SWU Sci. J. Vol. 23 No. 2 (2007)

บทความวิจัย

การแยกและการศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของ gliding bacteria ที่แยกได้จากพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย

ฉัตรฤดี สุวรรณชาติ[1]* วัลลภา อรุณไพโรจน์[1] และ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ[2]

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้แยกและศึกษาคุณลักษณะบางประการของ gliding bacteria โดยทำการเก็บตัวอย่างในพื้นที่บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ น้ำทะเล ซากพืช สัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ฟิล์มชีวภาพ สาหร่ายทะเล จำนวนมากกว่า 200 ตัวอย่าง สามารถคัดแยก gliding bacteria ได้ 46 ไอโซเลท แบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยาของรูปร่างเซลล์ ขนาดของเซลล์ และสีของโคโลนี เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่าสารสกัดจาก gliding bacteria จำนวน 46 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ คือ *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ได้ 11 ไอโซเลท อีกทั้งพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสารสื่อประสาท (acetylcholine) ที่ทำให้มนุษย์มีความสามารถในการจำลดลงและก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ ผลที่ได้จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็น gliding bacteria นั้นน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีและน่าสนใจในการค้นคว้าวิจัยและพัฒนาด้านยาต่อไป

คำสำคัญ: gliding bacteria สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

[1]ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: chatrudee@tistr.or.th

Screening and Preliminary Characterization of Gliding bacteria Isolated from Eastern and Southern Coastlines of Thailand

Chatrudee Suwannachart[1*], Vullapa Arunpairojana[1] and Akkharawit Kanjana-Opas[2]

ABSTRACT

This study was carried out in order to isolate and characterize gliding bacteria by collecting more than 200 specimens for example, seawater, declaying material, biofilm from eastern and the southern coastlines of Thailand. Forty-six cultures of the gliding bacteria were identified and classified into 6 groups according to their morphology, cultural characteristics and cell sizes. All marine gliding bacteria were cultivated in liquid medium at 30°C for 5-7 days and cell was extracted by organic solvents. The crude extracts from 46 isolated were tested against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* for antimicrobial activities and the crude extracts were also tested for the inhibitory acetylcholine esterase enzyme. The results showed that the crude extracts from 11 isolates of the marine gliding bacteria were active in both biological assays which indicated that this bacteria is highly potential for further investigation and development in drug discovery.

Keywords: gliding bacteria, bioactive compounds, acetylcholine esterase

[1] Microbiological Resources Centre (Bangkok MIRCEN), Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR)

[2] Department of Industrail Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hatyai

* Corresponding author, e-mail: chatrudee@tistr.or.th

บทนำ

gliding bacteria จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างได้หลากหลายทั้งเป็นท่อน (rod) หรือเป็นเส้นสาย (filament) ไม่มีแฟลกเจลลา แต่เคลื่อนที่ด้วยการคืบคลาน (gliding motility) สร้างเมือก ไวต่อสารปฏิชีวนะจำพวกแอคติโนมัยซินดี (actinomycin D) gliding bacteria แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ gliding fruiting bacteria มีลักษณะเซลล์ที่ไม่เป็นเส้นสาย เซลล์ส่วนใหญ่เป็นท่อนสั้นๆ มีลักษณะเด่น คือ เซลล์ปกติในบางระยะจะเคลื่อนที่เข้าหากันรวมกันเป็นกลุ่มที่เรียกว่า ฟรุตติ้งบอดี (fruiting bodies) ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันตามสปีชีส์ โดยอาจมีรูปร่างไม่แน่นอนบางครั้งอาจพบในรูปที่เป็นรูปทรงกลมหรือรูปไข่ ซึ่งรูปร่างแบบนี้จะทำให้ทนต่อความแห้งแล้งและความร้อนได้ดี มีค่า G + C content อยู่ในช่วง 65-71 mol% ส่วน gliding non-fruiting bacteria เป็นกลุ่มที่มีลักษณะเซลล์เป็นเส้นสาย มีขนาดของเซลล์ยาวมาก บางครั้งพบเป็นเซลล์เดี่ยวรูปท่อน ไม่มีการสร้างฟรุตติ้งบอดี มีค่า G + C content อยู่ในช่วง 31-53 mol% [1, 2]

