

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

- 1.1 เครื่องเหวี่ยงหนีแรงศูนย์กลาง (centrifuge) [ALC: 4236]
- 1.2 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave) [Hiramaya]
- 1.3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) [Faster: Bio48]
- 1.4 เครื่องคนสารด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer) [GEM: MS101]
- 1.5 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) [Binder: BD]
- 1.6 เครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) [Büchi]
 - ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) [V-500]
 - เครื่อง Rotavapor [R-200]
 - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heating bath) [B490]
- 1.7 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV viewer) [Spectroline]
- 1.8 เครื่องเขย่าแนวราบ (rotary shaker) [Taitec: NR-2]
- 1.9 เครื่องผสมแบบเขย่า (vortex mixer) [Vortex : Vortex-2 Genie]
- 1.10 เครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) [Thermo Separation Products]
 - เครื่องจ่ายตัวทำละลาย (Solvent supply) [TSP]
 - ปั๊ม (pump) [TSP Spectra System : P1500]
 - อินเจกเตอร์ (injector) [Rheodyne : 7125NS]
 - เครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV detector) [Spectra System : UV2000]
 - คอลัมน์ (column) [Waters Spherisorb S5ODS2 : HiCHROM]
ความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.635 เซนติเมตร
 - คอลัมน์ป้องกัน (guard column) [S10ODS2 : HiCHROM]
- 1.11 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) [Flexi-Dry : μ P]
- 1.12 เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance spectrometer: NMR) [VARIAN^{unity} INOVA] ความถี่ 400 เมกะเฮิรตซ์ (MHz)

1.13 เครื่องผลิตคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) [Crest]

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์สำหรับการสกัดและแยกสาร

2.1.1 หลอดสำหรับเครื่องเหวี่ยงหนีแรงศูนย์กลาง (centrifuge tube) [Nalgene]

ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.1.2 พาสเจอร์ไพเปตต์ (pasteur pipette)

2.1.3 ขวดใส่สาร (vial with rubber liner top) ขนาด 4 และ 8 มิลลิลิตร

2.1.4 คอลัมน์แก้ว (glass column) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 21 มิลลิเมตร ความยาว 40 เซนติเมตร

2.1.5 แผ่นโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ เคลือบด้วยซิลิกาเจล 60 ผสมสารเรืองแสง ฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (TLC plates Silica gel 60 F₂₅₄) [Merck : 105719]

2.1.6 กระดาษกรอง PTFE ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร รูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร [Millopore]

2.1.7 คอลัมน์สำเร็จรูปบรรจุตัวดูดซับ florisil (Sep-Pak cartridge) [Waters]
ขนาด 3 มิลลิลิตร

2.1.8 ปากคีบ (forceps)

2.1.9 กรรไกร (scissors)

2.1.10 ใยแก้ว (glass wool)

2.1.11 โถดูดความชื้น (desiccators)

2.1.12 หลอดแก้วคาพิลลารี (capillary tube)

2.1.13 กระบอกฉีดตัวอย่างสำหรับเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง (microsyringe for HPLC)

2.1.14 หลอดเอ็นเอ็มอาร์ (NMR tube) [Wilmad : 507-PP] ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ความยาว 7 นิ้ว

2.2 อุปกรณ์สำหรับการทดสอบการยับยั้งจุลชีพ

2.2.1 กระดาษกรอง (filter paper disc) [Whatman] ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 และ 13 มิลลิเมตร

2.2.2 กระดาษทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะสำเร็จรูป (antimicrobial susceptibility test disc) [Oxoid] บรรจุสาร Penicillin G ความเข้มข้น 10 unit และ Polymyxin B ความเข้มข้น 300 unit

2.2.3 จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาด 95 มิลลิเมตร

2.2.4 เข็มฉีดยา (needle)

2.2.5 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

2.2.6 หลอดเก็บรักษาตัวอย่างภายใต้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (cryotube) [Nunc] ขนาด 1.8 มิลลิลิตร

2.2.7 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 20-200, 200-1,000 และ 1,000-5,000 ไมโครลิตร

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีสำหรับการสกัดและแยกสาร

3.1.1 คลอโรฟอร์ม-ดิวเทอเรียม (chloroform-d : CDCl_3) [Sigma-Aldrich : 151823]

3.1.2 เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) [Mallinckrodt : V569]

3.1.3 เอทิลแอซิเตต (ethyl acetate : $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) [Fisher Chemicals : E/0900/17]

3.1.4 กลีเซอริน (glycerin : $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) [BHD : no.101186M]

3.1.5 นอร์แมลเฮปเทน (n-heptane : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$) [Fisher Chemicals : H/0160/07]

3.1.6 เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol : CH_3OH) [BHD : 101586B] และ commercial grade

3.1.7 โทลูอีน (toluene : $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$) [BHD : 102846G]

3.1.8 ซิลิกาเจล 60 (silica gel 60 : SiO_2) [Merck : 107754] อนุพันธ์ขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร

3.2 สารเคมีสำหรับการศึกษาลักษณะของแบคทีเรีย

3.2.1 คริสตัลไวโอเลต (crystal violet)

3.2.2 สารละลายไอโอดีน (iodine solution)

3.2.3 สารละลายแอลกอฮอล์อะซิโตน (acetone alcohol)

3.2.4 ซาฟรานิน โอ (safranin O)

3.2.5 มาลาไคต์กรีน (malachite green)

3.2.6 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide : H_2O_2)

3.2.7 เทตรามethyl-para-phenylenediamine (tetramethyl-p-phenylenediamine)

3.2.8 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride : NaCl) [Univar]

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ.

4.1 Tryptic Soy Broth (TSB) [Merck : no. 105459]

4.2 Potato Dextrose Agar (PDA) [Merck : no. 110130]

4.3 Marine Broth (MB) [Difco : Difco2216]

4.4 วนเลี้ยงเชื้อ (Agar)

5. เชื้อจุลินทรีย์

5.1 จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์

5.1.1 แบคทีเรียแกรมบวก

Bacillus cereus ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bacillus subtilis DMST 15896

Enterococcus faecalis DMST 4736

Staphylococcus aureus DMST 8840

5.1.2 แบคทีเรียแกรมลบ

<i>Enterobacter aerogenes</i>	DMST 8841
<i>Escherichia coli</i>	DMST 7948
<i>Salmonella Typhimurium</i>	DMST 562
<i>Vibrio cholerae</i>	DMST 2873

5.1.3 เชื้อราและยีสต์

<i>Aspergillus niger</i>	DMST 15538
<i>Candida albicans</i>	DMST 5815
<i>Microsporum gypseum</i>	DMST 19736
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	DMST 19735

5.2 จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งกุลาดำ

<i>Vibrio cholerae</i>	สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
<i>Vibrio fluvialis</i>	สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
<i>Vibrio harveyi</i>	สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

5.3 จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในพืช

<i>Xanthomonas campestris</i>	DOA 1802
<i>Rolstonia solanacearum</i>	DOA 1861
<i>Erwinia caratovora</i>	DOA 1596

หมายเหตุ

DMST = Department of Medical Sciences Type culture collection, Thailand
(ศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข)

DOA = Department of Agriculture, Thailand
(ศูนย์เก็บจุลินทรีย์โรคพืช กรมวิชาการเกษตร)

