รายงานการวิจัย

การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ของสารเมแทโบไลด์ทุติยภูมิและชีวสารจากจุลชีพร่วมอาศัยกับฟองน้ำดีโมสปองเจียเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยาปฏิชีวนะชนิด Methicillin Resistant Staphylococcus (MRSA)

พชร เพ็ชรประดับ Patchara Pedpradab

มณฑล เลิศคณาวนิชกุล Monthon Lertcanawanichakul

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัย สถาบันทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่สนับสนุนเครื่องมือและห้องวิจัย

พชร เพ็ชรประดับ
มณฑล เลิศคณาวนิชกุล

การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ของสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิและชีวสารจากจุลชีพร่วมอาศัยกับฟองน้ำดีโมสปองเจียเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคดื้อยาปฏิชีวนะชนิด Methicillin Resistant Staphylococcus (MRSA)

พชร เพ็ชรประดับ[1] และมณฑล เลิศคณาวนิชกุล[2]

บทคัดย่อ

เป็นการศึกษาโดยการแยกเชื้อแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล และสิ่งแวดล้อม ณ. แหล่งอาศัย บริเวณเกาะสาหร่าย จังหวัดสตูล สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 8 ไอโซเลต แบ่งเป็นแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำ จำนวน 4 ไอโซเลต เอนโดรไฟด์แบคทีเรีย 2 ไอโซเลต และแบคทีเรียอาศัยในโคลนใต้ฟองน้ำ จำนวน 2 ไอโซเลต เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมาตรฐาน *Staphlococcuus aureus* TISTR517 มี 4 ไอโซเลตยับยั้งเชื้อได้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง MRSA พบว่ามีเพียงไอโซเลต S6.2 (เป็นแบคทีเรียอาศัยในเนื้อเยื่อฟองน้ำ) เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จึงคัดเลือกไปเลี้ยงในปริมาณมาก เพื่อผลิตสารสกัดหยาบ สามารถผลิตได้ 300 มิลลิกรัม เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบในสิ่งสกัดหยาบโดยเครื่อง HPLC พบเพียง 2 องค์ประกอบ เท่านั้นและมีลักษณะไม่ซับซ้อน จึงผลิตสารสกัดหยาบให้ได้มากกว่าเดิม (ประมาณ 3 กรัม) เพื่อแยกสารออกฤทธิ์ต่อไปในการวิจัยระยะปีที่ 2

คำสำคัญ: ฟองน้ำ เชื้อดื้อยา จุลชีพอาศัยร่วม

---

[1]อาจารย์ สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.สิเกา จ.ตรัง

[2]อาจารย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช

Medical application of secondary metabolites and bio-compounds from Demospongia sponges-associated microorganisms to inhibit the pathogenic drug resistance bacteria type Methicillin resistant *Staphylococcus* (MRSA)

Patchara Pedpradab[1] and Monthon Lertcanawanichakul[2]

ABSTRACT

Isolation and purification of marine sponges associated bacteria and surrounded environment in the area of Sarai island, Satune province. Eight isolated bacteria were collected and purified containing 4 sponges associated bacteria, 2 endophytic bacteria and 2 isolates collected from clay under sponges colonies. All isolated bacteria were examined for their anti *Stephylococcus aureus* TISTR517 and MRSA .It found that 4 isolates showed inhibition but only one (S6.2) showed MRSA inhibition. Mass culture of S6.2 was performed to produce 300 mg crud extract and analyzed by HPLC. The HPLC chromatogram revealed the extract contained simple mixture. By above results, we design to produce the more crud extract for isolation and purification the active compounds together with determined for their molecularstructures.

Keywords: marine microorganisms, bacteria, sponge, MRSA

[1]Department of Marine Science, Faculty of Science and Fisheries and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang.