gliding bacteria เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสภาวะแวดล้อมต่างๆ และมีลักษณะเฉพาะตัวที่สามารถเคลื่อนที่ได้บนพื้นผิวที่มีการเจริญโดยวิธีการคืบคลาน มีความสามารถในการผลิตสารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งโดยจากรายงานของ Reichenbach จากสถาบันวิจัย Gesellschaft Biotechnologische Forschung (GBF) ในประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมันซึ่งเป็นเพียงหนึ่งในจำนวนของนักวิทยาศาสตร์เพียงไม่กี่คนในโลกนี้ที่ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียชนิดดังกล่าว พบว่าแบคทีเรีย gliding ในกลุ่มของ Myxobacteria นั้นสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่า 85 ชนิด โดยมีสูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวแตกต่างกันมากถึง 450 ชนิด และส่วนมากเป็นสารชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน [3] นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวยังสามารถผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีความสำคัญ อาทิเช่น สารให้สี และเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ [4-8]

เอนไซม์ในกลุ่มของโคลีนเอสเทอเรส (choline esterase) ที่เป็น อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholine esterase; AChE) หรือ บิวทีริลโคลีนเอสเทอเรส (butyrylcholine esterase; BuChE) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer' disease) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติเนื่องจากอาการเสื่อมของสมอง (neurodegenerative disorder) ที่พบมากในประชากรกลุ่มผู้สูงอายุ และเป็นความผิดปกติที่จนกระทั่งปัจจุบันนี้ยังไม่มีวิธีใดที่สามารถรักษาผู้ป่วยให้หายจากโรคได้โดยเด็ดขาด [9] จึงอาจกล่าวได้ว่าผลกระทบของโรคอัลไซเมอร์ซึ่งบั่นทอนสุขภาพความเป็นอยู่ รวมทั้งความสามารถในการพึ่งพาตนเองของผู้สูงอายุ ซึ่งนับวันจะทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากการที่จำนวนประชากรผู้สูงอายุทั้งในประเทศที่พัฒนาแล้วและในประเทศไทยเองมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง การวิจัยเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้าน AChE และ BuChE เพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยาชนิดใหม่สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์จึงมีความจำเป็นและสำคัญอย่างยิ่ง โดยทั่วไปแล้วการค้นหาสารชนิดใหม่เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยานั้นจะมุ่งไปที่แหล่งสำคัญ 2 แหล่งคือ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural products) และ ยาสังเคราะห์ (synthetic drugs) โดยเฉพาะการค้นหาสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมทั้งสารที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ พบว่ามักจะสามารถแยกสารชนิดใหม่ที่มีความซับซ้อนทั้งในด้านสูตรโครงสร้าง และ

ฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยที่สามารถแยกสารต้านเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่ได้จากจุลินทรีย์

ดังนั้นในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยก จัดจำแนกชนิด และศึกษาความหลากหลายของ gliding bacteria ที่พบในทะเลทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย และเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของ gliding bacteria ที่พบในทะเลของประเทศไทยสำหรับใช้ศึกษาการนำไปใช้ประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ อีกทั้งเพื่อศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จาก gliding bacteria ที่พบในทะเลสำหรับผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

วิธีการทดลอง

การแยก gliding bacteria จากตัวอย่าง

ทำการแยก gliding bacteria จากตัวอย่างจำนวนประมาณ 200 ตัวอย่าง ที่เก็บบริเวณชายฝั่งทะเลทางภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย โดยในการเก็บตัวอย่างจากทะเลเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียชนิดนี้นั้น ชนิดและบริเวณของตัวอย่างที่จะทำการเก็บจะเป็นบริเวณที่มีการสะสมของอินทรียวัตถุ พืชทะเล สาหร่าย หญ้าทะเล ตะกอนดินและฟิล์มชีวภาพบริเวณหิน พลาสติก เปลือกหรือกระดองของสัตว์ทะเลที่จมอยู่ใต้น้ำ เป็นต้น ตัวอย่างทั้งหมดจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4-10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