วิธีการ

การศึกษาระดับชั้นจูลชีพจากฟองน้ำทะเลและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกัน ประกอบไปด้วยขั้นตอนการศึกษา 3 ขั้นตอนหลัก คือ การคัดเลือกชนิดของฟองน้ำที่สร้างสารยับยั้งจุลชีพ จากนั้นนำฟองน้ำที่มีคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งจุลชีพได้ดีที่สุดและยับยั้งได้ในวงกว้าง มาทำการแยกหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ รวมทั้งทำการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์จากฟองน้ำดังกล่าว เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารยับยั้งจุลชีพได้ดี เพื่อให้เป็นทางเลือกของแหล่งสารที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาใช้ประโยชน์ทางยา รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกัน โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

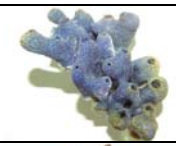
1. การคัดเลือกชนิดของฟองน้ำที่สร้างสารยับยั้งจุลชีพ

การคัดเลือกชนิดของฟองน้ำที่สร้างสารยับยั้งจุลชีพ เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญ เพราะการค้นหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลชีพ เป็นขั้นตอนที่มีค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานานในการศึกษา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคัดเลือกฟองน้ำที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลชีพได้ดีและยับยั้งในวงกว้างที่สุดให้ได้ก่อน แล้วจึงนำไปแยกหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป โดยมีวิธีการศึกษาดังนี้

1.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บฟองน้ำในเดือนมกราคม พ.ศ. 2548 จากบริเวณแนวปะการัง หมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด โดยวิธีการดำน้ำแบบ SCUBA (Self Contained Underwater Breathing Apparatus) และ snorkeling ที่ระดับความลึก 2 – 10 เมตร ซึ่งมีจุดเก็บตัวอย่าง 3 จุด คือ เกาะหม้อ เกาะรัง และเกาะช้าง ได้ตัวอย่างฟองน้ำจำนวน 19 ชนิด และเก็บตัวอย่างจากอวนจมน้ำ แหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี ได้ตัวอย่างฟองน้ำจำนวน 9 ชนิด รวมตัวอย่างจากทั้ง 2 สถานที่ คือ 28 ชนิด ซึ่งฟองน้ำแต่ละชนิดมีรูปร่างแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 5 เก็บตัวอย่างฟองน้ำมาตัวอย่างละประมาณ 20 กรัม บรรจุใส่ถุงเก็บตัวอย่างและแช่เย็นในน้ำแข็ง เพื่อนำไปสกัดต่อไป

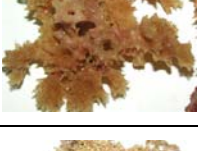
ตารางที่ 5 ลักษณะรูปร่างของฟองน้ำจากหมู่เกาะช้าง จังหวัดตราด และจากอวนจมนู แหลมเสด็จ จังหวัดจันทบุรี

รหัส	ภาพถ่ายอย่าง	แหล่งที่เก็บ	สี	ลักษณะของฟองน้ำ
Chang 01		เกาะหม้อ	น้ำเงิน	ท่อน้ำออกจำนวนมาก โผล่ยื่นออกมาจากโคโลนีสลายนี้อูม ลำตัวนุ่ม
Chang 02		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	ชมพู	ท่อน้ำออกจำนวนมาก โผล่ยื่นออกมาจากโคโลนีที่เป็นแผ่นบางแข็ง
Chang 03		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	น้ำตาล	มีเมือกลื่นสีดำ ผิวขรุขระ และมีความเหนียว มีเปลือกหอยและเศษหินฝังอยู่ตามลำตัว
Chang 04		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	เขียว	เป็นแผ่นแบนบาง นึกขาดได้ง่าย ผิวคล้ายกำมะหยี่
Chang 05		เกาะรัง	ดำ	เป็นก้อนเล็ก ๆ มีความเหนียว มีเมือกลื่นสีเหลือง
Chang 06		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	ส้ม	เป็นแผ่นหนาประมาณ 0.5 - 1 เซนติเมตร ลำตัวนุ่ม
Chang 07		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	ดำ	เป็นเส้นยาว มีความเหนียว มีเมือกลื่นสีเหลือง
Chang 08		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	น้ำตาล	เป็นก้อน ลำตัวมีท่อน้ำจำนวนมาก โผล่ยื่นออกมาจากโคโลนี
Chang 09		เกาะหม้อ	ดำ	เป็นก้อน มีความเหนียว ลำตัวบางส่วนยื่นออกมาเป็นริ้ว ผิวเรียบ
Chang 10		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	น้ำตาล	เป็นก้อน มีความเหนียว ผิวมีรูพรุนเป็นจำนวนมาก

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัส	ภาพถ่ายอย่าง	แหล่งที่เก็บ	สี	ลักษณะของฟองน้ำ
Chang 11		เกาะหม้อ	เขียว	รูปร่างเป็นก้อนเล็ก ๆ ผิวขรุขระ ลำตัวนุ่ม
Chang 12		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	น้ำตาล	รูปร่างเป็นก้อน ลำตัวเหนียวนุ่ม พบรูท่อน้ำออกมากมาย
Chang 13		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	น้ำตาล	เป็นแผ่นหนา ลำตัวเหนียว ผิวมันและ ขรุขระ
Chang 14		เกาะหม้อ	ดำ	เป็นแผ่นหนา ลำตัวนุ่ม พบรูท่อน้ำ ออกมากมาย เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 -4 เซนติเมตร
Chang 15		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	ชมพู	รูปร่างเหมือนแฉก มีท่อน้ำออก ขนาดใหญ่ตรงกลางหนึ่งท่อ คล้าย ปากปล่องภูเขาไฟ
Chang 16		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	ดำ	รูปร่างเป็นเส้นยาว ลำตัวนุ่ม
Chang 17		เกาะรัง	ดำ	รูปร่างเป็นก้อน ส่วนปลายมีริ้วยื่นยาว ออกมาลักษณะคล้ายนิ้ว มีความ เหนียว
Chang 18		เกาะหม้อ	น้ำตาล	ท่อน้ำออกจำนวนมาก โผล่ยื่นออกมา จากโคโลนี ลำตัวเหนียวนุ่ม ผิวคล้าย กำมะหยี่
Chang 19		ท่าเรือ หมู่เกาะช้าง	ดำ	รูปร่างเป็นก้อน มีความเหนียว ผิวมัน เรียบ

