้อากาศที่อัตรา 1.0 ลิตรต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง 72 ชั่วโมง 96 ชั่วโมงและ 120 ชั่วโมง

นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำส่วนตะกอนเซลล์ไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อวัดการเจริญ และนำส่วนน้ำหมักไปสกัดด้วย Ethyl acetate พร้อมทั้งทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัด ได้ผลดังตารางที่ 4-9 และ 4-10

ตารางที่ 4-9 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 04 ด้วย Marine broth ที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	หมายเหตุ
48	33.2	36.5	น้ำหมักสีเหลือง
96	36.4	53.9	
72	43.3	57.2	
120	63.1	60.8	น้ำหมักสีเหลืองอมน้ำตาล

จากตารางที่ 4-9 พบว่า เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจาก 48 ชั่วโมงเป็น 120 ชั่วโมง แบคทีเรีย CDF 04 มีการเจริญเพิ่มขึ้น โดยได้ค่าน้ำหนักของเซลล์แห้ง 33.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง และ 63.1 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง สำหรับสารสกัดนั้น พบว่า มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านไปเช่นเดียวกัน โดยเพิ่มขึ้นจาก 36.5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็น 60.8 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมงและผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์มีผลยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ ยกเว้น *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดยสารสกัดที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อมีผลยับยั้งได้ดีกว่าสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ 48 ชั่วโมงเล็กน้อย ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-10

ตารางที่ 4-10 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 04 ด้วย Marine broth ที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)[a]	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)[a]					
	B. subtilis	*E. coli*	*M. luteus*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*V. alginolyticus*
48	9.0±0	-	10.5±0	-	12.0±0.3	7.5±0
72	16.0±0.3	-	16.0±0.1	-	5.5±0	14.0±0.1
96	14.0±0.1	-	12.5±0	-	4.0±0	-
120	12.0±0.1	-	15.5±0.3	-	4.0±0	10.0±0
Tetracycline (30 µg/disc)	24.5+1.0	20.0+1.0	21.5+0.7	18.5+1.0	21.0+0.7	29.0+2.0
ควบคุม*	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

- หมายถึง ไม่พบการยับยั้ง
- * หมายถึง เมื่อทดสอบด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide
- [a] หมายถึงสารสกัดปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์

แบคทีเรียรหัส SMF 04

ทำการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ พีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อการเจริญและการผลิตสารต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียรหัส SMF 04 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ ORI medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติมหัวเชื้อเริ่มต้นความขุ่น 5 McFarland (มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ $1.5x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ในอัตรา 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อรวม 3 ลิตร ได้ผลดังนี้

ผลของพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ SMF04

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF 04 ใน ORI medium ที่มีการควบคุมพีเอชต่าง ๆ ได้แก่ 6.5 7.5 และ 8.5 โดยทำการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตรา 100 รอบต่อนาที ให้อากาศที่ 1.0 ลิตรต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมงทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและสารสกัดที่หมักด้วย Ethyl acetate ได้ผลดังตารางที่ 4-11

ตารางที่ 4-11 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง SMF04 ด้วย ORI mediumในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
6.5	483.6	50.2
7.5	307.5	68.9
8.5	278.0	65.4

จากตารางที่ 4-11 พบว่าเมื่อควบคุมพีเอชที่ค่าสูงขึ้นจาก 6.5 เป็น 7.5 และ 8.5 แบคทีเรียมีการเจริญลดลงโดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 483.6 307.5 และ 278.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การผลิตสารสกัดที่พีเอช 6.5 ได้สารสกัดปริมาณต่ำสุดคือ 50.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นเป็น 68.9 และ65.4 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 7.5 และ8.5 ตามลำดับ

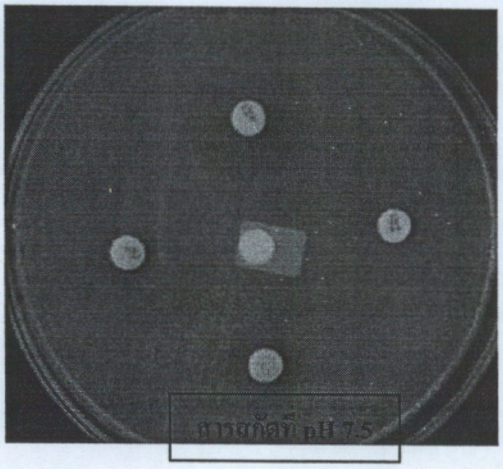
สำหรับผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดแห้งปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์โดยแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้แก่ *B .cereus, E. coli* ATCC 25922, *M. luteus, P. aeruginosa, S .aureus* ATCC 25923 และ*V. alginolyticus* ได้ผลดังตารางที่ 4-12

ตารางที่ 4-12 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ใน ORI mediumในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชต่างๆ

สิ่งที่ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.± SD)					
	B .cereus	***E. coli* ATCC 25922**	***M. luteus***	***P. aeruginosa***	***S. aureus* ATCC 25923**	***V .alginolyticus***
สารสกัดจากพีเอช 6.5	10.0±0	9.0±0	9.5±0	8.0±0	11.0±1.4	9.0±0
สารสกัดจากพีเอช 7.5	12.3±1.7	13.3±0.4	12.5±0	7.0±0	12.3±1.4	13.0±0
สารสกัดจากพีเอช 8.5	7.0±0	7.0±0	-	-	-	7.5±0
Neomycin (30 µg/disc)	22.0±1.4	15.0±1.4	17.5±0.7	8.0±0	25.0±1.4	24.5±0.7
Chloramphenicol (30 µg/disc)	26.5±0.7	22.5±0.7	23.5.±0.7	7..0±0	27.5±0.7	30.5±2.1
DMSO	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : สารสกัดปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์ 6 มิลลิเมตร
เครื่องหมาย (-) คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง

จากตารางที่ 4-12 เมื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดพบว่าสารสกัดปริมาณ 10 มิลลิกรัมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.5 และ 7.5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 6 ชนิดได้ โดยมีบริเวณยับยั้ง 8.0±0 ถึง 11.0±1.4 มิลลิเมตรในสกัดจากพีเอช 6.5 และ 7.0±0 ถึง13.3±0.4 มิลลิเมตรใน สารสกัดจากพีเอช 7.5 สำหรับสารสกัดจากพีเอช 8.5 สามารถยับยั้ง *B. cereus*, *E .coli* ATCC 25922 และ *V .alginolyticus* ได้ แต่ไม่มีผลต่อ *M. luteus*, *P. aeruginosa* และ *S .aureus* ATCC 25923 และเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจากแต่ละพีเอชพบว่าสารสกัดที่พีเอช 7.5 จะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด ลักษณะของวงใสที่เกิดจากการยับยั้งแสดงตัวอย่างในภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 บริเวณยับยั้งต่อ *V. alginolyticus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ที่พีเอช 7.5

จากผลที่ได้จึงเลือกค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดคือ 7.5 ไปใช้ในการทดลองผลของการกวนต่อไป

ผลของการกวนต่อ SMF04

ทำการแปรผันอัตราการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SME 04 ใน ORI medium ที่ควบคุมพีเอชเป็น 7.5 และให้อากาศที่อัตรา 1.0 ลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงและหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากน้ำหมัก ได้ผลดังตารางที่ 4-13 และตารางที่ 4-14

ตารางที่ 4-13 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง SMF04 ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการกวนต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
100	292.0	75.7
150	258.7	99.6
200	230.8	104.5

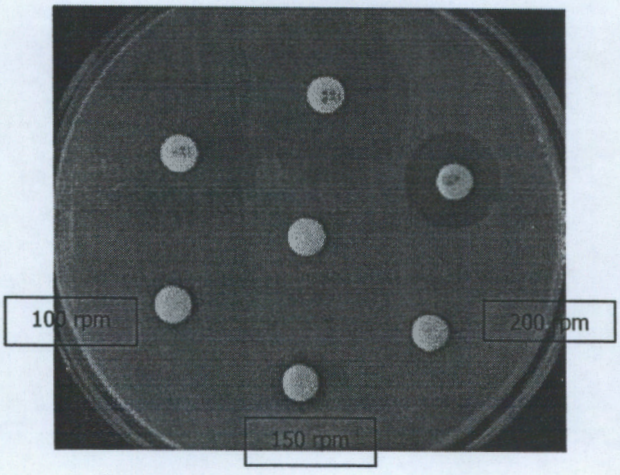
จากตารางที่ 4-13 พบว่าเมื่อควบคุมอัตราการกวนที่ค่าสูงขึ้น แบคทีเรียมีการเจริญลดลงโดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 292.0 258.7 และ 230.8 มิลลิกรัมต่อลิตรที่อัตราการกวน 100 150 และ 200 รอบต่อนาทีตามลำดับ สำหรับการผลิตสารสกัดนั้นที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาทีได้สารสกัดแห้งปริมาณต่ำสุดคือ 75.7 มิลลิกรัมต่อลิตรและเพิ่มขึ้นเป็น 99.6 และ 104.5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่อัตราการกวน 150 และ 200 รอบต่อนาที

สำหรับผลการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดปริมาณ 10 มิลลิกรัมไมโครกรัมพบว่าสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ทุกอัตราการกวนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 6 ชนิดได้ โดยมีบริเวณยับยั้ง 7.0-12.0มิลลิเมตรในสารสกัดจากอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที 7.0-14.5 มิลลิเมตรในสารสกัดจากอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และ7.0-11.0 มิลลิเมตรในสารสกัดจากอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที จะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียมากกว่าที่อัตราการกวน 100 และ 200 รอบต่อนาที และDMSO (ชุดควบคุม) ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 6 ชนิด ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-14 ลักษณะของวงใสที่เกิดจากการยับยั้งแสดงตัวอย่างในดังภาพที่ 4-5

ตารางที่ 4-14 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการกวนต่างๆ

สิ่งที่ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม. ± SD)					
	B.cereus	***E.coli*** **ATCC 25922**	***M.luteus***	***P.aeruginosa***	***S.aureus*** **ATCC 25923**	***V.alginolyticus***
สารสกัดจาก อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที	9.0±0	10.5±0.7	9.0±0	7.0±0	8.0±0	12.0±0
สารสกัดจาก อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที	11.0±1.4	11.5±0.7	11.0±0	7.0±0	9.0±0	14.5±0.7
สารสกัดจาก อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที	9.0±1.4	7.0±0	7.0±0	7.0±0	8.0±0	11.0±0
Chloramphenicol (30 µg/disc)	26.5±0.7	25.0±1.4	24.5±0.7	-	33.5±2.1	33.0±2.8
Tetracycline (30 µg/disc)	33.5±2.1	28.5±0.7	24.0±1.4	20.0±1.4	26.0±2.8	37.0±1.4
DMSO	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : ปริมาณสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์ 6 มิลลิเมตร
เครื่องหมาย (-) คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง



ภาพที่ 4-5 บริเวณยับยั้งต่อ *E.coli* ATCC 25922 ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ที่อัตราการกวน 100 150 และ 200 รอบต่อนาที

จากผลที่ได้จึงเลือกค่าอัตราการกวน 150 รอบต่อนาทีใช้ในการศึกษาผลลของการให้อากาศต่อไป

ผลของการให้อากาศต่อ SMF04

ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF 04 ด้วย ORI medium โดยควบคุมพีเอชเป็น 7.5 และอัตราการกวนที่ 150 รอบต่อนาทีและผันแปรอัตราการให้อากาศที่ 1.0, 1.5 และ 2.0 ลิตรต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง นำมาหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากน้ำหมัก พบว่าเมื่อให้อากาศที่อัตราเพิ่มขึ้นจาก 1.0 เป็น 1.5 ลิตรต่อนาที แบคทีเรีย SMF04 จะมีการเจริญเพิ่มขึ้นโดยได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 296.8 และ 388.9 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 2.0 ลิตรต่อนาที แบคทีเรียมีการเจริญลดลงโดยได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 259.8 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตสารสกัดพบว่าเมื่อให้อากาศที่อัตราเพิ่มขึ้นจะมีการผลิตสารสกัดลดลง โดยได้สารสกัด 140.0 135.2 และ 109.6 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ (ตาราง 4-15)

ตารางที่ 4-15 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง SMF04 ในถังหมักด้วย ORI medium ที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

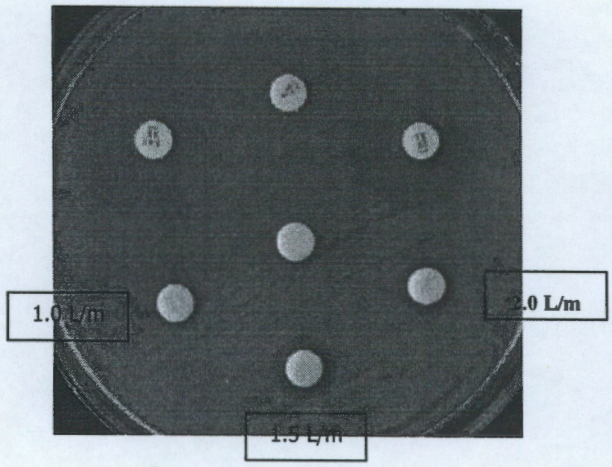
อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1.0	296.8	140.0
1.5	388.9	135.2
2.0	259.8	109.6

จากการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่อัตราการให้อากาศต่างๆ โดยทดสอบด้วยสารสกัดปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์ พบว่าสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อนาทีสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 6 ชนิดได้ โดยมีบริเวณยับยั้ง 7.0-14.8 มิลลิเมตร สำหรับสารสกัดจากอัตราการให้อากาศ 1.5 และ 2.0 ลิตรต่อนาทีจะยับยั้งเชื้อทดสอบทุกชนิดได้ยกเว้น *P. aeruginosa* ดังนั้นสารสกัดที่ได้จากอัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อนาที จะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียมากกว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.5 และ2.0 ลิตรต่อนาที และ DMSO (ชุดควบคุม) ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 6 ชนิด ดังตารางที่ 4-16 ลักษณะของวงใสที่เกิดจากการยับยั้งแสดงตัวอย่างในภาพที่ 4-6

ตารางที่ 4-16 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศต่างๆ

สิ่งที่ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม. ± SD)					
	B.cereus	***E.coli*** **ATCC 25922**	***M.luteus***	***P.aeruginosa***	***S.aureus*** **ATCC 25923**	***V.alginolyticus***
สารสกัดจาก อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อนาที	11.0±1.4	11.3±0.4	11.8±0.4	7.0±0	8.0±0	14.8±0.4
สารสกัดจาก อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที	10.0±0	11.5±0	11.3±0.4	-	8.0±0	11.0±0
สารสกัดจาก อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อนาที	8.5±0.7	9.0±0	9.5±0.7	-	7.0±0	9.5±0
Chloramphenicol (30 µg/disc)	26.5±0.7	24.0±0	23.0±1.4	-	27.5±0.7	34.0±1.4
Tetracycline (30 µg/disc)	25.5±0.7	27.0±1.4	26.0±1.4	20.5±0.7	23.0±1.4	39.0±1.4
DMSO	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : ปริมาณสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์ 6 มิลลิเมตร
เครื่องหมาย (-) คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง



ภาพที่ 4-6 บริเวณยับยั้งต่อ *V. alginolyticus* ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SMF04 ที่มีอัตราการให้อากาศที่ 1.0 1.5 และ 2.0 ลิตรต่อนาที

ผลการจำแนกแบคทีเรียรหัส SMF04

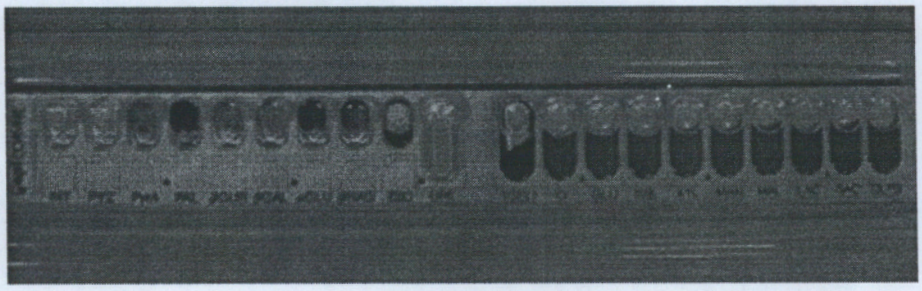
จำแนกแบคทีเรียรหัส SMF04 โดยศึกษาลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI agar จากนั้นทำการย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ Catalase test และ Oxidase test พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนแบบ irregular ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลการทดสอบคะตะเลสและออกซิเดสเป็นบวก ดังตารางที่ 4-17