การจำแนกและการเก็บรักษา gliding bacteria

ตัวอย่างที่เก็บได้จะนำมาจัดจำแนกชนิดและประเภทเบื้องต้น โดยตรวจสอบจากรูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ รุ่น BX 50 (Olympus, Japan) รวมทั้งวัดขนาดของเซลล์ ดูลักษณะและสีของโคโลนี และการสร้างรงควัตถุ [1, 10] จากนั้นล้างด้วยน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้วหลายครั้งเพื่อลดปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เกาะติดอยู่กับตัวอย่างหรือปนเปื้อนอยู่ในน้ำทะเล นำตัวอย่างที่ผ่านการล้างมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยวิธีปลอดเชื้อ และวางบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ SAP2 medium [1] มีส่วนประกอบของทริปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และสังเกตการเจริญเติบโตโดยตรวจสอบลักษณะการแผ่ของโคโลนีเป็นวงกว้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามมิติ (stereo microscope) จากนั้นตัดชิ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีดังกล่าว วางบนจานเพาะเชื้อใหม่บ่มจนมีการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิห้อง และศึกษาลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟสคอนทราสต์ (phase contrast microscope) โดยลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ ความสามารถในการเคลื่อนที่แบบคืบคลานได้บนพื้นผิว และรูปร่างลักษณะของเซลล์ที่มีลักษณะเฉพาะตัว หากเชื้อที่แยกได้ยังคงมีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียชนิดอื่น ทำการแยกเชื้อซ้ำจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ซึ่งต้องอาศัยการแยกเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้วิธีการ micromanipulation technique [8] เมื่อแยกได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนและเก็บรักษาเชื้อโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส การเก็บใน liquid nitrogen และการระเหิดแห้ง (lyophilization) โดยเก็บรักษาไว้ ณ ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การคัดแยก gliding bacteria ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำ gliding bacteria ที่ผ่านการจัดจำแนกแล้วมาศึกษาถึงศักยภาพในการผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเน้นที่สารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Candida albicans, Staphylococcus aureus, Saccharomyces cerevisiae* โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมคือ SAP2 medium เขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 150-200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 5-7 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ นำเอาเซลล์ที่แยกได้มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เอทิลอะซิเตท เมทานอล เป็นต้น จากนั้นจึงกำจัดตัวทำละลายออกไปโดยใช้เครื่องทำระเหยชนิดหมุนเหวี่ยงภายใต้ความดันต่ำ สารสกัดที่ได้จะผ่านการหาน้ำหนักแห้งและละลายกลับด้วยตัวทำละลาย คือ dimethyl sulfoxide (DMSO) โดยปรับให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดที่เท่าๆ กันคือ 25 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างสารสกัดหยาบที่ละลายใน DMSO ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

การตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

วิธีการตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะทำโดยอาศัยวิธีการ colorimetric microdilution broth assay [11] ซึ่งจะอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในกรณีที่มีการเจริญของเชื้อ เนื่องจากปฏิกิริยารีดักชันที่เกิดขึ้นจากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ การตรวจสอบจะกระทำในจานเพาะเชื้อ ชนิด 96 หลุม ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้เป็นจำนวนมากในเวลาเดียวกัน วิธีการดังกล่าวนี้จะใช้สารสกัดตัวอย่างในปริมาณน้อย (< 1 มิลลิกรัม) ซึ่งเหมาะสมกับการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่มาจากจุลินทรีย์ วิธีการวัดผลในวิธี colorimetric microdilution broth assay จะทำโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์คือ Alamar Blue โดยถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากน้ำเงินเป็นแดง จะแสดงถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ตรวจสอบโดยสารตัวอย่างนั้น

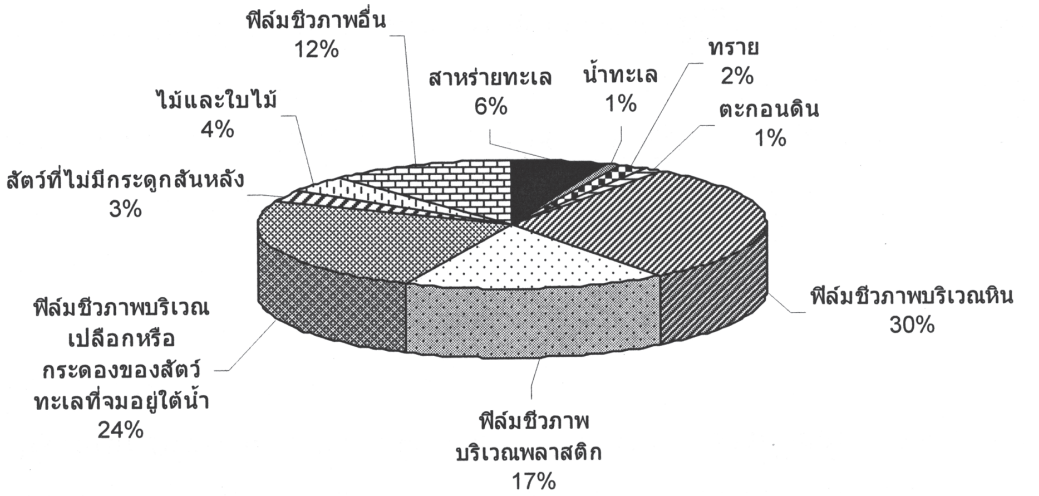
วิธีการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