[2] Department of School of Allied Health Sciences, Walailak University, Thasala, Nakhonsithammarat

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
1.3 ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	4
1.4 วัตถุประสงค์	8
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	9
บทที่ 3 ผลการวิจัย	13
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการวิจัย	18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	19
เอกสารอ้างอิง	21

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 : จุลชีพในทะเลและการสร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ	6
ตารางที่ 2 : ขั้นตอนการทำ PCR ในการตรวจหายีนดื้อยา methicillin ชนิด *mec*A (28)	11

สารบัญรูป

	หน้า
ภาพที่ 1 : ตัวอย่างแบคทีเรียแยกได้จากฟองน้ำ *Xestospongia* sp.	3
ภาพที่ 2 : แหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (ดัดแลงจาก Blunt *et al*.,2012)	4
ภาพที่ 3 : จำนวนวงศ์เป็นร้อยละของเชื้อราที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆในทะเล แหล่งที่มา (Bugni and Ireland, 2004)	5
ภาพที่ 4 : ขั้นตอนการทำสิ่งสกัดหยาบ	10
ภาพที่ 5 : การแยกและทำสารมีฤทธิ์ให้บริสุทธิ์	12
ภาพที่ 6 : ฟองน้ำดีโมสปองเจียที่ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัย	13
ภาพที่ 7 : ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียมูกเยิ้ม มันวาว ที่ตรวจพบเป็นประชากรส่วนใหญ่จากตัวอย่างที่นำมาศึกษา	14
ภาพที่ 8 : ลักษณะโคโลนีเอนโดไฟต์ที่พบในฟองน้ำ โดยให้ A เป็นรหัส S6.2 และ B ให้รหัสเป็น S1.2	14
ภาพที่ 9 : ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่แยกได้จากโคลน โดยให้ A รหัสเป็น SL4 และ B ให้รหัสเป็น SL19	15
ภาพที่ 10 : แสดงวงใส (บริเวณลูกศรชี้) ของการต้าน *S. aureus* TISTR 517 ของไอโซเลท S6.2 (A), SL19 และ SK3 (B) ด้วยวิธีราดทับ (overlay)	15
ภาพที่ 11 : วงใสของการต้านเชื้อ *S. aureus* TISTR517 (ซ้ายมือ) และ MRSA (ขวามือ) เมื่อ ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion	16
ภาพที่ 12 : ผลการวิเคราะห์ 16S rDNA ของแบคทีเรียร่วมอาศัยกับฟองน้ำ (S6)	17
ภาพที่ 13 : HPLC chromatogram ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรียอาศัย S6.2	17
ภาพที่ 14 : โคโลนีของไอโซเลท S1.2, ไอโซเลท S6.2, ไอโซเลท SK3, ไอโซเลท SL19 (เรียงจากซ้ายมือมาทางขวามือ)	19
ภาพที่ 15 : ลักษณะการเจริญของไอโซเลทที่คัดแยกได้ (S6.2, SK3, SL19 และ S1.2) เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth (MB) ; C คือ ขวดควบคุมผลลบ. ลักษณะของไอโซเลท S6.2 น่าสนใจเนื่องจากต้าน *S. aureus* TISTR 517 (รูปที่ 9A) และต้าน MRSA	20