ตารางที่ 4-17 ลักษณะโคโลนี การย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียรหัส SMF 04

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีสีเหลือง ผิวมัน ขอบเรียบ โคโลนีขนาดเล็ก
Gram's stain	แกรมบวก Irregular rod
Catalase	+
Oxidase	+

นำผลที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นดังกล่าวเพื่อเลือกชุดทดสอบสำเร็จรูปAPI ของบริษัท bioMerieux, France ที่เหมาะสม คือAPI Coryne ซึ่งเป็นชุดทดสอบชีวเคมีสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยการ

ทดสอบ 20 ได้แก่ การทดสอบ Nitrate reduction (NIT), Pyrazinamidase (PYZ), Pyrrolidonyl arylamidase (PYRA), Alkaline phosphatase (PAL), β-Glucuronidase (βGUR), β-Galactosidase (βGAL), α-Glucosidase (αGLU), N-Acetyl-β glucosaminidase (βNAG), Esculin (ESC), Urease (URE), Gelatinase (GEL), Glucose (GLU), Ribose (RIB), Xyloae (XYL), Mannitol (MAN), Maltose (MAL), Lactose (LAC), Sucrose (SAC), Glycogen (GLYG) และ Catalase (CAT) พบว่าแบคทีเรียรหัส SMF04 คือ *Brevibacterium* sp. ดังผลการทดสอบในภาพที่ 4-7



ภาพที่ 4-7 ผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API Coryne ของแบคทีเรียรหัส SMF 04

แบคทีเรียรหัส CDF 07

จากการศึกษาผลของพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศและระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียรหัส CDF07 ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลได้ผลดังนี้

ผลของพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อต่อ CDF07

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ด้วย ORI medium ปริมาตร 3 ลิตรในถังหมัก โดยเติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่มีความขุ่น 1 McFarland ในอัตรา 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 100 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศที่ 1 ลิตรต่อนาที โดยศึกษาผลของการควบคุมพีเอชที่ 7.0 7.5 และ 8.5 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมงพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการเจริญได้ใกล้เคียงกันในแต่ละค่าพีเอช โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ระหว่าง 110.3-113.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณสารที่สกัดได้ด้วย Ethyl acetate นั้นพบว่ามีปริมาณสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงโดยการควบคุมพีเอชที่ 7.0 และมีปริมาณลดลงเป็นลำดับเมื่อค่าพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-18

ตารางที่ 4-18 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่มีการควบคุมพีเอชต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

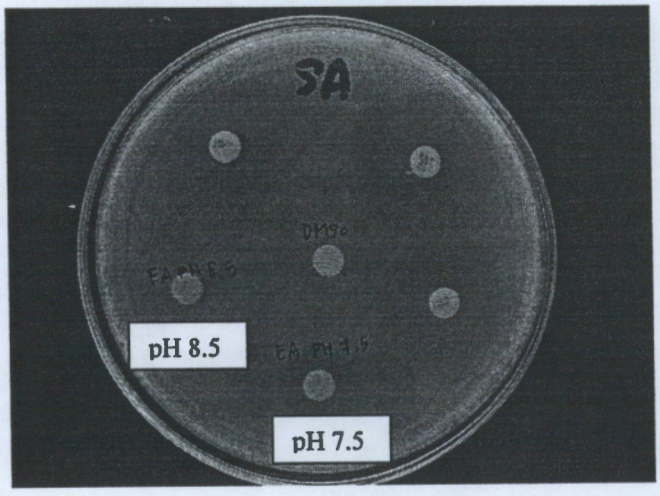
พีเอช	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
7.0	113.0	60.8
7.5	112.7	48.9
8.5	110.3	28.9

ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 07 ที่ค่าพีเอชต่างๆ โดยใช้สารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ พบว่าสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.0 และ 7.5 มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้งหมดได้ค่อนข้างดีคดยให้ขนาดบริเวณยับยั้ง 12.5-16.0 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้ง *P. aeruginosa* สำหรับสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 8.0 นั้นไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบชนิดใด ยกเว้น *B. subtilis* ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-19 ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอช 7.0 สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4-19 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ในถังหมักด้วย ORI medium ที่มีการควบคุมพีเอชต่างๆ

สิ่งที่ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.± SD)					
	B.subtilis	*E.coli*	*M.luteus*	*P.aeruginosa*	*S.aureus*	*V.alginolyticus*
สารสกัดจากพีเอช 7.0	12.5±0.7	16.0±1.4	16.0±1.4	-	16.0±1.4	12.5±3.5
สารสกัดจากพีเอช 7.5	11.5±0.7	15±0.0	16.5±2.1	10.5±0.7	15.5±0.7	ND
สารสกัดจากพีเอช 8.5	9.5±0.7	-	-	-	-	ND
Chloramphenicol (30 µg/disc)	17.5±4.2	21.5±2.1	22±2.8	-	20.0±0.0	11.1±0.3
Tetracycline (30 µg/disc)	17.2±1.4	20.5±0.7	21.5±0.7	-	21.4±1.4	38.2±1.0
DMSO	-	-	-	-	-	ND

หมายเหตุ : ปริมาณสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์ 6 มิลลิเมตร
เครื่องหมาย (-) คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง
ND คือ ไม่ได้ทำการทดลอง เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณไม่เพียงพอ



ภาพที่ 4-8 ลักษณะบริเวณยับยั้ง *S. aureus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ในสภาวะที่มีการควบคุมพีเอชที่ค่าต่างๆ

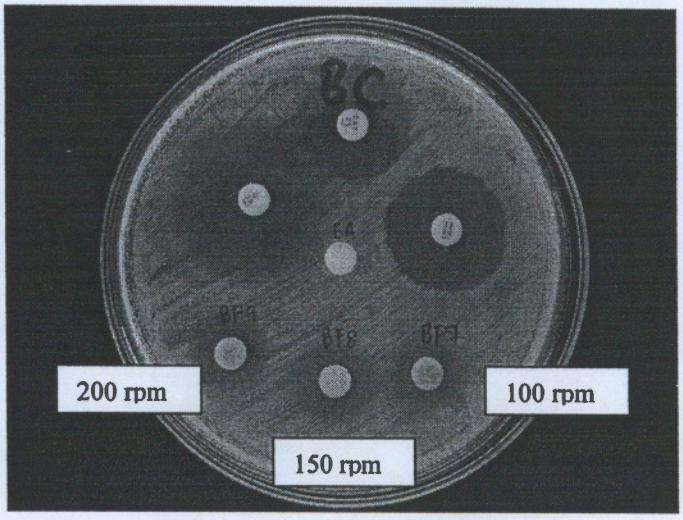
ผลของการกวนต่อ CDF07

การศึกษาผลของการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI medium ที่อัตราเร็วต่างๆ คือ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที ต่อการเจริญและการผลิตสารสกัดของแบคทีเรียรหัส CDF 07 โดยควบคุมค่าพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 ให้อากาศที่ 1 ลิตรต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญได้ดีที่สุดที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที โดยได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 233.7 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 200 รอบต่อนาที แบคทีเรียจะมีการเจริญลดลง ในขณะที่สารสกัดมีปริมาณสูงสุดที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณ 50.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-20

ตารางที่ 4-20 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง CDF07 ในถังหมักด้วย ORI medium ที่มีการควบคุมอัตราการกวนต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
100	182.5	50.5
150	233.7	37.2
200	94.5	39.0

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารที่สกัดด้วย Ethyl acetate ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF 07 ในถังหมักที่อัตราการกวนต่างๆ โดยใช้สารสกัดปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ แสดงในตารางที่ 4-21 ซึ่งพบการยับยั้งของสารสกัดจากทุกสภาวะการเพาะเลี้ยงกับทุกแบคทีเรียทดสอบ ยกเว้น *V. alginolyticus* ที่ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากปริมาณสารสกัดที่ได้ไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงเลือกการกวนที่อัตรา 100 รอบต่อนาทีสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-9 ลักษณะบริเวณยับยั้ง *B. cereus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการกวนที่ค่าต่างๆ