นำสารสกัดที่มีผลทดสอบการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์มาทดสอบด้วยวิธีการของ Ellman's colorimetric method [1] เพื่อหาปริมาณกรดที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ความเข้มข้นประมาณ 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม เติมแต่ละหลุมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเติม 5, 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และสารสกัดปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วเติมสับสเตรต คือ อะเซทิลโคลีนไอโอไดด์ (acetylcholine iodide) 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ผลการทดลอง

การแยก gliding bacteria จากตัวอย่าง

จากการแยก gliding bacteria จากตัวอย่างที่เก็บบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศ ได้แก่ น้ำทะเล สาหร่ายทะเล ทราย ตะกอนดิน ฟิล์มชีวภาพบริเวณหิน ฟิล์มชีวภาพบริเวณพลาสติก ฟิล์มชีวภาพบริเวณเปลือกหรือกระดองของสัตว์ทะเลที่จมอยู่ใต้น้ำ ฟิล์มชีวภาพอื่น สัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ไม้และใบไม้ พบว่าสามารถแยก gliding bacteria ได้ 46 ไอโซเลท (รูปที่ 1) โดยตัวอย่างที่พบ gliding bacteria มากที่สุด คือ ฟิล์มชีวภาพบริเวณหิน คิดเป็นร้อยละ 30 รองลงมาคือฟิล์มชีวภาพบริเวณเปลือกหรือกระดองของสัตว์ทะเลที่จมอยู่ใต้น้ำ ฟิล์มชีวภาพบริเวณพลาสติก ฟิล์มชีวภาพอื่น สาหร่ายทะเล ไม้และใบไม้ ทราย ตะกอนดิน และน้ำทะเล ที่ร้อยละ 24, 17, 12, 6, 4, 2, 1 และ 1 ตามลำดับ



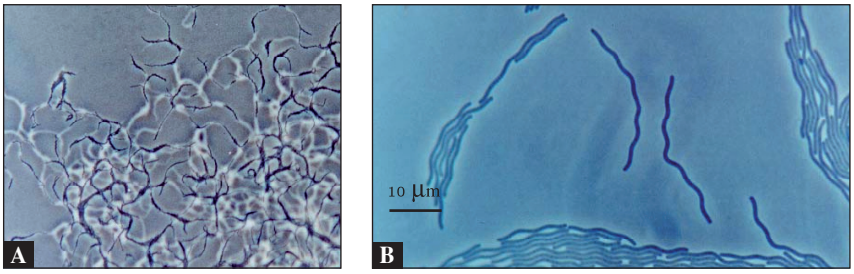
รูปที่ 1 แหล่งที่ใช้ในการคัดแยก gliding bacteria

