วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการสร้างสารต้านจุลชีพของจุลินทรีย์ในดิน

1. ตัวอย่างของแบคทีเรียได้จากโครงการวิจัยสำรวจจุลินทรีย์ในดินบริเวณพื้นที่ป่าของศูนย์การศึกษาฯ ภายหลังจากเก็บตัวอย่างดินมาแล้วแยกจุลินทรีย์ ในโครงการดังกล่าวจะทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นต่อเชื้อ *S.aureus* สายพันธุ์ ATCC 25922 แล้วจึงคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์มาเก็บรักษา ณ อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียสก่อนจะนำมาศึกษาในโครงการวิจัยนี้

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพจะศึกษาการสร้างสารต้านจุลชีพที่ถูกปล่อยออกมายังภายนอกเซลล์ซึ่งสามารถตรวจพบการสร้างได้ด้วยการนำ cell free supernatant มาทำการทดสอบ ดังนั้นจึงนำเชื้อสายพันธุ์ที่จะทดสอบมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเหลว อุณหภูมิ และภายใต้บรรยากาศที่เหมาะสม ก่อนปั่นแยกเซลล์ และน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อออกจากกัน แล้วจึงนำน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อมาทดสอบด้วยวิธี agar cup diffusion ต่อเชื้อทดสอบ 4 ชนิดคือ *S.aureus, E.coli, A.baumanii* และ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ก่อโรคที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ และคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพเป็นที่น่าพอใจ

จากนั้นจะนำน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเติมด้วยเอ็นไซม์ protease 0.01 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์อีกครั้งเทียบกับชุดทดสอบที่ไม่ได้เติมเอ็นไซม์ ด้วยวิธี และเชื้อทดสอบเดิม หากผลศึกษาพบความแตกต่างของขอบเขตการยับยั้งระหว่างชุดทดสอบที่เติม และไม่เติมเอ็นไซม์ แสดงว่าสารต้านจุลชีพในน้ำเลี้ยงเชื้อนี้เป็นสารในกลุ่มโปรตีนที่อาจเป็น bacteriocin หรือ antimicrobial peptide ได้ หากไม่มีความแตกต่างกันแปลว่าสารต้านจุลชีพอาจเป็นกรด หรือสารปฏิชีวนะอื่นได้ ยืนยันฤทธิ์ต้านจุลชีพของเชื้อด้วยวิธี microdilution ต่อเชื้อทดสอบเดิม แล้วจึงทำการพิสูจน์คุณสมบัติของสารต้านจุลชีพนั้น

เชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างสารต้านจุลชีพที่คัดเลือกแล้วจะนำมาจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญของสารต้านจุลชีพต่อไป

ทำการทดสอบยืนยันผลการยับยั้งด้วย วิธี agar-cup diffusion [35] ซึ่งการใช้วิธีนี้จะทำให้สารต้านจุลชีพแพร่กระจายได้ทุกทิศทาง โดยสารทดสอบต้องมีปริมาณมากเพียงพอที่จะใช้ศึกษา มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ภายหลังการบ่มเพาะจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลทในอาหารเหลว และ ภายใต้บรรยากาศที่เหมาะสม แล้วจึงปั่นแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อ *Escherichia coli* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 29213, เชื้อ Acinetobacter baumanii และ Pseudomonas aeruginosa สายพันธุ์ก่อโรค ซึ่งบ่มเพาะในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ภายใต้บรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนปรับเทียบความขุ่นให้ใกล้เคียงกับ McFarland Standard No. 0.5 ด้วย Mueller Hinton broth (MHB)

ใช้ไม้ปลายพันสำลีกระจายแบคทีเรียทดสอบให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแข็ง Tryptic soy agar (TSA) วาง sterile stainless cup ในอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ และนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ ที่เตรียมไว้ เติมลงใน cup ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มเพาะไว้ภายใต้บรรยากาศที่มีออกซิเจนปกติ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของขอบเขตการยับยั้ง (inhibition zone) รอบ cup

สกัดโปรตีนจากน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ โดยวิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัว 40% โดยกวนตลอดเวลาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแล้วปั่นตกตะกอนโปรตีน ที่ความเร็ว 3000 g เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งน้ำส่วนใสและเก็บส่วนตกตะกอนมาละลายในสารละลาย phosphate buffer saline pH 7.2 ในปริมาณ 1 เท่าของปริมาณโปรตีนส่วนที่ตกตะกอน นำสารสกัดโปรตีน (crude protein) ที่ได้มาชะเกลือออกใน desalting gel filtration column เพื่อให้แน่ใจว่าเกลือถูกกำจัดออกหมด ก่อนเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดโปรตีนในหลอดปั่นแยกโปรตีนผ่านเมมเบรนที่มีรูตามขนาดโมเลกุลที่เหมาะสม ส่วนโปรตีนที่ต้องการจะแยกอยู่ด้านบนของเมมเบรน

วัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยเครื่อง Qubit fluorometer แล้วปรับเทียบปริมาณโปรตีนให้เท่ากันเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์

ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดโปรตีนด้วยวิธี microdilution เพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ร้อยละ 99 ผลที่ได้แสดงออกมาในรูปของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (Minimal Inhibitory Concentration) ร้อยละ 99