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รหัส	ภาพตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	สี	ลักษณะของฟองน้ำ
Sadej 01		แหลมเสด็จ	ส้ม	เป็นก้อน มีท่อน้ำออกยื่นออกมา ยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร เห็นช่องเปิดชัดเจน
Sadej 02		แหลมเสด็จ	น้ำตาล	ท่อน้ำออกแตกออกเป็นแฉกขดไปมา ลักษณะเป็นหลอด ๆ ผิวคล้ายกำมะหยี่
Sadej 03		แหลมเสด็จ	แดง	ผิวลำตัวมีลักษณะคล้ายหนาม ผิวมัน มีความเหนียว เป็นแผ่นบาง มีเมือกใสเหนียว
Sadej 04		แหลมเสด็จ	เหลือง	เป็นก้อน มีรูพรุนเป็นจำนวนมาก ผิวขรุขระ มีเม็ดทรายแทรกตามลำตัว
Sadej 05		แหลมเสด็จ	ม่วง	ลักษณะเป็นกิ่ง แผ่นบาง ๆ ผิวขรุขระ และมีความเหนียว
Sadej 06		แหลมเสด็จ	ม่วง	เป็นก้อน ผิวมีลักษณะเป็นริ้ว ๆ ขรุขระ และมีความเหนียว
Sadej 07		แหลมเสด็จ	น้ำตาล	ลักษณะเป็นโคโลนีเล็ก ๆ มาต่อกัน พบท่อน้ำออกชัดเจน การเรียงตัวของโครงสร้างลำจุนคล้ายตาข่าย
Sadej 08		แหลมเสด็จ	น้ำตาล	มีลักษณะคล้ายดอกไม้เรียงต่อกันเป็นก้อน รอบท่อน้ำออกมีการเรียงตัวของโครงสร้างลำจุนคล้ายตาข่าย
Sadej 09		แหลมเสด็จ	น้ำตาล	เป็นก้อน มีผิวขรุขระ และมีความเหนียว มีเปลือกหอยและเศษหินฝังตัวอยู่ตามลำตัว

1.2 การเตรียมสารสกัดจากฟองน้ำ

นำฟองน้ำมาแยกสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของฟองน้ำออก แล้วล้างฟองน้ำด้วยน้ำจืด ปล่อยให้แห้งในที่ร่ม (air drying) จากนั้นชั่งน้ำหนักฟองน้ำแต่ละชนิดมา 5 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในหลอดสำหรับเครื่องเหวี่ยงหนีแรงศูนย์กลาง แล้วสกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทิลแอลกอฮอล์และโทลูอินในอัตราส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร โดยเติมสารผสมดังกล่าว ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในหลอดเพื่อสกัดฟองน้ำตามวิธีของ McCaffrey and Endean (1985) จากนั้นบดเนื้อเยื่อฟองน้ำด้วยแท่งแก้วคนให้ละเอียดเพื่อช่วยในการสกัด ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วจึงนำไปแยกเอาส่วนของสารละลายที่สกัดได้ออกจากกากของฟองน้ำ ด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีแรงศูนย์กลางที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใช้พาสเจอร์ปีเปตต์ดูดสารสกัดส่วนที่ได้ซึ่งอยู่ด้านบน (supernatant) ใส่ขวดเก็บสาร (ภาพที่ 3) นำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็งเพื่อรอนำไปใช้ในการทดสอบการยับยั้งจุลชีพต่อไป

1.3 การทดสอบการยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากฟองน้ำ

นำสารสกัดจากฟองน้ำที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2 มาทดสอบการยับยั้งจุลชีพ 19 ชนิด ซึ่งจุลชีพที่นำมาทดสอบแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ 12 ชนิด จุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในกิ้งกูดดำ 4 ชนิด และจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคในพืช 3 ชนิด ทำการทดสอบด้วยวิธี Disk Diffusion ตามวิธีของ Acar and Goldstein (1996) จำนวน 3 ซ้ำ (replication) โดยขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งจุลชีพ มีดังต่อไปนี้ (ภาพที่ 4)

1.3.1 การเตรียมจุลชีพในอาหารเหลว

นำ stock culture ของจุลชีพทั้ง 19 ชนิด มาเพาะขยายเชื้อในอาหารเหลว (culture broth) โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์และพืชใช้อาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในกิ้งกูดดำใช้อาหาร TSB ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเชื้อราและยีสต์ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ใช้อาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) โดยเพาะเชื้อแต่ละชนิดลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าแนวราบที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ใช้เวลาเลี้ยง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ

ของโรคในกุ้งกุลาดำและพีชใช้เวลาเลี้ยง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อรา และยีสต์ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ใช้เวลาเลี้ยง 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

1.3.2 การเตรียมจานเลี้ยงเชื้อในการทดสอบการยับยั้งจุลชีพ

เตรียมอาหารแข็งสำหรับการทดสอบ โดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลชีพแต่ละกลุ่มกับวุ้นเลี้ยงเชื้อร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใส่ลงในขวดรูปกรวย ขวดละ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อ แล้ววางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิของอาหารแข็งเย็นลงถึงอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จึงเติมเชื้อจุลชีพที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3.1 ลงไป 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เชื้อและอาหารเข้ากันดีด้วยเครื่องผสมแบบเขย่า (vortex mixer) แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ วางทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว



3.1



3.2



3.3



3.4

ภาพที่ 3 ขั้นตอนการสกัดสารจากฟองน้ำ

3.1 ผึ่งฟองน้ำให้แห้ง

3.2 ตัดฟองน้ำให้มีขนาดเล็ก

3.3 ฟองน้ำที่ถูกสกัดด้วยสารละลายผสม

3.4 เก็บสารละลายส่วนใสของฟองน้ำ

1.3.3 การเตรียมกระดาษทดสอบการยับยั้งจุลชีพ

วางเรียงกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ โดยเรียงตามจำนวนสารสกัดฟองน้ำและจำนวน จุลชีพที่ต้องการทดสอบ จากนั้นใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารสกัดฟองน้ำที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2 มา ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ค่อย ๆ หยดลงบนกระดาษกรอง แล้วทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ ตัวทำลายระเหยออกไปจนหมด

1.3.4 การทดสอบ

ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้ว คีบกระดาษทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3.3 นำไปวาง บนจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3.2 กดเบา ๆ เพื่อให้กระดาษทดสอบยึดติดกับผิวของอาหารแข็ง โดยวางกระดาษทดสอบ 6 แผ่นต่อจานเลี้ยงเชื้อ 1 จาน โดยมีกระดาษทดสอบที่ใช้เป็นตัวควบคุม ในการทดลอง คือ Polymyxin B ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ Penicillin G ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และกระดาษทดสอบที่หยดสารละลายผสมระหว่าง เมทิลแอลกอฮอล์และโทลูอีนในอัตราส่วน 3 : 1 โดยปริมาตร ใส่ลงในทุกจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำจาน เลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ จะบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในกิ้งกูดดำ และพืช จะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราและยีสต์ที่เป็น สาเหตุของโรคในมนุษย์ จะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3.5 การตรวจสอบการยับยั้งจุลชีพและการบันทึกผล

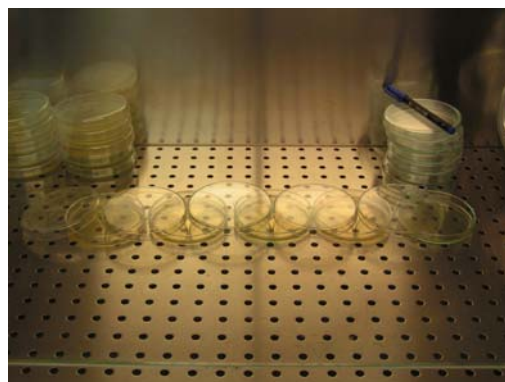
สารสกัดจากฟองน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพ จะสังเกตเห็นบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ซึ่งเกิดจากการยับยั้งจุลชีพ โดยมีลักษณะเป็นวงใสรอบ ๆ กระดาษทดสอบ การบันทึกผลจะวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่ปรากฏขึ้น

2. การแยกสารบริสุทธิ์ที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพจากสารสกัดของฟองน้ำ

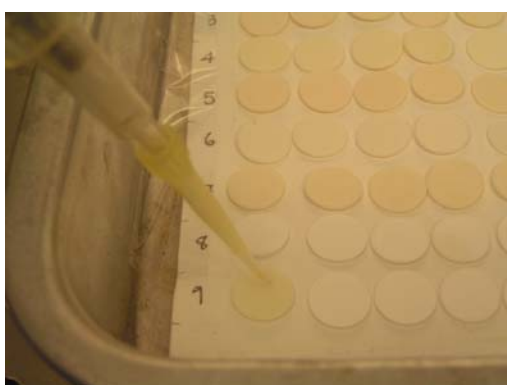
คัดเลือกสารสกัดจากฟองน้ำที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพได้ดี และออกฤทธิ์ในวงกว้าง มาทำการแยกหาสารบริสุทธิ์ที่คาดว่าทำหน้าที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างแท้จริง ซึ่งฟองน้ำที่ คัดเลือกนำมาใช้ในการศึกษากครั้งนี้ คือ ฟองน้ำสีน้ำเงิน รหัส Chang 01 เก็บได้จากเกาะหม้อ หมูเกาะช้าง จังหวัดตราด จากการศึกษาและเปรียบเทียบตัวอย่างฟองน้ำ Chang01 กับข้อมูล



4.1



4.2



4.3



4.4



4.5



4.6

ภาพที่ 4 ขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากฟองน้ำ

4.1 เตรียมจุลชีพในอาหารเหลว

4.2 เตรียมจานเลี้ยงเชื้อจุลชีพ

4.3 เตรียมกระดาศทดสอบที่หยด
สารสกัด

4.4 วางกระดาศทดสอบลงบน
จานเลี้ยงเชื้อ

4.5 นำจานเลี้ยงเชื้อไปป่มในตู้บ่มเชื้อ
ควบคุมอุณหภูมิ

4.6 บริเวณยับยั้งจุลชีพ

การศึกษาแพร่กระจายและความหลากหลายของฟองน้ำในหมู่เกาะช้าง (จักรี และคณะ, 2547) และจากการสอบถาม ดร.สุเมตต์ ปุจฉาการ นักวิทยาศาสตร์ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา พบว่าฟองน้ำดังกล่าว คือ ฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ซึ่งจะต้องทำการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม พร้อมทั้งทำการแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการยับยั้งจุลชีพจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ สำหรับขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดฟองน้ำมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

2.1 การเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

เก็บตัวอย่างฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. เพื่อนำไปสกัดและแยกสารบริสุทธิ์ โดยเก็บตัวอย่างฟองน้ำมา 1,050 กรัม เก็บรักษาโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การสกัดฟองน้ำ

นำฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. มาล้างทำความสะอาด แล้วตัดเนื้อเยื่อฟองน้ำเป็นชิ้นขนาดเล็ก แยกเศษหินและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อฟองน้ำออกให้หมด จากนั้นนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วสกัดด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ 1.5 ลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน ทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง นำสารสกัดที่ได้มารวมกัน กรองแยกส่วนของเนื้อเยื่อฟองน้ำและสารละลาย แล้วนำสารที่สกัดได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) 28.54 กรัม คิดเป็นร้อยละ 2.72 ของน้ำหนักฟองน้ำ จากนั้นละลายสารสกัดหยาบที่ได้ด้วยเอทิลเอซิเตต และดูดใส่ในขวดเก็บสาร นำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง (ภาพที่ 5)

2.3 การแยกสารสกัดโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography)

ทำการแยกสารสกัดฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยแยกสารประกอบในสารสกัดหยาบของฟองน้ำออกเป็นสารสกัดส่วนย่อย (fraction) แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ และศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบของสารด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ และโครมาโตแกรมจากเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป สำหรับขั้นตอนการแยกมีดังนี้ (ภาพที่ 6)



5.1



5.2

ภาพที่ 5 วิธีเตรียมสารสกัดหายาจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp.

5.1 การสกัดฟองน้ำในเมทิลแอลกอฮอล์ 5.2 การทำสารสกัดให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่น
ระเหยแห้งระบบสุญญากาศ

2.3.1 การเตรียมคอลัมน์

ชั่งซิลิกาเจล 60 ที่มีรูพรุนขนาด 0.063 - 0.200 มิลลิเมตร มา 60 กรัม แล้วเทผสมกับนอร์แมลเฮปเทน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจนไม่มีฟองอากาศ ซึ่งจะเรียกซิลิกาเจลที่เตรียมได้นี้ว่า slurry ค่อย ๆ เติม slurry ลงไปในคอลัมน์แก้วที่อุดปลายด้วยใยแก้ว แล้ววางกระดาษกรองทับบนผิวหน้าของคอลัมน์ เพื่อป้องกันการรบกวนผิวหน้าของคอลัมน์

2.3.2 การเตรียมสารสกัดจากฟองน้ำที่จะแยกและวิธีการบรรจุสารลงในคอลัมน์

ละลายสารสกัดจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. น้ำหนักแห้ง 5.4 กรัม ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 5 มิลลิลิตร แล้วเติมซิลิกาเจล 60 ลงไป 2 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปประเหยเอาตัวทำละลายออกจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ จากนั้นจึงค่อย ๆ บรรจุลงบนผิวหน้าของคอลัมน์ โดยใช้ช้อนขนาดเล็กคีบใส่ลงผ่านกรวยแก้วที่ปลายอยู่ใกล้กับบริเวณผิวหน้าของ slurry เกลี่ยให้สารที่จะทำการแยกมีผิวหน้าเรียบสม่ำเสมอ

2.3.3 การแยกสาร

เตรียมสารละลายผสมของวัฏภาคไหล (mobile phase) ที่ค่อย ๆ เพิ่มลำดับความเป็นขั้วจากความเป็นขั้วต่ำไปจนถึงลำดับความเป็นขั้วสูง เตรียมสารละลายผสมตัวอย่างละ 150 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันโดยปริมาตร ดังนี้



6.1



6.2

ภาพที่ 6 ขั้นตอนการแยกสารสกัดจากฟองน้ำโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์

6.1 สารสกัดจากฟองน้ำที่ถูกแยกออกมาจากการชะด้วยวัฏภาคไหล

6.2 สารสกัดส่วนย่อยจากโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่มีความเป็นขั้วต่ำ

นอร์แมลเฮปเทน

นอร์แมลเฮปเทน : โทลูอิน = 3 : 1

นอร์แมลเฮปเทน : โทลูอิน = 1 : 1

นอร์แมลเฮปเทน : โทลูอิน = 1 : 3

โทลูอิน

โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1

โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 1 : 1

โทลูอิน : เอทิลเอซีเตต = 1 : 3

เอทิลเอซีเตต

เอทิลเอซีเตต : เมทิลแอลกอฮอล์ = 3 : 1

เอทิลเอซีเตต : เมทิลแอลกอฮอล์ = 1 : 1

เอทิลเอซีเตต : เมทิลแอลกอฮอล์ = 1 : 3

เมทิลแอลกอฮอล์

จากนั้นค่อย ๆ ใส่อัตราการไหลลงไปในคอลัมน์ ให้สารละลายทำการชะ (elute) สารสกัดแยกออกเป็นลำดับส่วน โดยเริ่มต้นจากนอร์แมลเฮปเทน จากนั้นเปิดก๊อกที่ปลายคอลัมน์ ให้อัตราการไหลเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีขวดรูปกรวยมารองรับที่ปลายก๊อก