การจำแนก gliding bacteria ที่แยกได้

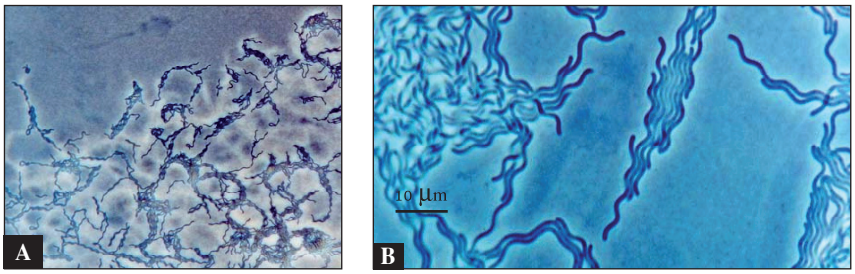
จากการศึกษาสามารถแบ่ง gliding bacteria 46 ไอโซเลท ออกได้เป็น 6 กลุ่ม ตามลักษณะสัณฐานวิทยาของรูปร่างเซลล์ ลักษณะของโคโลนีและขนาดของเซลล์ (ตารางที่ 1) ตามวิธีการของ Balow [1] โดยพบ gliding bacteria กลุ่มที่ 1 มากที่สุด (15 ไอโซเลท) รองลงมาคือ กลุ่มที่ 2 (12 ไอโซเลท) กลุ่มที่ 3 (10 ไอโซเลท) กลุ่มที่ 4 (4 ไอโซเลท) กลุ่มที่ 5 (3 ไอโซเลท) และ กลุ่มที่ 6 (2 ไอโซเลท) ตามลำดับ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์และความยาวของเซลล์ดังตารางที่ 1 และทั้ง 6 กลุ่มมีรูปร่างและลักษณะของเซลล์ ดังแสดงได้ในรูปที่ 2-7

ตารางที่ 1 คุณลักษณะของ gliding bacteria ที่แยกได้จากทะเล

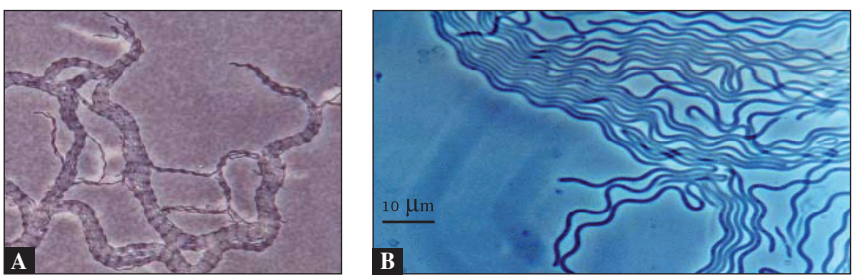
group / characteristic	group 1	group 2	group 3	group 4	group 5	group 6
habitat	marine	marine	marine	marine	fresh water/ marine	fresh water/ marine
optimum temperature	25-30 °C	25-30 °C	25-30 °C	25-30 °C	25-30 °C	30 °C
color of colony	orange-yellow	orange-apricot	pale yellow	yellow	yellow	yellow
cell shape	spiral	spiral	spiral	long filament	rod and long filament	rod and blunt end
diameter of filament (μm)	0.7-0.8	0.8	0.8-1.2	0.6-1.5	0.5	0.5
length of filament (μm)	10-25	5-50	50-100	150-1,200	1-30	2-5



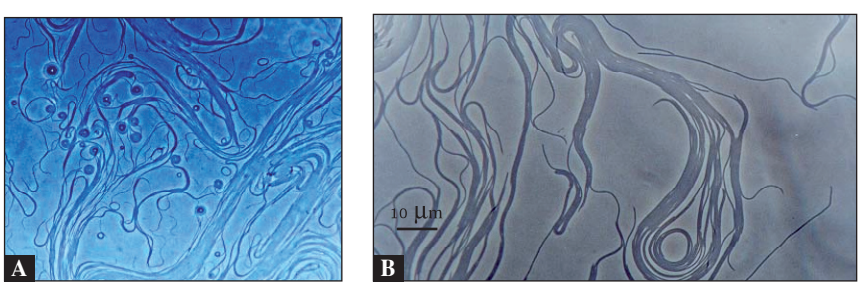
รูปที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria กลุ่มที่ 1
A: ลักษณะการคืบคลานที่กำลังขยาย 200 เท่า
B: รูปร่างและลักษณะของเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



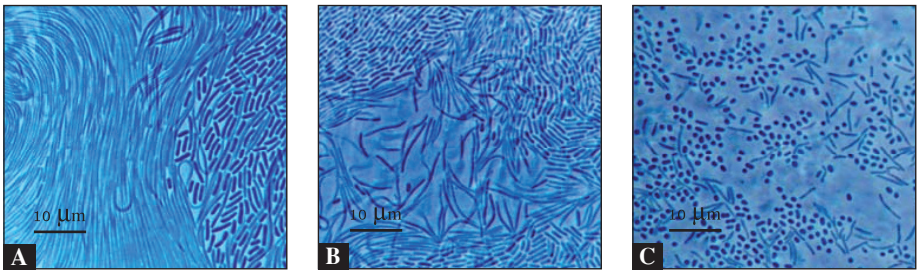
รูปที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria กลุ่มที่ 2
A: ลักษณะการคืบคลาน (glide) ที่กำลังขยาย 200 เท่า
B: รูปร่างและลักษณะของเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