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

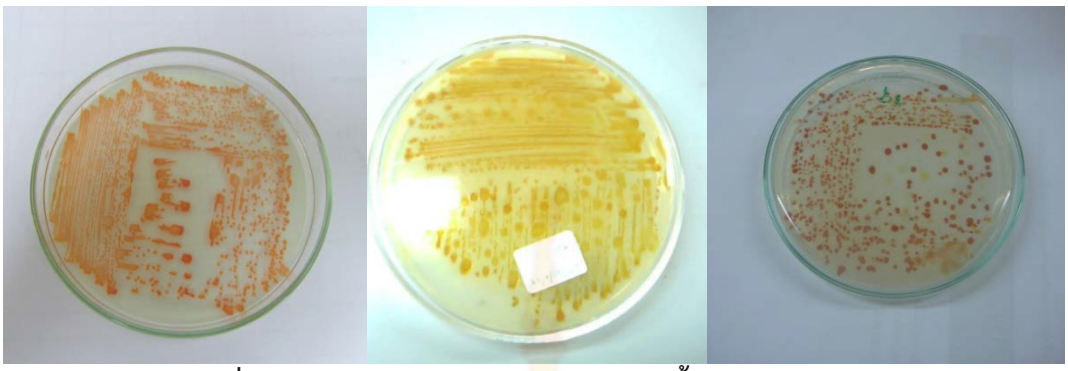
ปัจจุบันปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสาเหตุสำคัญมาจากการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่จำเป็น และเกินความจำเป็น สำหรับในประเทศไทย พบว่ามีมูลค่าการใช้ยาต้านจุลชีพมากกว่า 10,000 ล้านบาทต่อปี และมีการติดเชื้อที่ดื้อยาต้านจุลชีพปีละกว่า 100,000 คน (1) โดยเชื้อจุลชีพที่พบบ่อยในโรงพยาบาล และมักดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนาน ได้แก่ *Escherichia coli* ซึ่งทำให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ และระบบทางเดินอาหาร *Klebsiella pneumoniae* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคระบบทางเดินหายใจ และโรคปอดอักเสบ *Acinetobacter baumannii* ซึ่งก่อโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ เช่น โรคปอดบวม *Pseudomonas aeruginosa* ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อหลายระบบของร่างกาย เช่น โรคปอดบวม การติดเชื้อในกระแสเลือด และ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) (1) จากการเก็บข้อมูลเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพจากโรงพยาบาลจำนวน 28 แห่ง ในประเทศไทย ในช่วง พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2556 โดยศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อยากลุ่มคาร์บาพีแนมส์ชนิด imipenem เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จากร้อยละ 14.3 ใน พ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 30.1 ในพ.ศ. 2556 สำหรับอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ต่อยากลุ่มคาร์บาพีแนมส์ชนิด imipenem เพิ่มสูงขึ้นจาก ร้อยละ 4.4 ใน พ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 64.7 ในพ.ศ. 2556 และอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ต่อยา erythromycin เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 28 ในพ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 47.5 ในพ.ศ. 2556 นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีอัตราการดื้อยา clindamycin เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 13.3 ในพ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 31.7 ในพ.ศ. 2556 (2) ปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (MRSA) เพิ่มมากขึ้นในปะเทศต่างๆ ทั่วโลก และยังพบอีกว่าเชื้อ MRSA เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาล ที่เกี่ยวข้องกับโรงพยาบาล และในชุมชน คิดเป็นร้อยละ 61, 52 และ 14 ตามลำดับ (3)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม โดยเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาล ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อที่กระดูกและข้อ การติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคปอดบวม แบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปตามร่างกายมนุษย์ อุปกรณ์ทางการแพทย์ สิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาลและชุมชน โดยเฉพาะเชื้อที่พบภายในโรงพยาบาลมักจะเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอ ในอดีตในการรักษาโรคติดเชื้อ *S. aureus* มักจะใช้ยา methicillin ซึ่งจะทนต่อการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ β-lactamases แต่ต่อมามีรายงานการพบเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศต่างๆ ทั่วโลก (4) และพบเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในชุมชนด้วย (5) เชื้อ MRSA นอกจากจะดื้อต่อยากลุ่ม β-lactams แล้วยังดื้อต่อยากลุ่มอื่นด้วย เช่น aminoglycosides, fluoroquinolones และ tetracycline เป็นต้น (6) ดังนั้นจึงมีการนำยา vancomycin มาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อ MRSA มีความไวต่อยา vancomycin ลดลงจากประเทศต่างๆ ทั่วโลกทั้งในทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย (7) สำหรับกลไกการดื้อยากลุ่ม β-lactams ของเชื้อ MRSA เกิดจากเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่ยาจะไปออกฤทธิ์

คือมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน penicillin binding protein (PBP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น transpeptidase ที่ทำหน้าที่สำคัญในการเชื่อมต่อ peptide ของ peptidoglycan เข้าด้วยกันในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยเชื้อ MRSA จะมีการเปลี่ยนแปลง PBP เป็น PBP2a ที่มีบริเวณ active site เปลี่ยนไป ทำให้ยากลุ่ม β-lactams เข้าจับไม่ได้หรือจับได้น้อยมาก เอนไซม์ PBP2a จึงไม่ถูกยับยั้งการทำงาน ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างผนังเซลล์ที่สมบูรณ์ได้ เชื้อแบคทีเรียจึงสามารถอยู่รอดได้ (8) การสร้างโปรตีน PBP2a ของเชื้อ MRSA จะถูกควบคุมด้วยกลุ่มยีน mec โดยภายในกลุ่มยีนนี้จะประกอบด้วยยีน mecA, mecI และ mecRI โดยยีน mecA ทำหน้าที่สร้างโปรตีน PBP2a ซึ่งจะถูกควบคุมโดยยีน mecI และ mecRI ที่อยู่ทางด้าน upstream ของ mecA promoter การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง mecI และ mecRI ของเชื้อ MRSA นั้น จะทำให้ยีน mecA สามารถสร้างโปรตีน PBP2a ได้ (9) จากการเพิ่มขึ้นของเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ทำให้เกิดผลที่ตามมาที่สำคัญ เช่น เกิดความยุ่งยากในการรักษา เนื่องจากต้องใช้ยาร่วมกันหลายชนิด หรือต้องใช้ยาตัวใหม่ที่มีราคาแพงมาใช้ในการรักษาผู้ป่วย เพราะยาต้านจุลชีพตัวเก่าที่เคยใช้นั้นไม่ได้ผลเท่าที่ควร ทำให้ผู้ป่วยต้องมีค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น ใช้เวลาในการรักษานานขึ้น และมีโอกาสที่ผู้ป่วยจะเสียชีวิตสูงขึ้น