วิเคราะห์การแยกโปรตีนในตัวกลางเจลด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยการทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนตัวอย่างด้วยการต้มโปรตีนร่วมกับ sodium dodecyl sulphate และ β-mercaptoethanol ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำโปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติแล้วนี้ไปแยกในตัวกลาง 12% polyacrylamide gel ที่มี sodium dodecyl sulphate โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลท์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงในสารละลายบัฟเฟอร์อิเล็กโทรด pH 8.3 จากนั้นตรวจสอบแถบโปรตีนที่ปรากฏบนตัวกลางเจลโดยวิธีย้อม silver staining ผลที่ได้คือสามารถแยก และทราบโปรตีนในส่วนแยกนั้นๆ ตามขนาดโมเลกุล

การศึกษาการแยกรงควัตถุจากเห็ดกินได้

เห็ดกินได้ที่ทำการศึกษาคือ เห็ดขมิ้น (สีเหลือง) และเห็ดผึ้ง (สีแดง) ซึ่งได้เก็บรวบรวมจากโครงการวิจัยสำรวจเห็ดในบริเวณป่าพื้นที่ของศูนย์การศึกษาฯ และป่าบริเวณอื่นร่วมด้วย

สามารถแยกรงควัตถุได้จากการบดเห็ดให้ละเอียดแล้วแช่ในน้ำให้ทั่วเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนกรองเอากากเห็ด และน้ำทิ้ง เหลือเพียงส่วนแขวนลอยของรงควัตถุ และสปอร์ของเห็ด จากนั้นจะนำมา

สกัดด้วยแอลกอฮอล์ ก่อนปั่นแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เพื่อให้แยกสปอร์ทิ้งไป ก่อนนำไปทำให้แห้ง (lyophilize) ชั่งสารที่ได้ ก่อนนำไปเก็บเพื่อวิเคราะห์รงควัตถุต่อไป

การศึกษาการใช้เห็ดเป็นแหล่งอาหารของแลคโตบาซิลลัส

บดดอกเห็ดให้ละเอียด แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นอีกครั้งเพื่อให้ได้ขนาดของเห็ดที่เล็กจนละเอียดที่สุด นำไป autoclave แล้วนำสารแขวนลอยที่ได้พร้อมตะกอนมาเติมในสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลลัสจำนวน 8 ชนิดที่เก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แลคโตบาซิลลัสทั้ง 8 ชนิดเป็นสายพันธุ์ที่ทดสอบฤทธิ์และมีรายงานไว้แล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยการสร้างแบคเทอริโอซินเป็นสารต้านจุลชีพ เชื้อทั้ง 8 ชนิดนี้ได้แก่

Lactobacillus acidophilus สายพันธุ์ MDCM02

Lactobacillus plantarum สายพันธุ์ MDCM01

Lactobacillus paracasei สายพันธุ์ MDCM08

Lactobacillus jonsonnii สายพันธุ์ MDCM12

Lactobacillus crispatus สายพันธุ์ MDCM11

Lactobacillus delbruekii สายพันธุ์ MDCM13

Lactobacillus sakei สายพันธุ์ MDCM15

Lactobacillus fermentum สายพันธุ์ MDCM16

เลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลลัสในสูตรอาหารดั้งเดิม และสูตรอาหารใหม่ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดโปรตีนด้วยวิธีการแยกผ่านแผ่นกรองขนาดกรองโปรตีนขนาด 10 กิโลดาลตัน นำสารสกัดโปรตีนที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อทดสอบ 4 ชนิดได้แก่

Escherichia coli สายพันธุ์ก่อโรคทางเดินอาหาร

Salmonella enterica สายพันธุ์ก่อโรคทางเดินอาหาร

Shigella dysenteriae สายพันธุ์ก่อโรคทางเดินอาหาร

Vibrio parahaemolyticus สายพันธุ์ก่อโรคทางเดินอาหาร

เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านจุลชีพระหว่างการเลี้ยงแลคโตบาซิลลัสในสูตรอาหารดั้งเดิม กับสูตรอาหารที่มีส่วนผสมเห็ดอยู่ด้วย คัดเลือกสภาวะที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพดีที่สุด มาศึกษาอิทธิพลของส่วนผสมเห็ดในสูตรอาหารต่อฤทธิ์ต้านจุลชีพ และศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพหรือแบคเทอริโอซินนี้ต่อไป

การศึกษาสภาวะการเจริญในหลอดทดลองของสายใยเห็ดถอบ

ศึกษาอิทธิพลของสารต่างๆ ในการเจริญในหลอดทดลองของสายใยเห็ดถอบ ภายหลังนำสายใยเห็ดถอบที่แยกได้มาเพาะเลี้ยง โดยศึกษาการงอกของสายใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสารต่างๆ ที่นำมาศึกษาถึงอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีต่อเห็ดถอบนี้ได้แก่

- Glucose
- Salicin
- L-sorbose
- Ribitol
- Cellubiose
- Arabinose
- Mannitol
- Sucrose
- Succinic acid
- Glycerolgalactose
- Trehalose
- Mannose

และ N-acetylglucosamine