ตารางที่ 4-21 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการกวนต่างๆ

สิ่งที่ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม. ± SD)					
	B subtilis	***B. cereus***	***E .coli***	***P. aeruginosa***	***S. aureus***	***V. alginolyticus***
สารสกัดจาก อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที	11.5±0.7	13.0±0	17.0±0	15.5±0	18.0±1.4	ND
สารสกัดจาก อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที	11.0±1.4	12.5±0	15.0±0	14.5±0.7	15.0±2.8	ND
สารสกัดจาก อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที	10.5±0.7	11.5±0.7	17.0±0	13.5±0.7	19.0±0	ND
Chloramphenicol (30 µg/disc)	25.5±0	25.0±0	22.5±1.4	-	22.0±2.8	ND
Tetracycline (30 µg/disc)	23.0±0	24.0±0	23.5±0	25.0±0	23.0±0	ND
DMSO	-	-	-	-	-	ND

หมายเหตุ : ปริมาณสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์ 6 มิลลิเมตร
เครื่องหมาย (-) คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง
ND คือ ไม่ได้ทำการทดลอง เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณไม่เพียงพอ

ผลของการให้อากาศต่อ CDF07

การศึกษาผลของการให้อากาศที่อัตราต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตสารสกัดที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียรหัส CDF 07 ในถังหมักโดยเพาะเลี้ยงเชื้อใน ORI medium ที่ควบคุมพีเอชเป็น 7.0 ควบคุมอัตราการกวนเป็น 100 รอบต่อนาที และปรับเปลี่ยนอัตราการให้อากาศที่ 0.5 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญที่อัตราการให้อากาศ 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อนาทีมากกว่ากว่าที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที ในขณะที่ปริมาณสารสกัดที่ได้สูงสุดที่อัตราการกวน 0.5 ลิตรต่อนาที ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-18 และเมื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์พบว่าสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมการให้อากาศที่ 0.5 และ 1.0 ลิตรต่อนาทียับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งหมดได้ดี ในขณะที่สารสกัดจากการเพาะเลี้ยงที่อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที มีผลยับยั้งได้เพียง *E. coli* และ *V. alginolyticus* เท่านั้น ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-23 ลักษณะบริเวณยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดแสดงตัวอย่างในภาพที่ 4-10

ตารางที่ 4-22 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อนาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0.5	256.0	81.3
1.0	369.3	54.9
1.5	317.7	20.6

ตารางที่ 4-23 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศต่างๆ

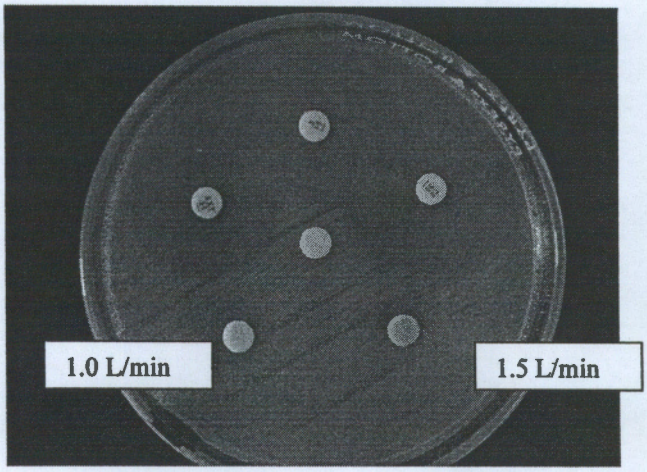
สิ่งที่ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม. ± SD)				
	B.cereus	*E.coli* ATCC 25922	*P.aeruginosa*	*S.aureus* ATCC 25923	*V.alginolyticus*
สารสกัดจาก อัตราการให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที	9.5±0	14.5±0	7.5±0.07	13.0±0	12.8±0.03
สารสกัดจาก อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อนาที	9.5±0.07	15.8±0.11	8.5±0	14.5±0.07	13.8±0.03
สารสกัดจาก อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที	ND	13.0±0	ND	ND	15.0±0
Chloramphenicol (30 µg/disc)	27.0±0	28.0±0	-	26.0±0	34.0±0
Tetracycline (30 µg/disc)	24.0±0	9.0±0	14.0±0	29.0±0	36.0±0
DMSO	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : ปริมาณสารสกัด 10 มิลลิกรัมต่อดิสก์

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์ 6 มิลลิเมตร

เครื่องหมาย (-) คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง

ND คือ ไม่ได้ทำการทดลอง เนื่องจากสารสกัดมีปริมาณไม่เพียงพอ



ภาพที่ 4-10 ลักษณะบริเวณยับยั้ง *V. alginolyticus* ของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศที่ค่าต่างๆ

ผลของระยะเวลาการหมักต่อ CDF07

การศึกษาผลของระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตสารสกัดของแบคทีเรีย CDF 07 ในถังหมัก โดยใช้อาหาร ORI medium ที่ควบคุมพีเอชเป็น 7.0 อัตราการกวนที่ 100 รอบต่อนาที ให้อากาศที่อัตรา 1 ลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อมากขึ้นแบคทีเรียจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นโดยน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจาก 111.6 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็น 182.4 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับปริมาณสารสกัดนั้นพบว่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลานานขึ้นเช่นเดียวกัน ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-24 และผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบคือ *V. alginolyticus* ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยทดสอบด้วยสารสกัดปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์พบว่าบริเวณยับยั้งที่เกิดจากสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงมีขนาดใหญ่กว่าบริเวณยับยั้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงเล็กน้อย ดังตารางที่ 4-25

ตารางที่ 4-24 น้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของสารสกัดจากการเพาะเลี้ยง CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
48	111.6	47.3
72	116.3	53.8
96	182.4	96.6

ตารางที่ 4-25 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย CDF07 ด้วย ORI medium ในถังหมักที่มีการควบคุมระยะเวลาการหมักต่างๆ

สารสกัด/ยาปฏิชีวนะ	บริเวณยับยั้ง (มม. ± SD)* *V.alginolyticus*
ระยะเวลาหมัก 48 ชั่วโมง	10.8±0.7
ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง	12.8±0.7
ระยะเวลาหมัก 96 ชั่วโมง	12.8±0.3
Chlroamphenicol (30 µg/disc)	32.5±0.07
Tetracycline (30 µg/disc)	34.0±0
DMSO	-

หมายเหตุ : *ปริมาณสารสกัด 2.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดิสก์ 6 มิลลิเมตร
เครื่องหมาย (-) คือ ไม่มีบริเวณยับยั้ง

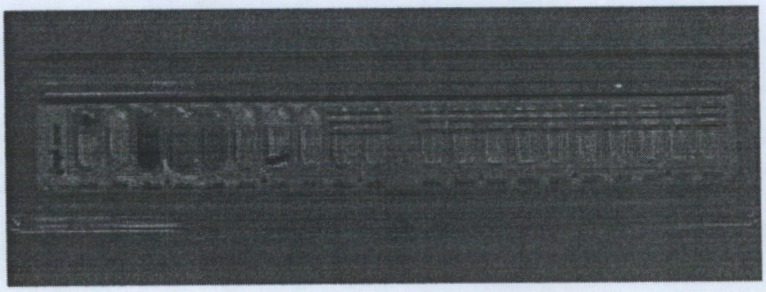
ผลการจำแนกแบคทีเรียรหัส CDF07

ทำการจำแนกแบคทีเรียทะเล CDF07 โดยบันทึกลักษณะโคโลนีที่เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ Catalase test และ Oxidase test พบว่า CDF07 เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่าง irregular rod ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลลบกับการทดสอบคะตะเลสแต่ให้ผลบวกกับการทดสอบออกซิเดส ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-26

ตารางที่ 4-26 ผลการย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียรหัส CDF 07

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
ลักษณะโคโลนี	โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวมัน โคโลนีขนาดเล็ก
Gram's stain	แกรมลบ Irregular
Catalase	-
Oxidase	+

นำผลการทดสอบเบื้องต้นดังกล่าวเลือกชุดทดสอบสำเร็จรูป API ที่เหมาะสมคือAPI 20 NE ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่ประกอบด้วยการทดสอบ 20 การทดสอบ ได้แก่ Nitrate reduction (NO_3), Indole (TRP), Glucose fermentation (GLU),Arginine dihydrolase (ADH),Urease (URE), Esculin hydrolysis (ESC), Gelatin hydrolysis (GEL), β-galactosidase (PNPG), Glucose utilization (GLU), Arabinose utilization (ARA), Mannose utilization (MNE), Mannitol utilization (MAN), N-acetyl glucosamine utilization (NAG), Maltose utilization (MAL), Gluconate utilization (GNT), Caprate utilization (CAP), Adipate utilization (ADI), Malate utilization (MLT), Citrate utilization (CIT) และ Phenyl acetate utilization (PAC) และ Oxidase (OX) พบว่าแบคทีเรีย CDF 07 คือ *Photobacterium* sp. ดังผลการทดสอบในภาพที่ 4-11