ทำเช่นเดียวกันนี้กับทุกสารละลายผสมจนถึงเมทิลแอลกอฮอล์

2.3.4 การเก็บสารสกัดส่วนย่อย

เก็บสารสกัดส่วนย่อย (fraction) แต่ละส่วน ซึ่งได้จากการชะด้วยสารละลายผสมตามลำดับในข้อ 2.3.3 โดยดูความแตกต่างจากสีของสารที่ถูกชะออกมา ซึ่งสามารถแยกสารสกัดส่วนย่อยได้ทั้งหมด 25 ส่วนย่อย จากนั้นนำสารสกัดส่วนย่อยแต่ละส่วนไปประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ ละลายสารดังกล่าวด้วยเอทิลเอซีเตต แล้วดูใส่ในขวดเก็บสาร นำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็งต่อไป

2.4 การคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้จากโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ เพื่อนำไปแยกสารบริสุทธิ์

นำสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้จากวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์จำนวน 25 ส่วนย่อยไปทดสอบหาคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ และศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อย โดยวิเคราะห์จากโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ และศึกษาการแยกได้ของสารเบื้องต้นโดยศึกษาจากโครมาโตแกรม ที่ได้จากการแยกสารด้วยเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยไปทำการแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยขั้นตอนการคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยดังนี้

2.4.1 การคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ

นำสารสกัดส่วนย่อย 25 ส่วนย่อย มาทำการทดสอบการยับยั้งจุลชีพ 18 ชนิด ดังวิธีการทดสอบในข้อ 1.3 โดยหยดสารสกัดส่วนย่อยลงบนกระดาษทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ให้มีปริมาณของสารสกัดส่วนย่อย 100 ไมโครกรัมต่อกระดาษทดสอบ 1 แผ่น

2.4.2 การตรวจสอบองค์ประกอบของสารโดยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ

นำสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้จากโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ มาศึกษาความแตกต่างขององค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อยแต่ละส่วน ซึ่งจะปรากฏเป็นจุด (spot) มากน้อยตามจำนวนของสารประกอบที่มีอยู่ในสารสกัดส่วนย่อยนั้น ๆ โดยสังเกตจุดของสารภายใต้แสงธรรมชาติ และแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมแผ่นโครมาโตกราฟแบบแผ่นเคลือบ

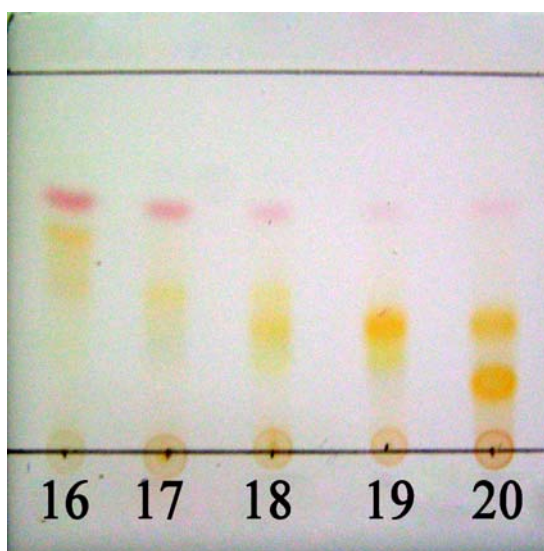
ตัดแผ่นโครมาโตกราฟแบบแผ่นเคลือบ ให้ได้ขนาด 5 x 5 เซนติเมตร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บไว้ในโถดูดความชื้น

2) ทำการแยกสารสกัดส่วนย่อยบนแผ่นโครมาโตกราฟแบบแผ่นเคลือบ

โดยนำสารสกัดส่วนย่อยจากข้อ 2.3.4 จำนวน 25 ส่วนย่อย ไปทำให้เข้มข้น โดยการเป่าตัวทำละลายให้ระเหยออกด้วยก๊าซไนโตรเจนบริสุทธิ์ จากนั้นนำหลอดแก้วคาพิลลารีที่ดึงปลายให้แหลม ดูดสารสกัดส่วนย่อยหยดลงบนแผ่น TLC ให้ได้จุดขนาดเล็กประมาณ 2.5 มิลลิเมตร โดยในแผ่น TLC แต่ละแผ่นจะหยดสารสกัดส่วนย่อยได้ 5 ส่วนย่อย จากนั้นปล่อยให้แห้ง นำแผ่น TLC ที่หยดสารสกัดส่วนย่อย วางลงในอ่าง TLC ที่อิ่มตัวด้วยวัฏภาคไหลผสมระหว่าง นอร์แมลเฮกเซนและเอทิลแอซีเตต ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร โดยให้วัฏภาคไหลเคลื่อนที่บนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 3.5 เซนติเมตร

3) การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อย

ตรวจสอบองค์ประกอบของสารในแต่ละสารสกัดส่วนย่อย โดยสังเกตจากจุดที่ปรากฏขึ้นบนแผ่น TLC ภายใต้แสงธรรมชาติ (ภาพที่ 7) จากนั้นนำแผ่น TLC ไปส่องด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร วาดรูปเพื่อแสดงจำนวนและตำแหน่งของจุดสารแต่ละจุดที่ปรากฏขึ้น เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบที่มีอยู่ในสารแต่ละส่วนที่แยกได้



ภาพที่ 7 โครมาโตแกรมที่แยกได้ด้วย TLC แสดงให้เห็นองค์ประกอบของสารที่แตกต่างกัน

2.4.3 การตรวจสอบโครมาโตแกรมโดยเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง

นำสารสกัดส่วนย่อยที่แยกด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ที่แสดงคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพไปทำการแยกด้วย HPLC (ภาพที่ 8) เพื่อตรวจสอบฟิสิกส์ที่ปรากฏ รวมทั้งศึกษาว่าสารสกัดส่วนย่อยส่วนใดที่มีความเป็นไปได้ในการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์มากที่สุด ดังมีรายละเอียดดังนี้

1) สภาพการแยกสาร

วัฏภาคไหลที่ใช้ในการชะสาร คือ สารละลายผสมเมทิลแอลกอฮอล์และน้ำ ในอัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1 มิลลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ Waters Spherisorb S5 ODS2 ตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะเวลาในการวิเคราะห์ 25 นาที

2) การเตรียมสารสกัดส่วนย่อยและการวิเคราะห์ตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดแต่ละส่วนย่อยให้มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยละลายในเมทิลแอลกอฮอล์ กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง PTFE ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์โครมาโตแกรม โดยฉีดสารละลายที่ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่อินเจกเตอร์ด้วยกระบอกฉีดตัวอย่างสำหรับเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง



ภาพที่ 8 เครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง

3.) การตรวจสอบความแตกต่างขององค์ประกอบของสารสกัดส่วนย่อย

เปรียบเทียบความแตกต่างขององค์ประกอบ จากค่าการดูดกลืนแสง อัลตราไวโอเลต จำนวนของพีคที่ปรากฏ และการแยกของพีคต่าง ๆ ในสารสกัดส่วนย่อยจาก โครมาโตแกรม เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในคัดเลือกสารสกัดส่วนย่อยที่จะนำไปแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป

2.5 การแยกสารให้บริสุทธิ์

จากการตรวจสอบคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ การตรวจสอบองค์ประกอบของสาร โดยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ และโครมาโตแกรมจากเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟี ระบบแรงดันสูง นำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาว่าสารสกัดส่วนย่อยส่วนใด มีคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ ได้ดี และมีองค์ประกอบของสารหลักที่น่าจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แท้จริง ซึ่งสามารถที่จะ นำมาแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ ซึ่งสารสกัดส่วนย่อยที่น่าสนใจและนำมาแยกให้บริสุทธิ์ได้ มี 3 ส่วนย่อย คือ

- NEO_COMBINE_1 : เป็นการรวมสารสกัดส่วนย่อย รหัส NEO_CC_08 และ NEO_CC_09
- NEO_COMBINE_2 : เป็นการรวมสารสกัดส่วนย่อย รหัส NEO_CC_10 และ NEO_CC_11
- NEO_COMBINE_3 : เป็นการรวมสารสกัดส่วนย่อย รหัส NEO_CC_12, NEO_CC_13 และ NEO_CC_14

โดยนำสารสกัดส่วนย่อยที่นำมารวมกันใหม่แต่ละส่วน มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย เครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง และคอลัมน์สำเร็จรูป ซึ่งมีวิธีดังนี้

2.5.1 การแยกสารบริสุทธิ์จาก NEO_COMBINE_1 และ NEO_COMBINE_3 ด้วย เครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง

นำสาร NEO_COMBINE_1 และ NEO_COMBINE_3 มาทำการแยกสาร เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 2.4.3 โดยมีสถานะการแยก คือ ใช้สารละลายผสมระหว่างเมทิล-แอลกอฮอล์และน้ำ ในอัตราส่วน 7 : 3 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคไหลที่ใช้ในการชะสาร โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แยกสารด้วยคอลัมน์ Waters Spherisorb S5 ODS2 ตรวจสอบค่าการ

ดูดกลืนแสงด้วยเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะเวลาในการวิเคราะห์ 25 นาที เตรียมสารสกัดส่วนย่อยในเมทิลแอลกอฮอล์

การเก็บสารสกัดส่วนย่อยที่ได้จากเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบ แรงดันสูง โดยจะเก็บสารเป็นสารสกัดส่วนย่อย ตามลักษณะพีคที่ปรากฏบนโครมาโตแกรม ซึ่งจะพิจารณาจากช่วงเวลาที่ (retention time) ของพีค (peak) ที่มีอำนาจการแยก (resolution) สูง โดยเมื่อถึงเวลาของสารที่ต้องการจะเก็บ จะนำขวดสำหรับเครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศมา รองรับสารสกัดส่วนย่อยที่ถูกชะออกมา จากนั้นนำสารสกัดส่วนย่อยที่ได้ ไปทำให้เข้มข้นด้วย เครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ ละลายสารดังกล่าวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แล้วเก็บใส่ขวด เก็บสาร จากนั้นนำสารสกัดส่วนย่อยที่คาดว่าจะบริสุทธิ์ และสารสกัดส่วนย่อยทั้งหมดที่ได้จาก เครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูงไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ เพื่อตรวจหาสาร บริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพที่แท้จริง

2.5.2 การแยกสาร NEO_COMBINE_2 ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ คอลัมน์สำเร็จรูป

เนื่องจากสาร NEO_COMBINE_2 มีโครมาโตแกรมที่ปรากฏองค์ประกอบของ สารจำนวนไม่มาก เพื่อแยกให้ได้สารปริมาณมาก และใช้เวลาในการแยกไม่นาน จึงนำสาร NEO_COMBINE_2 มาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์สำเร็จรูป (ภาพที่ 9) โดยมีวิธีการดังนี้

1) การเตรียมคอลัมน์

นำคอลัมน์สำเร็จรูป Sep-Pack cartridge ขนาด 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีฟลอริซิล (Florisil) เป็นตัวดูดซับ ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นใน โถดูดความชื้น

2) การเตรียมสารที่จะแยกและวิธีการบรรจุสารลงในคอลัมน์

นำสาร NEO_COMBINE_2 น้ำหนักสาร 18.5 มิลลิกรัม ละลายในเอทิล- แอซีเตต 2 มิลลิลิตร และใส่ซิลิกาเจล 60 ลงไป 0.2 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำไปประเหยเอาตัวทำ ละลายออกจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ จะได้สารที่เคลือบอยู่บนซิลิกาเจล จากนั้นจึงบรรจุลงบนผิวหน้าของคอลัมน์

3) การแยกสาร

ดูดสารละลายผสมของวัฏภาคไหลลงไปในคอลัมน์อย่างละ 15 มิลลิลิตร โดยลำดับของสารผสมมีอัตราส่วนโดยปริมาตรดังนี้

นอร์เมลเฮปแทน

นอร์เมลเฮปแทน : เอทิลเอซีเตต = 9 : 1

นอร์เมลเฮปแทน : เอทิลเอซีเตต = 5 : 1

นอร์เมลเฮปแทน : เอทิลเอซีเตต = 3 : 1

เอทิลเอซีเตต

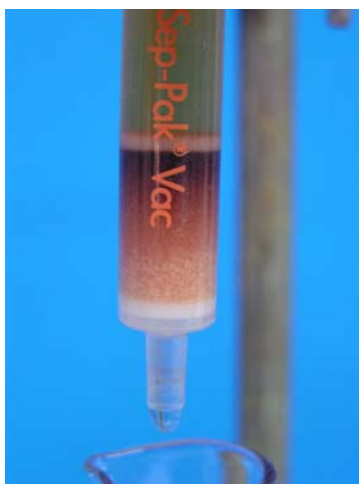
เมทิลแอลกอฮอล์

4) การเก็บสารที่แยกได้

เก็บสารส่วนย่อยที่แยกได้แต่ละส่วน โดยดูจากความแตกต่างของสีของสารที่ถูกชะออกมา นำสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแห้งระบบสุญญากาศ ละลายสารดังกล่าวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แล้วนำสารสกัดส่วนย่อยทั้งหมดไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ เพื่อตรวจสอบหาสารสกัดส่วนย่อยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพที่แท้จริง และนำสารสกัดส่วนย่อยที่คาดว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ตรวจสอบโครมาโตแกรมด้วย HPLC ว่ามีฟีดของสารปนเปื้อนอื่น ๆ หรือไม่ ก่อนนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมี

2.5.3 การทดสอบการยับยั้งจุลชีพของสารบริสุทธิ์

นำสารสกัดส่วนย่อยที่ได้จากการแยกสาร NEO_COMBINE_1, NEO_COMBINE_2 และ NEO_COMBINE_3 มาทดสอบกับจุลชีพกลุ่มที่ถูกยับยั้งโดยสารสกัดส่วนย่อยที่นำมาแยกสารบริสุทธิ์ ดังวิธีการทดสอบในข้อ 1.3 โดยเตรียมกระดาศทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ให้มีปริมาณของสารบริสุทธิ์ 100 ไมโครกรัมต่อกระดาศทดสอบ 1 แผ่น



ภาพที่ 9 การแยกสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์สำเร็จรูป

2.6 การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์

หลังจากแยกสารสกัดฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ด้วยคอลัมน์สำเสร็จรูปและเครื่องแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีระบบแรงดันสูง จนได้สารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลชีพแล้ว นำสารบริสุทธิ์ดังกล่าวมาตรวจหาโครงสร้างทางเคมี โดยวิธีโปรตอน-เอ็นเอ็มอาร์ ด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