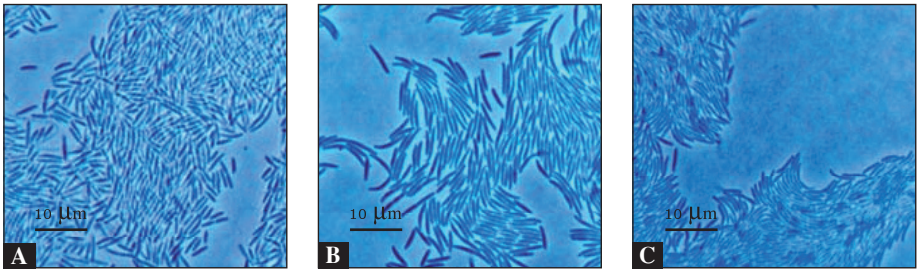
รูปที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria กลุ่มที่ 3
A: ลักษณะการคืบคลาน (glide) ที่กำลังขยาย 200 เท่า
B: รูปร่างและลักษณะของเซลล์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria กลุ่มที่ 4
A: ลักษณะการคืบคลาน (glide) ที่กำลังขยาย 100 เท่า
B: รูปร่างและลักษณะของเซลล์ที่กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria กลุ่มที่ 5
A: รูปร่างและลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า
B: รูปร่างและลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า
C: รูปร่างและลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ gliding bacteria กลุ่มที่ 6
A: รูปร่างและลักษณะเซลล์ของไอโซเลทที่แยกได้จากสาหร่ายทะเล กำลังขยาย 1,000 เท่า
B: รูปร่างและลักษณะของเซลล์ของไอโซเลทที่แยกได้จากฟิล์มชีวภาพบริเวณหิน กำลังขยาย 1,000 เท่า
C: รูปร่างและลักษณะของเซลล์ของไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำทะเล กำลังขยาย 1,000 เท่า

การคัดแยก gliding bacteria ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการคัดแยก gliding bacteria ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งหมด 46 ไอโซเลท พบว่าสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก gliding bacteria จำนวน 11 ไอโซเลท โดยจัดเป็น gliding bacteria กลุ่มที่ 4 มากที่สุด (6 ไอโซเลท) รองลงมาคือกลุ่มที่ 5 (3 ไอโซเลท) และ กลุ่มที่ 6 (2 ไอโซเลท) ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (antimicrobial activities) และเปอร์เซ็นต์การสร้างสารยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (% inhibition of acetylcholine esterase)

TISTR No.	antimicrobial activities			% inhibition of acetylcholine esterase
	S. cerevisiae	*C. albicans*	*S. aureus*	
1699	-	-	+	54.47
1710	+	+	+	93.17
1711	-	-	+	67.79
1712	+	+	+	78.18
1737	-	+	+	71.02
1742	-	+	+	78.39
1743	+	-	-	77.98
1744	-	+	+	63.32
1746	-	-	+	64.60
1749	+	+	-	78.21
1752	-	-	-	76.54