ภาพที่ 4-11 ผลการทดสอบ API 20 NE kit ของแบคทีเรีย CDF07

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

สรุป

1. จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศและระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารต้านจุลชีพจากแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลได้แก่ แบคทีเรียรหัส CDF04, SMF04 และ CDF07 โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักพบว่าปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันดังนี้

1.1 แบคทีเรียรหัส CDF04 ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดีใน Marine broth เมื่อควบคุมพีเอชที่ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส มีการกวนที่ 150 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่อัตรา 1 ลิตรต่อนาที

1.2 แบคทีเรียรหัส SMF 04 ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดีใน ORI medium เมื่อควบคุมพีเอชที่ 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการกวนที่ 150 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่อัตรา 1.0 ลิตรต่อนาที

1.3 แบคทีเรียรหัส CDF07 ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดีใน ORI medium เมื่อควบคุมพีเอชที่ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการกวนที่ 100 รอบต่อนาทีและให้อากาศที่อัตรา 1.0 ลิตรต่อนาที

2. สารต้านจุลชีพที่ได้จากการสกัดส่วนน้ำหมักด้วย Ethyl acetate สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ATCC25923 และ *V. alginolyticus* ได้ที่ปริมาณ 0.46-10.0 มิลลิกรัม โดยมีผลต่อ *P. aeruginosa* น้อยที่สุด

3. แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักในสภาวะจำกัดการเจริญ

อภิปรายผล

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพประเภทสารต้านจุลชีพที่ได้จากแบคทีเรียเป็นเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ชนิดที่มีการผลิตเป็นการค้าในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้จากจุลินทรีย์ที่มีแหล่งที่มาจากดิน (Terrestrial microorganisms) แม้ว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพถูกค้นพบแล้วจำนวนมากมายแต่ก็ยังมีความพยายามค้นหาจุลินทรีย์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพจากแหล่งใหม่ๆ อย่างต่อเนื่องซึ่งรวมทั้งการค้นหาจากสิ่งมีชีวิตในทะเล (Davidson, 1995) แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล (Sponge –associated bacteria) เป็นจุลินทรีย์ทะเลอีกประเภทหนึ่งที่ได้รับความสนใจนำมาค้นหาคุณลักษณะในการผลิตสารต้านจุลชีพ โดยทั่วไปขั้นตอนการค้นหาจะเริ่มด้วยการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากฟองน้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไอโซเลตที่ได้มาทดสอบเพื่อคัดกรองหาแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีบนจานเพาะเชื้อ จากนั้นจึงนำสายพันธุ์ที่สนใจมาขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตขนาดใหญ่ขึ้น โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ทั้งปัจจัยทางด้านสารอาหาร และปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมต่อการเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพของสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อให้ได้สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำให้ได้ผลผลิตสารที่สนใจมากที่สุด เพื่อให้ได้สารปริมาณมากเพียงพอสำหรับนำไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาทางด้านเคมีเพื่อหาโครงสร้างของสารตลอดจนศึกษาด้านชีวภาพและเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่น ความเป็นพิษ กลไกการออกฤทธิ์ เป็นต้น

การหาสภาวะการเพาะเลี้ยงเพื่อให้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่สนใจเจริญและสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้ดีนั้นอาจศึกษาในระดับฟลาสก์ หรืออาจศึกษาในถังปฏิกรณ์ หรือถังหมักระดับห้องปฏิบัติการก็ได้ แต่การศึกษาในถังหมักจะสามารถควบคุมสภาวะที่ต้องการศึกษาได้ดีกว่าการศึกษาในฟลาสก์เนื่องจากในชุดถังหมักจะมีส่วนควบคุมสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ต้องการให้คงที่ เช่น อุณหภูมิ พีเอช การผสม ตลอดจนสามารถควบคุมความเข้มข้นออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งในการเพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่มแอโรบิก การกวน (Agitation) และการให้อากาศ (Aeration) เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญที่สุดที่ใช้ในการขยายขนาดการผลิต (Scale-up) และมีผลต่ออัตราการผลิต (Productivity) ของกระบวนการหมัก (Kao และคณะ, 2007) การกวนและการให้อากาศเกี่ยวข้องกับการผสม (Mixing) การถ่ายเทมวลและการถ่ายเทความร้อน (Mass and heat transfer) ภายในถังหมักจึงส่งผลต่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์

ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำที่เก็บจากทะเลในภาคตะวันออกของประเทศไทยจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ รหัส CDF04, SMF04 และ CFD07 โดยแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ผ่านการคัดกรองขั้นต้นแล้วว่าสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดี นำแต่ละสายพันธุ์มาขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีการกวนโดยใช้ระบบการหมักแบบ

แบทช์ โดยศึกษาผลของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ การกวนผสม การให้อากาศ และระยะเวลาการหมัก เพื่อหาสภาวะที่ทำให้แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดีที่สุด สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ Marine broth และ ORI medium โดยการทดลองในแบคทีเรียรหัส CDF04 ใช้อาหาร Marine broth สำหรับแบคทีเรียอีก 2 สายพันธุ์เพาะเลี้ยงด้วย ORI medium ปริมาตรรวมของการหมักคือ 3 ลิตร โดยเติมหัวเชื้อเริ่มต้น (Inoculum) ลงไปในระบบ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยเตรียมหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเพื่อไม่ให้เกิดระยะพัก (Lag phase) ของแบคทีเรียในการเพาะเลี้ยงในถังหมัก โดยทำการวัดการเจริญและการผลิตสารยับยั้งเมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าค่าพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศมีผลต่อทั้งการเจริญและการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของสายพันธุ์ CDF04 โดยมีผลแตกต่างกัน ดังนี้

ในแบคทีเรียรหัส CDF04 พบว่าแบคทีเรียเจริญได้ดีเมื่อควบคุมค่าพีเอชและอุณหภูมิเป็น 7.5 แต่ผลิตสารที่ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีเมื่อควบคุมพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 สำหรับผลของอุณหภูมินั้นพบว่าแบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่สารต้านจุลชีพที่ผลิตเมื่อเพาะเลี้ยงทั้งสองอุณหภูมิมีผลยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ใกล้เคียงกัน แม้ว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเป็นสารประเภททุติยภูมิคือการสังเคราะห์ไม่ขึ้นอยู่กับการเจริญของเชื้อแต่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรียทะเลบางชนิดก็อาจเป็นสารประเภทปฐมภูมิ (Primary metabolite) ตัวอย่างเช่นที่พบใน *Acinetobacter* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากอ่าวเบงกอล (Malay และคณะ, 2006) แต่จากข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสารต้านจุลชีพที่แบคทีเรีย CDF04 ผลิตขึ้นกับการเจริญหรือไม่ ซึ่งควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการหาจลศาสตร์ (Kinetics) ของการเจริญและการผลิตสารต่อไป

สำหรับผลของการกวนและการให้อากาศนั้นเป็นปัจจัยที่ควรทำการศึกษาเนื่องจากการเลี้ยงเชื้อแอโรบิกในอาหารเหลวที่มีปริมาตรมากๆ จำเป็นมีการกวนผสมเพื่อให้น้ำหมักมีความเป็นเนื้อเดียวกันซึ่งจะทำให้แบคทีเรียได้รับสารอาหารและออกซิเจนอย่างทั่วถึง อัตราการกวนที่ใช้ต้องเหมาะสมกับขนาดการเลี้ยงเชื้อเนื่องจากอัตราเร็วที่สูงแม้ว่าจะช่วยเพิ่มการละลายและการกระจายของออกซิเจนและสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ก็ทำให้เกิดอัตราการเฉือน (Shear rate) สูงส่งผลเสียต่อการเจริญของแบคทีเรียทำให้อัตราการเจริญลดลงได้ (Feng และคณะ, 2003) ซึ่งจากข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้พบว่าที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการเจริญน้อยกว่าที่อัตราการกวน 100 และ 150 รอบต่อนาที สำหรับการให้อากาศนั้นจำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแอโรบิกในอาหารเหลวปริมาตรมากเช่นเดียวกัน เนื่องจากออกซิเจนมีอัตราการละลายในของเหลวจำกัดหากไม่มีการพ่นอากาศให้อย่างต่อเนื่องด้วยอัตราที่เหมาะสมในน้ำหมักจะ

ทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนและส่งผลต่อการเจริญของเชื้อได้ Shih, Pan และ Hsieh (2006) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อการเจริญและการสังเคราะห์สารของ *Antrodia cinnamomea* ในการเพาะเลี้ยงแบบ Submerged ในถังหมักที่มีการกวนขนาด 5 ลิตร พบว่าเมื่อเพิ่มออกซิเจนแก่ระบบจะทำให้อัตราการเจริญเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณออกซิเจนสูงมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ Triterpenoid ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดนี้ นอกจากนั้นอัตราการให้อากาศยังควรสอดคล้องกับอัตราการกวนเนื่องจากการกวนด้วยอัตราที่เหมาะสมจะทำให้ออกซิเจนถูกส่งผ่านไปยังแบคทีเรียได้อย่างเหมาะสม ซึ่งจากการศึกษาพบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อนาทีทำให้แบคทีเรีย CDF04 ผลิตสารที่ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุดเมื่อมีการกวนที่อัตรา 150 รอบต่อนาที

จากข้อมูลที่ได้พบว่าในระยะหลังของการศึกษาแบคทีเรียรหัส CDF04 เริ่มสูญเสียความสามารถในการผลิตสารยับยั้งโดยสารที่สกัดได้มีปริมาณลดลง ตัวอย่างเช่น ในการทดลองผลของพีเอชได้สารสกัดจากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.0 ปริมาณ 87.9 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (ตารางที่ 4-1) แต่ได้สารสกัดปริมาณเพียง 36.5 กรัมต่อลิตรในการทดลองระยะหลังที่ศึกษาผลของการให้อากาศ (ตารางที่ 4-9) ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สูญเสียคุณสมบัติในการสังเคราะห์สารยับยั้งเมื่อถ่ายเชื้อหลายๆ ครั้ง เนื่องจากคุณลักษณะหนึ่งของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการนำไปเป็นจุลินทรีย์อตสาหกรรมคือการมีความคงตัวด้านพันธุกรรม ดังนั้นแบคทีเรีย CDF04 จึงไม่น่าสนใจในการนำไปพัฒนาต่อ

สำหรับแบคทีเรียรหัส SMF04 นั้นพบว่าเจริญได้ดีใน ORI medium โดยได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ในช่วง 230.8-483.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ORI medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำทะเลเป็นส่วนผสมดังนั้นจึงช่วยสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียที่มีแหล่งที่มาจากทะเล จากการศึกษาพบว่าพีเอชของ ORI medium มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของ SMF04 แตกต่างกันเช่นเดียวกัน โดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญได้ดีที่พีเอช 6.5 แต่ผลิตสารยับยั้งได้ดีที่พีเอช 7.5 แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์สารต้านจุลชีพของแบคทีเรีย SMF04 ไม่ขึ้นอยู่กับการเจริญเช่ยเดียวกับที่พบในแบคทีเรีย CDF04 นอกจากนั้นการกวนและการให้อากาศก็ให้ผลแตกต่างกันต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เช่นกัน กล่าวคือ แบคทีเรียเจริญได้ดีที่อัตราการกวนต่ำคือ 100 รอบต่อนาที แต่ผลิตสารยับยั้งได้ดีที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาทีซึ่งที่อัตราการกวนนี้การเจริญของแบคทีเรีย SMF04 ลดลงซึ่งน่าจะเกิดจากเซลล์มีความเครียดจากแรงเฉือนของการกวนเช่นเดียวกัน สำหรับผลของการให้อากาศนั้นพบว่าเมื่อให้อากาศที่อัตรา 1.5 ลิตรต่อนาทีแบคทีเรีย SMF04 เจริญได้ดีแต่การผลิตสารยับยั้งเกิดขึ้นได้ดีที่อัตราการให้อากาศ

1.0 ลิตรต่อนาที ดังนั้นจึงสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าแบคทีเรีย SMF04 ผลิตสารยับยั้งได้ดีในสภาวะที่การเจริญจำกัดเช่นเดียวกับในกรณีของสายพันธุ์ CDF04

ในกรณีของแบคทีเรีย CDF07 พบว่าสามารถเจริญได้ดีใน ORI medium เช่นเดียวกัน และจากการศึกษาผลของพีเอช การกวน การกวนและการให้อากาศพบว่าปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งได้แตกต่างกัน กล่าวคือ แบคทีเรียสายพันธุ์นี้เจริญได้ใกล้เคียงกันที่ช่วงพีเอช 7.0-8.5 แต่การผลิตสารยับยั้งเกิดขึ้นได้ดีที่พีเอช 7.0 เท่านั้น ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าการสังเคราะห์สารยับยั้งของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เกิดขึ้นในช่วงพีเอชที่แคบกว่าช่วงพีเอชสำหรับการเจริญ สำหรับผลของการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตราต่างๆ พบว่าค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารแตกต่างกัน โดยแบคทีเรีย CDF07 เจริญได้ดีที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 200 รอบต่อนาทีการเจริญจะลดลงซึ่งคาดว่าเกิดจากความเครียดของเซลล์เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว ในขณะที่การสังเคราะห์สารยับยั้งของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เกิดขึ้นได้ดีที่อัตราการกวนต่ำ คือ 100 รอบต่อนาที นอกจากนั้นยังพบว่าแบคทีเรียมีการเจริญสูงเมื่อให้อากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่อัตรา 1.0 ลิตรต่อนาทีแต่ผลิตสารยับยั้งได้ดีที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อนาที จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สังเคราะห์สารในสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเช่นเดียวกับอีก 2 สายพันธุ์ที่กล่าวมาแล้ว

ระยะเวลาการหมักมีผลต่อการผลิตมวลเซลล์และการผลิตสารต้านจุลชีพของแบคทีเรีย CDF07 โดยพบว่าที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 48 ชั่วโมงแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่แล้วเช่นเดียวกับในกรณีของแบคทีเรีย CDF04 ที่กล่าวมาแล้ว โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อจาก 48 ชั่วโมงเป็น 96 ชั่วโมง แบคทีเรียจะมีการเจริญและผลิตสารสกัดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่สารสกัดที่ได้ให้ผลการยับยั้งใกล้เคียงกับที่ได้จากระยะเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นระยะเวลา 48 ชั่วโมงจึงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียจากฟองน้ำที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียรหัส SMF04 ทำการจัดจำแนกได้เป็น *Brevibacterium* sp. ในขณะที่แบคทีเรียรหัส CDF07 คือ *Photobacterium* sp.โดย *Brevibacterium* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพได้ เช่น มีรายงานว่า *Brevibacterium* ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์ผลิตสารต้านจุลชีพยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้ (Al-Admawy และ Noble, 1981) และ *Brevibacterium linens* ที่แยกได้จากชีส ผลิต linenscin OC2 ที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อโรคทางอาหาร เช่น *S. aureus* และ *Listeria monocytogenes* ได้แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ (Maisnier-Patin และ Richard, 1995) เป็นต้น สำหรับ *Photobacterium* นั้น เป็นแบคทีเรียทะเลชอบเค็ม (Halophilic bacteria) บางสายพันธุ์อยู่

ร่วมกับสัตว์ทะเลแบบ symbiosis (http://en.wikipedia.org/wiki/Photobacterium) บางสายพันธ์ก่อโรคในสัตว์ทะเล เช่น ปลา (http://en.wikipedia.org/wiki/Photobacterium_damselae_ssp_piscicida) แต่ยังไม่มีรายงานการผลิตสารต้านจุลชีพในแบคทีเรียสกุลนี้

จากการศึกษาทั้งหมดจะเห็นได้ว่าปัจจัยทางการเพาะเลี้ยงมีผลต่อทั้งการเจริญและการผลิตสารต้านจุลชีพในถังหมักของแบคทีเรียจากฟองน้ำทุกสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งเท่านั้นเนื่องจากยังมีอีกหลายปัจจัยที่มีผลเช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น ปัจจัยด้านสารอาหาร ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน รวมทั้งวิตะมินและธาตุอาหารชนิดต่างๆ นอกจากนั้นยังควรศึกษาแบบของการหมักที่ทำให้ได้ผลผลิตสารยับยั้งสูงสุด มีรายงานว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จากจุลินทรีย์มักถูกสังเคราะห์ในระยะการเจริญคงที่ ดังนั้นหากทำให้ระยะการเจริญดังกล่าวยืดขยายออกไปอาจทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้นก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านจลศาสตร์การเจริญและการสังเคราะห์สารยับยั้งของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ก่อนเพื่อให้สามารถควบคุมการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

Al-Admawy, A.M. and Noble, W. (1981). Antibiotic production by cutaneous *Brevibacterium* sp. *Journal of Applied Bacteriology*, 51, 535-540.