ดังนั้นการค้นหาสารหรือโมเลกุลต้นแบบเพื่อใช้เป็นสารต้านจุลชีพชนิดใหม่จึงมีความจำเป็น สารหรือโมเลกุลต้นแบบส่วนมากได้จากพืช สัตว์ และจุลชีพทั้งมีถิ่นอาศัยอยู่บนบกและในทะเล โดยเฉพาะเชื้อจุลชีพในทะเลสร้างสารที่มีโครงสร้างแปลกใหม่ (novel) และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่รุนแรง (โปรดดูจากทบทวนวรรณกรรม) ประเทศไทยโดยเฉพาะภาคใต้มีพื้นที่ติดต่อกับทะเลทั้งอ่าวไทยและทะเลอันดามันซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิตในทะเลในประเทศไทยเป็นแหล่งของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

สืบเนื่องมาจาก ผลการวิจัยโครงการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำในทะเลอันดามัน (ทุน BRN 2550) ทีมวิจัยทำการสำรวจทรัพยากรฟองน้ำในทะเลอันดามันบริเวณ จ.ตรัง และ สตูล จำนวน 40 ชนิด ทำสิ่งสกัดหยาบได้ 80 สิ่งสกัด เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบฟองน้ำ 18 ชนิด แสดงคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (2) (ซึ่งตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บส่วนมากได้จากหมู่เกาะสาหร่าย จ. สตูล) และพบว่าสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพสร้างโดยฟองน้ำส่วนใหญ่ปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการประยุกต์ใช้ ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับทฤษฎีการสร้างสารเมแทโบไลต์ทางทะเล กล่าวคือ “สารที่สร้างโดยจุลชีพอาศัยร่วมกับฟองน้ำจะมีปริมาณน้อย ในทางกลับกันหากสร้างโดยฟองน้ำจะพบสารในปริมาณมาก” (10) และเมื่อทำการทดลองแยกแบคทีเรียร่วมอาศัยจากฟองน้ำชนิดหนึ่ง คือ *Xestospongia* sp. พบแบคทีเรีย 4-6 ชนิด และสามารถเลี้ยงในห้องทดลองได้ 3 ชนิด เมื่อทดลองทำสิ่งสกัดหยาบและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและลบ ในระดับไมโครกรัมและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับนาโนกรัม ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นใช้ตัวอย่างจากหมู่เกาะสาหร่าย เพราะพบฟองน้ำอยู่อาศัยบริเวณร่องน้ำและมีฝุ่นตะกอน ดังนั้นฟองน้ำบริเวณนี้จึงเป็นที่อยู่อาศัยของจุลชีพร่วมอาศัยมากมาย



ภาพที่ 1 ตัวอย่างแบคทีเรียแยกได้จากฟองน้ำ *Xestospongia* sp.

งานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นกลุ่มราเอนโดไฟท์ และแบคทีเรีย อาศัยร่วมกับฟองน้ำเป็นแหล่งวัตถุดิบหลักในการทดลอง และใช้สารจากจุลชีพกลุ่มสเตรปโตมัยสีทเป็นแหล่งวัตถุดิบรอง

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ฟองน้ำทะเลเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัมพอริเฟอรา (Porifera) ลักษณะโครงสร้างประกอบด้วยรูพรุนทั่วลำตัว รูพรุนเหล่านี้เป็นระบบไหลเวียนน้ำของฟองน้ำซึ่งมีความซับซ้อนมาก ปริมาณน้ำที่ไหลเข้าออกรูพรุนนี้มากกว่า 1,600 ลิตรต่อ 1 ฟองน้ำต่อวัน (21) ทำให้ฟองน้ำเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลชีพที่หลากหลายมาก โดยเฉพาะแบคทีเรียและเชื้อรา โดยที่เชื้อจุลชีพอาศัยร่วมเหล่านี้ผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการเช่น สร้างสารป้องกันการติดเชื้อจากจุลชีพชนิดอื่น ป้องกันการเคลือบเกาะของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ สร้างสารเพิ่มประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันให้กับฟองน้ำ (21) จึงไม่มีรายงานการติดเชื้อก่อโรคในฟองน้ำทะเล ดังนั้นสารเคมีชีวภาพจากฟองน้ำจึงถูกนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์มากมาย จากหลักการเบื้องต้นที่กล่าวมา จึงสามารถตั้งเป็นสมมติฐานของโครงการวิจัยดังนี้