จากตารางสรุปได้ว่าสารสกัดจากไอโซเลท TISTR 1710 และ 1712 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด คือ *S. cerevisiae*, *C. albicans* และ *S. aureus* รองลงมาคือไอโซเลท TISTR 1737, 1744, 1742 สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ 2 ชนิด คือ *C. albicans* และ *S. aureus* และไอโซเลท TISTR 1749 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ 2 ชนิด คือ *S. cerevisiae* และ *C. albicans* ส่วนไอโซเลท TISTR 1699, 1711, 1746 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และไอโซเลท TISTR 1743 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* ได้ นอกจากนี้ผลการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าสารสกัดที่ได้จากไอโซเลท TISTR 1710 ให้ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส คิดเป็น % inhibition of acetylcholine esterase มากที่สุดที่ร้อยละ 93.17 รองลงมาคือ TISTR 1742 (ร้อยละ 78.39) TISTR 1749 (ร้อยละ 78.21) TISTR 1712 (ร้อยละ 78.18) TISTR 1743 (ร้อยละ 77.98) TISTR 1752 (ร้อยละ 76.54) TISTR 1737 (ร้อยละ 71.02) TISTR 1711 (ร้อยละ 67.79) TISTR 1746 (ร้อยละ 64.60) TISTR 1744 (ร้อยละ 63.32) และ TISTR 1699 (ร้อยละ 54.47) ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เหมาะสมในการคัดแยก gliding bacteria คือ ฟิล์มชีวภาพที่เกาะเคลือบอยู่กับวัตถุต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นถุงพลาสติก ก้อนหิน เปลือกหอย จากตัวอย่างทั้งหมด 200 ตัวอย่าง สามารถแยก gliding bacteria ได้เพียง 46 ไอโซเลท เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ยาก และบางไอโซเลทไม่สามารถเจริญนอกถิ่นกำเนิดได้ การจัดจำแนก gliding bacteria ในงานวิจัยนี้โดยอาศัยลักษณะต่างๆ ได้แก่ ขนาดและสีของโคโลนี การเคลื่อนที่ของเซลล์ การติดสีแกรม ความกว้างและยาวของเซลล์นั้น เป็นเพียงการจัดจำแนกขั้นต้น ดังนั้นควรต้องใช้วิธีการอื่นๆ ในการจัดจำแนก อาทิ วิธีการทางชีวเคมี และการตรวจสอบลำดับเบส (16S rDNA) ในการทดลองลำดับต่อไป

จากการทดสอบขั้นต้นของสารสกัดจากเชื้อจำนวน 11 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้ โดยไอโซเลทส่วนใหญ่สามารถยับยั้ง *S. aureus* (8 ไอโซเลท) รองลงมาคือ *C. albicans* (6 ไอโซเลท) และ *S. cerevisiae* (4 ไอโซเลท) ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าเชื้อทั้ง 11 ไอโซเลทมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการทดลองในด้านการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากไอโซเลทดังกล่าวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Balow, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. (Editors). 1991. The Prokaryote: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Vol. IV. 2nd Edition. New York. Springer Verlag.
2. Ellman, G. L., Lourtney, D. K., Andres, V. and Gmelin, G. 1961. A New and Rapid Colourimetric Determination of Acetylcholine Esterase Activitiy. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.
3. Larkin, J. M. 1989. Nonphotogenic, Nonfruiting Gliding Bacteria. 1989. In: Stanley, J. M., Byant, M. P., Pfenning, N. and Holt, J. G. (Editors). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. III. Baltimore. The William and Wilkins.
4. Achenbach, H., Kohl, W. and Reichenbach, H. 1978. The Flexirubin-Type Pigments - A Novel Class of Natural Pigments from Gliding Bacteria. *Revista Latinoamericana de Quimica* 9(3): 111-124.
5. Kleinig, H., Reichenbach, H., Achenbach, H. and Stadler, J. 1971. Carotenoid Pigments of *Sorangium compositum* (Myxobacterales) Including Two New Carotenoid Glucoside Esters and Two New Carotenoid Rhamnosides. *Journal Archives of Microbiology* 78(3): 224-233.

6. Reichenbach, H. and Kleinig, H. 1984. Pigments of Myxobacteria. In: Myxobacteria: Developmental and Cell Interactions. New York. Springer-Verlag.
7. Sangkhobol, V. and Skerman, V. B. D. 1981. *Saprospira*, Species Natural Predators. *Current Microbiology* 5: 169-174.
8. Von Tigerstrom, R. G. and Stelmaschuk, S. 1987. Comparison of the Phosphatases of *Lysobacter enzymogenes* with Those of Related Bacteria. *Journal of General Microbiology* 133(11): 3121-3127.
9. Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., Cowan, S. T., Holt, J. G., Liston, J., Murray, R. G. E., Ravin, A. W. and Stanier, R. Y. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Edition. Baltimore. The William and Wilkins.
10. Lewin, R. A. 1962. *Saprospira grandis* Gross; Suggestion for Reclassifying Helical, Apochlorotic, Gliding Organisms. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 555-563.
11. Sly, L. I. and Arunpairojana, V. 1987. Isolation of Manganese-Oxidizing *Pedomicrobium* Culture from Water by Micromanipulation. *Journal of Microbiological Methods* 6: 177-182.

ได้รับบทความวันที่ 21 มีนาคม 2550
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 31 สิงหาคม 2550