Besson, F., Chevanet, C. and Michel, G. (1987). Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology,* 133, 767-772.

Chen, Y., Krol, J., Sterkin, V., Fan, W., Yan, X., Huang, W., Cino, J. and Julien, C. (1999). New process control strategy used in a rapamycin fermentation. *Process Biochemistry*, 34, 383-389.

Feng, Y., He, Z., Ong, S.L., Hu, J., Zhang, Z. and Ng, W.J. (2003). Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum β-mannanase production. *Enzyme and Microbial technology*. 32:282-289.

Davidson, B.S. (1995). New dimensions in natural products research:cultured marine microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 6:284-291.

Jamil, B., Hasan, F., A, H. and Ahmed, S. (2007). Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 20, 26-31.

Jha R.K. and Zi-rong X. (2004). Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drugs*, 2, 123-146.

Kao, P.-M., Chen, C.-I., Huang, S.-C., Chang, Y.-C., Tsai, P.-J., and Liu, Y.-C. (2007). Effect of shear stress and mass transfer on chitinase production by Paenibacillus sp. CHE-N1. *Biochemical Engineering Journal*, 34, 172-178.

Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganism. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 74, 151-170.

Large, K.P., Ison, A.P., Williams, D.J. (1998). The effect of agitation rate on lipid utilization and calvulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Biotechnology*, 63, 111-119.

Lee, Y.K., Lee, J.H. and Lee, H.K. (2001). Microbial symbiosis in marine sponges. *The Journal of Microbiology*, 39, 254-264.

Liang, J., Xu, Z., Liu, T., Lin, J. and Cen, P. (2008). Effect of cultivation condition on the production of natamycin with *Streptomyces gilvosporeus* LK-196. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(2), 145-150.

Maisnier-Patin, S. and Richard, J. (1995). Activity and purification of linenscin OC2, an antibacterial substance produced by *Brevibacterium linens* OC2, an orange cheese coryneform bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1847-1852.

Malay, S., Parasuraman, J., Satadal, D., Kalyan, S., Soma, R., Shila, B., Josep, V., Debashish, G., Barindra, S. and Joydeep, M. (2006). Production and purification of a bioactive substance inhibiting multiple drug resistant bacteria and human leukemia cells from a salt-tolerant marine *Acinetobacter* sp. isolated from the Bay of Bangal. *Biotechnology Letters*. 28:1083-1088.

Padma, P.N., Rao, A.B., Yadav, J.S. and Reddy, G. (2002). Optimization of fermentation condition for production of glycopeptide antibiotic vancomycin by *Amycolatopsis orientalis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102-103, 395-405.

Pfefferle, C., Theobald, U., Gurtler, H. and Fiedler, H.P. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of Biotechnology*, 80, 135-142.

Proksch, P., Edrada, R.A., and Ebel, R. (2002). Drug from the seas-current status and microbiological implication. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 125-134.

Shioya, S., Morikawa, M., Kajihara, Y. and Shimizu, H. (1999). Optimization of agitation and aeration condition for maximum virginiamycin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 164-169.

Shih, I.-L., Pan, K. and Hsieh, C. (2006). Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*. 41:1129-1135.

Yegneswaran, PK., MR, G. and BG, T. (1991). Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentations. *Biotechnology Progress*, 7, 246-250.

Yegneswaran, P.K., Gray, M.R., Thompson, B.G. (1991). Experimental simulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: effect on *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 38, 1203-1209.

Yu, J., Liu, Q., Liu, Q., Liu, X., Sun, Q., Yan, J., Qi, X. and Fan, S. (2008). Effect of liquid

culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresoure Technology*, 99, 2087-2091.

http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04_01.pdf. Identification of *Corynebacterium* (API Coryne). Retrieved on 13 August, 2008.

http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04_03.pdf. Identification of non-enteric Gram-negative rods (API 20NE). Retrieved on 13 August, 2008.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Marine broth (Difco)

มีส่วนผสมต่อลิตรดังนี้

Bacto peptone	5.0	กรัม
Bacto yeast extract	1.0	กรัม
Ferric citrate	0.1	กรัม
Sodium chloride	19.45	กรัม
Magnesium chloride	8.8	กรัม
Sodium sulfate	3.24	กรัม
Calcium chloride	1.8	กรัม
Sodium bicarbonate	0.16	กรัม
Potassium bromide	0.08	กรัม
Strontium chloride	0.034	กรัม
Boric acid	0.022	กรัม
Sodium silicate	0.004	กรัม
Sodium fluoride	0.0024	กรัม
Ammonium nitrate	0.0016	กรัม
Disodium phosphate	0.008	กรัม

Final pH 7.6±0.2 at 25°C

ละลายส่วนผสมในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร กวนส่วนผสมทั้งหมดให้ละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้ได้ตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ORI Medium (Ocean Research Institute)

มีส่วนผสมต่อลิตรดังนี้

Proteose peptone	1.0	กรัม
Yeast Extract	1.0	กรัม
Soytone	0.5	กรัม

Sodium thiosulfate	0.2	กรัม
Sodium sulfite	0.05	กรัม
Ferric citrate 2 %	0.1	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
Sea water	900	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

pH 7.5 -7.6 at 25°C

ละลายส่วนผสมในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร กวนส่วนผสมทั้งหมดให้ละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ให้ได้ตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรณีทำเป็น ORI agar ใส่ agar 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับ pH แล้ว ให้ความร้อนจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tryptic Soy Broth (Difco)

มีส่วนผสมต่อลิตรดังนี้

Trypticase peptone	17.0	กรัม
Phytone peptone	3.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

pH 7.3 ± 0.2 at 25°C

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร กวนส่วนผสมทั้งหมดให้ละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้ได้ตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Mueller-Hinton Agar (Difco)

มีส่วนผสมต่อลิตรดังนี้

Beef, infusion from	300	กรัม
Acidicase Peptone (BBL)		
or Casamino Acids (Difco)	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17.0	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

พีเอช 7.3 ± 0.2 at 25°C

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร กวนส่วนผสมทั้งหมดให้ละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้ได้ตามต้องการด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สีย้อมแกรม

1.1 Gram's crystal violet มีส่วนประกอบดังนี้

Crystal violet	2.0	กรัม
เอทธิลแอลกอฮอล์	20.0	มิลลิลิตร

ให้ทำการละลาย Crystal violet ในเอทธิลแอลกอฮอล์

1.2 Gram's iodine มีส่วนประกอบดังนี้

Iodine , C.P	1.0	กรัม
Potassium Iodide, C.P (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ผสม Iodine และ Potassium Iodide ในโกร่ง ใช้สากบดให้ละเอียด แล้วจึงค่อยเติมน้ำกลั่นลงไป ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับน้ำน้ำกลั่น

1.3 Gram's alcohol มีส่วนประกอบดังนี้

Ethyl alcohol	98	มิลลิลิตร
Acetone	2	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งสองผสมให้เข้ากัน

1.4 Gram's safanin มีส่วนประกอบดังนี้

Safranin (2.5%solution in 95% ethyl alcohol)	17.9	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งสองผสมให้เข้ากัน