1. ฟองน้ำบริเวณเกาะสาหร่าย จังหวัดสตูล เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยร่วมของจุลชีพต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะแบคทีเรียและเชื้อรา โดยที่จุลชีพร่วมอาศัยเหล่านี้สามารถสร้างสารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพก่อโรคประเภทดื้อยาในคนได้ เพราะจากการทดลองเบื้องต้นสามารถแบคทีเรียได้มากกว่า ชนิดจากฟองน้ำเพียงชนิดเดียว และเมื่อทำการเลี้ยงและทำสิ่งสกัดเพื่อทดสอบฤทธิ์ พบว่าสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคทั้งแกรมบวกแกรมลบได้ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ

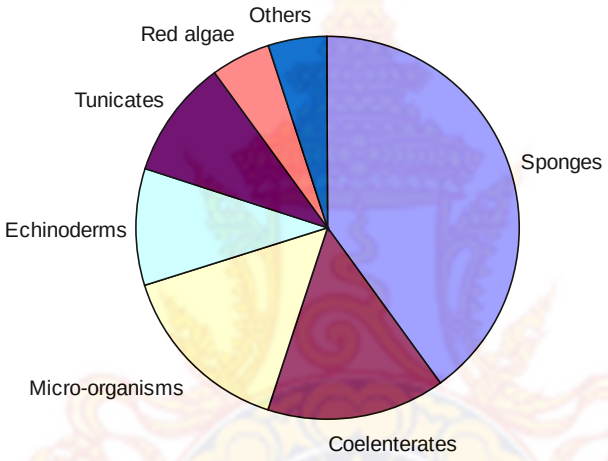
2. สารเคมีชีวภาพที่สร้างโดยจุลชีพอาศัยร่วมฯ มีทั้งสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิและกึ่งปฐมภูมิ โดยที่สารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก มีความซับซ้อนสูงส่วนสารกึ่งปฐมภูมิมักมีขนาดใหญ่กว่าและมีความซับซ้อนเชิงโมเลกุลน้อยกว่า (20)

3. สารเคมีชีวภาพจากจุลชีพร่วมอาศัยกับฟองน้ำสามารถพัฒนาต่อยอดใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ โดยมุ้งเน้นที่ยับยั้งเชื้อก่อโรค ดื้อยา เพราะจุลชีพในทะเลเหล่านี้มักสร้างสารหรือโมเลกุลแบบแปลกใหม่และมีศักยภาพในการออกฤทธิ์สูง

ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

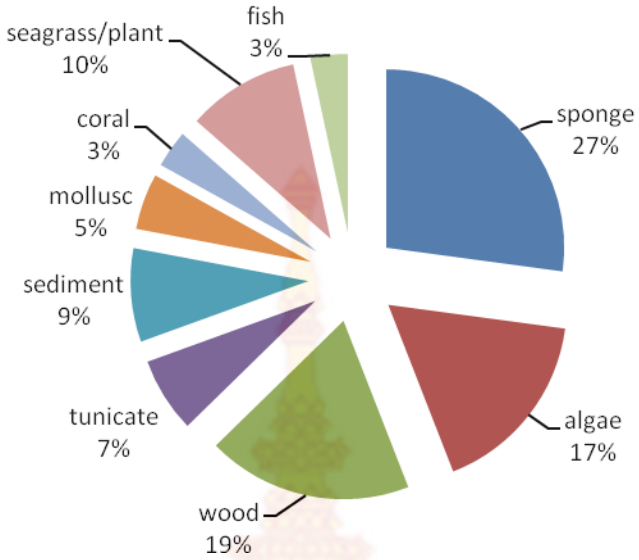
1 จุลชีพในทะเลที่สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ประมาณ ร้อยละ 95 ของยาใหม่ได้โครงสร้างต้นแบบมาจากธรรมชาติ การศึกษาสารเมแทโบไลต์ จากทะเลมากว่าสองศตวรรษ และมีการรวบรวมข้อมูลการค้นพบสารที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ โดยนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก เช่น Mayer and Gustafson (2006), Jha and Zi Rong (2004), Newman and Cragg (2004), Blunt (2003), Mayer and Hamman (2002)Faulkner 1997 สามารถสรุปได้ว่าฟองน้ำได้รับการศึกษามากที่สุด และมีรายงานการค้นพบสาร เมแทโลไลต์มากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล
แหล่งที่มา: (Blunt *et al.*,2012)

จากข้อมูลสัณฐานวิทยาพบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของฟองน้ำเป็นระบบไหลเวียนน้ำซับซ้อน (21) ภายในเนื้อเยื่อของระบบไหลเวียนน้ำเป็นที่อยู่จุลชีพเรียกว่า จุลชีพร่วมอาศัย (sponge-associated microorganisms) จุลชีพเหล่านี้สามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ (23) มีหลายกรณีศึกษาที่เข้าใจว่า สารทุติยภูมิแยกจากฟองน้ำ เกิดจากฟองน้ำ แต่แท้จริงแล้วจุลชีพร่วมอาศัยเป็นผู้สังเคราะห์ ข้อสังเกตคือ สารที่แยกได้มีปริมาณน้อยเมื่อคำนวณเป็นร้อยละเทียบกับน้ำหนักสิ่งสกัดหยาบ โดยส่วนใหญ่แล้วมีรายงานพบว่าจุลชีพอาศัยร่วมชนิดเด่นในฟองน้ำและมีความหลากหลายมาก (25) เมื่อพิจารณาสัดส่วนของจุลชีพที่พบในทะเลสามารถแบ่งได้สองกลุ่มคือ แบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งส่วนมากอยู่อาศัยร่วมกับฟองน้ำ (ภาพที่ 3) (26, 27)



ภาพที่ 3 จำนวนวงศ์เป็นร้อยละของเชื้อราที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆในทะเล
แหล่งที่มา: (Bugni and Ireland, 2004)

2 ตัวอย่างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพสร้างโดยจุลชีพในทะเล

ได้แก่สาร polybrominated biphenyl ether สร้างโดย cyanobacteria (*Oscillatoria spongelia*) อาศัยร่วมกับฟองน้ำ *Dysidea herbacea* สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพได้อย่างมีประสิทธิภาพ นักวิทยาศาสตร์เคยเข้าใจว่าสารนี้สังเคราะห์โดยฟองน้ำสกุล *Dysidea* และสรุปว่าเป็น *chemotaxonomic* ของฟองน้ำสกุลนี้ จนกระทั่งได้รับการพิสูจน์ใน ค.ศ. 1994 โดยทีมวิจัยของ Prof. Faulkner แห่ง Scripps Institution of Oceanography (22) สำหรับฟองน้ำชนิดอื่นที่มีรายงานพบแบคทีเรียอาศัยร่วมได้แก่ *Thenella swinhoei* มีทั้ง *heterotrophic* bacteria และ *cyanobacteria* ฟองน้ำ *Aplysina* spp. มีแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp., *Micrcoccus* sp., *Arthrobactor* sp., *Vibrio* spp. และ *Pseudoalteromonas* sp. (Kyung *et al*.,2001) มีรายงานพบสารจากเชื้อราอาศัยร่วมกับฟองน้ำหลายชนิดเช่น สาร (S)-2,4-dihydroxy-1-butyl(4-hydroxy) ben-zoate มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง สารนี้แยกได้จากเชื้อรา *Penicillium auratiogriseum* อาศัยร่วมกับฟองน้ำดีโมสปองเจียในทะเลจีนใต้ สาร roridin A and roridin D มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราแยกได้จากรา *Myrothecium* spp. อาศัยร่วมกับฟองน้ำ *Axinella* spp. ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียร่วมอาศัยไม่ได้เกิดจากตัวฟองน้ำเอง (29) ตัวอย่างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพแยกได้จากจุลชีพร่วมอาศัยกับฟองน้ำมีหลายชนิดบางชนิดกำลังพัฒนาให้เป็นยาชนิดใหม่ (28)

ตารางที่ 1 จุลชีพในทะเลและการสร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