2.6.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม-คิวเทอริยม ประมาณ 0.7 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดเอ็นเอ็มอาร์ ปรับความสูงของสารละลายในหลอดให้สูง 4.0 เซนติเมตร ปิดจุกหลอดและพันด้วยพาราฟิล์ม นำหลอดตัวอย่างส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการเอ็นเอ็มอาร์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เทคนิคที่ทำการวิเคราะห์ คือ โปรตอน-เอ็นเอ็มอาร์ 1 มิติ ($^1\text{H-NMR}$, 1D Experiments)

2.6.2 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์

ศึกษาโดยนำสเปกตรัมของโปรตอน-เอ็นเอ็มอาร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ ไปเปรียบเทียบกับเอกสารงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาในอดีต

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำที่สร้างสารยับยั้งจุลชีพ

จากการคัดเลือกฟองน้ำที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลชีพ พบว่าฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลชีพได้ดีและออกฤทธิ์ได้ในวงกว้าง จึงทำการศึกษาคูณสมบัติการยับยั้งจุลชีพของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

3.1 การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อฟองน้ำ

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บฟองน้ำ ขนาดประมาณ 5 x 5 x 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในถุงเก็บตัวอย่าง ผนึกปากถุงได้นำให้สนิทเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อในอากาศ แล้วนำกลับมาแยกแบคทีเรีย

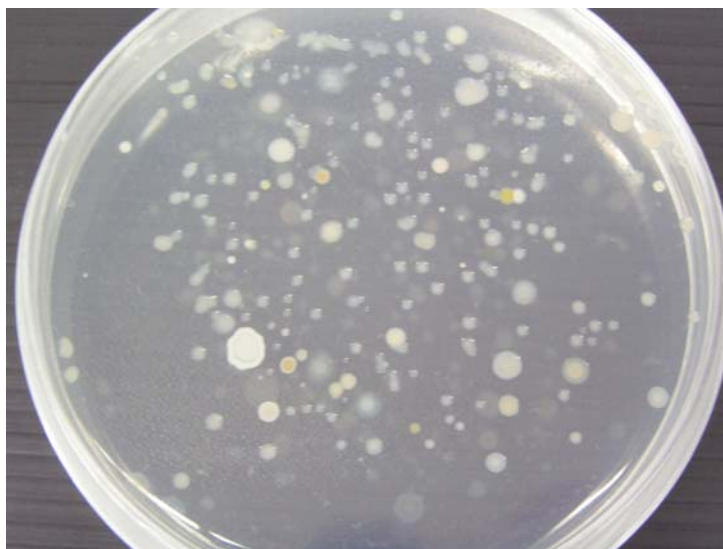
ในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง ภายในตู้ปลอดเชื้อที่จำลองขึ้นมา

3.1.2 การแยกแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อฟองน้ำ

ขั้นตอนการแยกเชื้อทั้งหมด ทำตามเทคนิคการปลอดเชื้อ (aseptic technique) เริ่มจากนำฟองน้ำมาล้างด้วยน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากฟองน้ำให้หมด จากนั้นใช้กรรไกรขนาดเล็กตัดฟองน้ำ โดยเลือกเอาเนื้อเยื่อฟองน้ำด้านในให้ได้ทรงลูกบาศก์ขนาดประมาณ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำฟองน้ำที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำทะเลฆ่าเชื้อบรรจุอยู่ 5 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนบดเนื้อเยื่อฟองน้ำให้ละเอียด เพื่อให้แบคทีเรียที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อฟองน้ำหลุดออกมา แล้วนำหลอดทดลองดังกล่าวไปเขย่าด้วยเครื่องผสมแบบเขย่า เพื่อให้เนื้อเยื่อฟองน้ำกระจายเป็นเนื้อเดียวกันทั่วทั้งหลอด เจือจางสารละลายเนื้อเยื่อฟองน้ำที่บดจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนได้ความเข้มข้น 1/10 , 1/100 และ 1/1000 ตามลำดับ ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดส่วนที่เป็นน้ำของสารละลายเนื้อเยื่อฟองน้ำแต่ละความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง MA เกลี่ยให้กระจายทั่วด้วย spreader นำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

3.1.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

หลังจากที่แยกบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน บนอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อ จะมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลากหลายชนิดปะปนอยู่ (ภาพที่ 10) จะต้องทำการแยก (isolate) เชื้อแบคทีเรียที่ได้ออกมาจนได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ชนิดเดียว เริ่มจากเลือกโคโลนีที่แยกออกมาเดี่ยว ๆ โดยสังเกตจากสี รูปร่างของโคโลนี ผิวหน้าของโคโลนี และบริเวณที่เกิดการยับยั้งรอบโคโลนี แล้วใช้เข็มเย็บเชื้อที่เป็นปลายตรง แตะที่โคโลนีของแบคทีเรียที่เลือกไว้ นำไปเจือลงบนอาหารแข็ง MA จากนั้นใช้เข็มเย็บเชื้อที่เป็นปลายกลม streak เชื้อแบคทีเรียให้ทั่วบนอาหารแข็ง แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเต็มที่ จากนั้นสังเกตดูว่ามีโคโลนีของแบคทีเรียชนิดอื่นขึ้นปะปนอยู่อีกหรือไม่ หากมีให้ทำการแยกซ้ำต่อไป (reisolate) จนกว่าจะได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2542) จากนั้นจึงเก็บลงในหลอดเก็บรักษาตัวอย่าง (cryotube) ที่บรรจุอาหารเหลว Marine Broth โดยมีกลีเซอรอลเป็นส่วนผสมร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารเหลว นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 10 แบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp.

3.2 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งจุลชีพ

นำแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำสีน้ำเงิน *Neopetrosia* sp. ในขั้นตอนที่ 3.1 มาทำการทดสอบการยับยั้งจุลชีพ โดยดัดแปลงจากวิธี agar overlay method (Anand *et al.*, 2006) ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

3.2.1 การเตรียมแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ

นำเข็มเย็บเชื้อและโคโลนีของแบคทีเรียบริสุทธิ์ แล้วนำมา spot ลงบนอาหารแข็ง MA (ภาพที่ 11) ในจานเพาะเชื้อ 1 จาน จะ spot เชื้อได้ 10 เชื้อ จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จะสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตขึ้นบนอาหารแข็ง

3.2.2 การเตรียมจุลชีพสำหรับทดสอบการสร้างสารยับยั้งจุลชีพ

เตรียมจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคทั้ง 19 ชนิด โดยเลี้ยงลงในอาหารเหลวของจุลชีพแต่ละกลุ่ม ตามวิธีการเดียวกับในข้อ 1.3.1



ภาพที่ 11 การ spot แบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำเพื่อทดสอบการยับยั้งจุลชีพ

3.2.3 วิธีการทดสอบแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ

นำเชื้อจุลชีพสาเหตุของโรคที่เตรียมในข้อ 3.2.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (semi-solid medium) ที่ผสมวุ้นเลี้ยงเชื้อร้อยละ 0.75 ของปริมาณอาหาร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสมแบบเขย่า จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งดังกล่าวเททับลงบนอาหารแข็งที่ทำการ spot แบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำ ซึ่งได้เตรียมไว้ในข้อ 3.2.1 แล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ โดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ จะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคใน กุ้งกุลาดำและฟิช จะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราและ ยีสต์ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ จะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.4 การตรวจสอบการยับยั้งจุลชีพ

แบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำซึ่งมีคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพ จะสังเกตเห็นบริเวณ ยับยั้งเกิดขึ้นบริเวณรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียที่ spot เชื้อไว้ (ภาพที่ 12) นำแบคทีเรียที่มีการ ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพไปศึกษาลักษณะเบื้องต้นต่อไป



ภาพที่ 12 ลักษณะของบริเวณยับยั้งจุลชีพรอบโคโลนีของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ

3.3 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพ มาศึกษาลักษณะเบื้องต้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดกลุ่มของแบคทีเรีย และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกัน ไปทำการสกัดสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อทดสอบการยับยั้งจุลชีพต่อไป โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

3.3.1 การเคลื่อนที่ (motility)

นำลวดเย็บเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารยับยั้งจุลชีพที่ต้องการทดสอบ แทะลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ MA กึ่งแข็งที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเคลื่อนที่โดยดูจากการเจริญของแบคทีเรีย หากแบคทีเรียไม่เคลื่อนที่จะเห็นแบคทีเรียเจริญเติบโตเฉพาะในแนวที่เข็มเย็บเชื้อแทงผ่านลงไปเท่านั้น แต่ถ้าแบคทีเรียมีการเคลื่อนที่ จะเห็นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแผ่กระจายออกมารอบแนวที่เข็มเย็บเชื้อแทงลงไป (ดัดแปลงวิธีจาก พงษ์เทพ, 2540)

3.3.2 การย้อมแบบแกรมและการจำแนกรูปปร่าง

เตรียมรอยสเมียร์และตรึงเซลล์ที่มีอายุประมาณ 12-16 ชั่วโมงด้วยความร้อน จากนั้นหยดสีย้อมแบคทีเรียคริสตัลไวโอเลตให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีที่เหลือทิ้งบนสไลด์ลงในอ่าง แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอยสเมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์อาซีโตน จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมาแล้วล้างน้ำทันที ย้อมทับอีกครั้งด้วยสีย้อมแบคทีเรียซาฟรานินโอให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากเป็นแกรมบวกผนังเซลล์จะติดสีม่วง หากเป็นแกรมลบผนังเซลล์จะติดสีแดง (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2542)

3.3.3 การย้อมสีเพื่อตรวจสอบการสร้างเอนโดสปอร์

เตรียมรอยสเมียร์และตรึงเซลล์ที่มีอายุประมาณ 12-16 ชั่วโมงด้วยความร้อน จากนั้นหยดสีมาลาโคด์กรีนให้ทั่วรอยสเมียร์ แล้วนำไปอังบนไอน้ำประมาณ 10 นาที จนครบเวลา 10 นาที คอยเติมสีย้อมให้แห้งจนครบเวลาที่ต้องการ เมื่อสไลด์เย็นแล้ว นำไปล้างสีออกด้วยน้ำ แล้วย้อมทับด้วยสีย้อมแบคทีเรียซาฟรานินโอลงไปให้ทั่วบริเวณรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา ซับให้แห้งนำไปตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2542)

3.3.4 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

ใช้วิธี Kovacs' method โดยการวางกระดาษกรองที่อิมมิดด้วย เททราเมทิล-พารา-ฟีนิลลินไดเอมีน เข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงในงานเลี้ยงเชื้อ ใช้หลอดเชื้อเชื้อออกมาทดสอบ โดยลากโคโลนีไปมาบนกระดาษ ถ้าให้ผลบวกจะเกิดสีม่วงเข้มภายใน 10 วินาที (ดวงพร, 2537)

3.3.5 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส

ใช้วิธี plate test (slide method) โดยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร จำนวน 1 หยดลงบนสไลด์ ใช้หลอดเชื้อเชื้อลงไปทำการผสมให้เข้ากัน ถ้าให้ผลบวกจะเกิดฟองแก๊ส ถ้าให้ผลลบจะไม่มีฟอง (ดวงพร, 2537)

3.3.6 ความสามารถในการเจริญเติบโตในความเค็มต่าง ๆ (halophilicity test)

เตรียมอาหาร TSA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปร้อยละ 1, 2, 3, 5, 8 ของ ปริมาตรอาหาร แบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็น 8 ช่อ จากนั้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อลากโคโลนีแบคทีเรียที่ ต้องการทดสอบลงบนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ปริมาณที่แตกต่างกัน ตรวจสอบการเจริญเติบโตของ แบคทีเรียบนอาหาร

3.4 การเตรียมสารสกัดจากแบคทีเรีย

เตรียมสารสกัดจากแบคทีเรียเพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ โดยคัดเลือกแบคทีเรีย ที่มีการยับยั้งจุลชีพได้ดีที่สุด และมีลักษณะที่แตกต่างกัน นำมาเลี้ยงลงในอาหารเหลว จากนั้นทำ การสกัดและนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพด้วยวิธี Disk Diffusion โดยมีขั้นตอน การศึกษาดังนี้ (ภาพที่ 13)

3.4.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกจนบริสุทธิ์แล้ว ทำการถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลอง ที่มีอาหารเหลว MB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้การเขย่าในแนวนอน ความเร็วประมาณ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน แล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MB 30 มิลลิลิตร เพื่อ เพาะขยายเชื้อให้ได้ปริมาณมาก โดยนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 25 องศา-เซลเซียส ภายใต้การเขย่าในแนวนอนเป็นเวลา 3 วัน

3.4.2 การสกัดสารจากแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MB จากข้อ 3.4.1 ไปทำให้แห้งด้วย วิธีแช่เยือกแข็ง (freeze dried) แล้วนำไปสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมจนได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่องผลิตคลื่นเสียงความถี่สูง ประมาณ 10 นาที เพื่อช่วยเพิ่ม ประสิทธิภาพในการสกัด นำไปแยกสารสกัดออกจากเซลล์แบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย เครื่องเหวี่ยงหนีแรงศูนย์ถ่วง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จะได้สารละลายที่ แยกออกเป็น 2 ชั้น ทำการดูดสารละลายส่วนบน (supernatant) ใส่ในหลอดเก็บสาร (microtube) นำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง



13.1



13.2



13.3



13.4



13.5



13.6

ภาพที่ 13 ขั้นตอนการสกัดสารจากแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำ

13.1 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว

13.2 เตรียมตัวอย่างแบคทีเรียด้วยการ
ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

13.3 สกัดแบคทีเรียด้วยเอทิลแอลกอฮอล์

13.4 เพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโดยการ
ใช้คลื่นเสียงความถี่สูง

13.5 แยกสารสกัดออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย
ด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีแรงศูนย์กลาง

13.6 เก็บสารละลายใสส่วนบน ใส่ในหลอด
เก็บสาร

3.5 การทดสอบการยับยั้งจุลชีพของสารสกัดจากแบคทีเรียที่แยกจากฟองน้ำ

นำสารสกัดจากแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.2 มาทดสอบการยับยั้งจุลชีพ เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.4.1 สำหรับการเตรียมกระดาศทดสอบ จะหยดสารสกัดจากแบคทีเรีย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนกระดาศทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วจึงนำไปทดสอบการยับยั้งจุลชีพ