น้ำยาทดสอบ Catalase test

Hydrogen peroxide	3	เปอร์เซ็นต์

น้ำยาทดสอบ Oxidase test

น้ำยา Oxidase

0.85% NaCl มีส่วนประกอบดังนี้

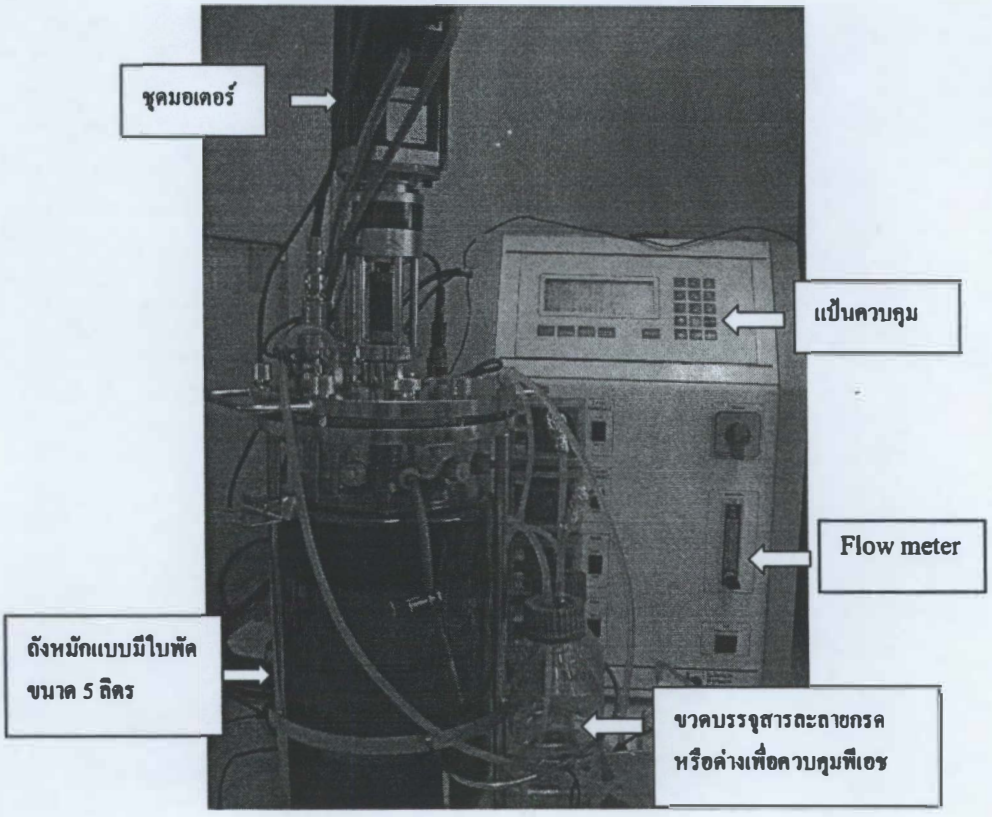
Sodium Chloride	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

ชุดถังหมัก

ชุดถังหมักที่ใช้ทำการทดลองประกอบด้วยถังหมักขนาด 5 ลิตรพร้อมใบพัด 3 ชุด และชุดควบคุมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ พีเอช ความเร็วรอบการกวนและอัตราการให้อากาศ ดังภาพที่ ค-1



ภาพที่ ค-1 ชุดถังหมักพร้อมชุดควบคุมที่ใช้ในการทดลอง

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป

API (Analytical Profile Index) เป็นชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูปสำหรับระบุกลุ่มของแบคทีเรียที่คล้ายคลึงกัน ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแห้ง (Dehydrated media) ที่เมื่อเติม Bacterial suspension ลงไปและบ่มเพาะเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสามารถอ่านค่าเป็นผลบวกหรือผลลบได้ ซึ่งผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทำให้สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้

การทดสอบ API มีขั้นตอนทั่วไปดังนี้

1) การเตรียม Suspension ของแบคทีเรีย โดยทั่วไปมักเตรียมใน 0.85% NaCl โดยปรับความขุ่นให้ได้ค่าตามต้องการโดยเทียบกับ McFarland barium sulfate standard
2) การเพาะเชื้อใน API strip ที่ประกอบด้วยช่องบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ
3) การบ่มเพาะเชื้อ โดยทั่วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง
4) การอ่านผลแต่ละการทดสอบเป็น + หรือ - โดยอาจอ่านผลการเปลี่ยนแปลงโดยตรงหรือหลังจากเติม Reagent ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละการทดสอบ
5) การแปรผล โดยใช้ Software เฉพาะเพื่อหา % Similarity

API 20NE

เป็นชุดทดสอบทางชีวเคมีประกอบด้วย 20 การทดสอบ สำหนับจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม non-fastidious Gram-negative rods ที่ไม่ใช่ Enterobacteriaceae ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Moraxella* และ *Aeromonas* เป็นต้น

ส่วนประกอบของ API 20NE strip และการอ่านผลบวกและผลลบแสดงรายละเอียดในตารางที่ ค-1

ตารางที่ ค-1 การทดสอบทางชีวเคมีและการอ่านผลบวกและผลลบของชุดทดสอบ API 20NE

TESTS	SUBSTRATES	REACTONS/ENZYMES	NEGATIVE RESULTS	POSITIVE RESULTS
N03	Potassium nitrate	NITrate reduction to nitrites	**NIT 1 + NIT 2 / 5 min** colourless	pink-red
		NITrates to nitrogen	**Zn / 5 min** pink	colourless
TRP	tryptophane	indole production	**JAMES / immediate** colourless / pale green / yellow	pink
GLU	glucose	Acidification	blue to green	yellow
ADH	arginine	arginine dihydrolase	yellow	orange/pink/red
URE	urea	Urease	yellow	orange/pink/red
ESC	esculin	hydrolysis (β-glucosidase)	yellow	grey/brown/black
GEL	gelatine(with India ink)	hydrolysis(protease)	no pigment diffusion	diffusion of black pigment
PNPG	p-nitrophenyl-β-Dgalactopyranoside	β-galactosidase	colourless	yellow
[GLU]	glucose	Assimilation	transparent	opaque
[ARA]	arabinose	Assimilation	transparent	opaque
[MNE]	mannose	Assimilation	transparent	opaque
[MAN]	mannitol	Assimilation	transparent	opaque
[NAG]	N-acetyl-glucosamine	Assimilation	transparent	opaque
[MAL]	maltose	Assimilation	transparent	opaque
[GNT]	gluconate	Assimilation	transparent	opaque
[CAP]	caprate	Assimilation	transparent	opaque
[ADI]	adipate	Assimilation	transparent	opaque
[MLT]	malate	Assimilation	transparent	opaque
[CIT]	citrate	Assimilation	transparent	opaque
[PAC]	phenyl-acetate	Assimilation	transparent	opaque
OX	oxidase test	cytochrome oxidase	colorless/ light purple	dark purple

ที่มา: http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04_03.pdf

API Coryne

เป็นชุดทดสอบทางชีวเคมีสำหรับบจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม Gram-positive irregular rods ไม่สร้างสปอร์ ได้แก่ *Corynebacterium, Propionibacterium, Listeria* และ *Brevibacterium* เป็นต้น ประกอบด้วย 20 การทดสอบ การทดสอบและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อมีการเจริญของเชื้อแสดงรายละเอียดในตารางที่ ค-2

ตารางที่ ค-2 การทดสอบทางชีวเคมีและการอ่านผลบวกและผลลบของชุดทดสอบ API Coryne

TESTS	REACTONS/ENZYMES	NEGATIVE RESULTS	POSITIVE RESULTS
NIT	NITrate reduction	**NIT A + NIT B** (10 mn) Colourless Very pale pink	 Dark pink Red
PYZ	PYraZinamidase	**PYZ** (10 mn)	
		Colourless Very pale brown Very pale orange	Brown Orange
PyrA	Pyrrolidonyl Arylamidase	**ZYM A +ZYM B** PyrA → B NAG (10 mn)	
PAL	Alkaline Phosphatase	Colourless Beige-pale purple Pale orange	Purple
βGUR	Beta GlucURonidase	Colourless Pale grey Pale beige	Blue
βGAL	Beta GALactosidase	Colourless Beige-pale purple	Purple
□ GLU	Alpha GLUcosidase	Colourless Beige-pale purple Pale green	Purple
BNAG	N-Acetyl-B Glucosaminidase	Colourless Beige-pale purple Pale brown Pale grey	Brown
ESC	ESCulin (β Glucosidase)	Colourless Grey	Black
URE	UREase	Yellow Orange	Red Pink
[GEL]	GELatine (hydrolysis)	No diffusion of black pigment	Diffusion of black pigment
O GLU RIB XYL MAN MAL LAC SAC GLYG	**Control (Fermentation)** GLUcose } RIBose } XYLOSE } MANnitol } Fermentation MALtose } LACtose } Sucrose } GLYcoGen }	Red Orange	Yellow Yellow-orange
CAT	CATalase (ESC or GEL test)	H2O2 3% 1 min	
		No bubbles	Bubbles

ที่มา: http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04_01.pdf