Source	Activities
Brevibacillus laterosporus	antimicrobial
Marinispora sp. (NPS008920)	antimicrobial
Marinispora sp. (NPS12745)	antimicrobial
Pseudomonas stutzeri	antimicrobial
Nocardia sp.	antifungal
Streptomyces sannurensis	cytotoxic & MRSA
Nigrospora sp.	MRSA
Aspergillus sp.	antibacterial
Penicillium sp.	antimicrobial
Exophiala sp.	antibacterial
Alternaria sp.	MRSA
Ascochyta sp.	Cytotoxic & antimicrobial
Cladosporium sp.	Antifouling & antimicrobial
Chaetomium sp.	Antifungal
Aspergillus sp.	Antiviral
Curvularia sp. (strain no. 768)	Cytotoxic
Spicellum roseum	Cytotoxic
Aspergillus carbonarius	Cytotoxic
Aspergillus ustus	Cytotoxic
Petriella sp.	Cytotoxic
Aspergillus glaucus	Cytotoxic
Aspergillus sydowi	Cytotoxic
Penicillium sp.	Cytotoxic
Cosmospora sp.	Antidiabethic

แหล่งที่มา: (Proksch *et al.*, 2010)

3. สถานการณ์การดื้อยาของเชื้อก่อโรค

ปัจจุบันปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสาเหตุสำคัญมาจากการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่จำเป็นและเกินความจำเป็น สำหรับในประเทศไทย พบว่ามีมูลค่าการใช้ยาต้านจุลชีพมากกว่า 10,000 ล้านบาทต่อปี และมีการติดเชื้อที่ดื้อยาต้านจุลชีพปีละกว่า 100,000 คน (1) โดยเชื้อจุลชีพที่พบบ่อยในโรงพยาบาลและมักดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนาน ได้แก่ *Escherichia coli* ซึ่งทำให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและระบบทางเดินอาหาร *Klebsiella pneumoniae* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคระบบทางเดินหายใจ และโรคปอดอักเสบ

Acinetobacter baumannii ซึ่งก่อโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ เช่น โรคปอดบวม *Pseudomonas aeruginosa* ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อหลายระบบของร่างกาย เช่น โรคปอดบวม การติดเชื้อในกระแสเลือด และ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) (1) จากการเก็บข้อมูลเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพจากโรงพยาบาลจำนวน 28 แห่ง ในประเทศไทย ในช่วง พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2556 โดยศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *P. aeruginosa* ต่อยากลุ่มคาร์บาพีแนมส์ชนิด imipenem เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จากร้อยละ 14.3 ใน พ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 30.1 ในพ.ศ. 2556 สำหรับอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Acinetobacter* spp. ต่อยากลุ่มคาร์บาพีแนมส์ชนิด imipenem เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 4.4 ในพ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 64.7 ในพ.ศ. 2556 และอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ต่อยา erythromycin เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 28 ในพ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 47.5 ในพ.ศ. 2556 นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีอัตราการดื้อยา clindamycin เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 13.3 ใน พ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 31.7 ใน พ.ศ. 2556 (2) ปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (MRSA) เพิ่มมากขึ้นในปะเทศต่างๆ ทั่วโลก และยังพบอีกว่าเชื้อ MRSA เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาล ที่เกี่ยวข้องกับโรงพยาบาลและในชุมชน คิดเป็นร้อยละ 61, 52 และ 14 ตามลำดับ (3)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม โดยเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้บ่อยในโรงพยาบาล ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง การติดเชื้อที่กระดูกและข้อ การติดเชื้อในกระแสเลือด และโรคปอดบวม แบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปตามร่างกายมนุษย์ อุปกรณ์ทางการแพทย์ สิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาลและชุมชุน โดยเฉพาะเชื้อที่พบภายในโรงพยาบาลมักจะเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอ ในอดีตในการรักษาโรคติดเชื้อ S. *aureus* มักจะใช้ยา methicillin ซึ่งจะทนต่อการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ β-lactamases แต่ต่อมามีรายงานการพบเชื้อ S. *aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (MRSA) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลในประเทศต่างๆ ทั่วโลก (4) และพบเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในชุมชนด้วย (5) เชื้อ MRSA นอกจากจะดื้อต่อยากลุ่ม β-lactams แล้วยังดื้อต่อยากลุ่มอื่นด้วย เช่น aminoglycosides, fluoroquinolones และ tetracycline เป็นต้น (6) ดังนั้นจึงมีการนำยา vancomycin มาใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MRSA แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อ MRSA มีความไวต่อยา vancomycin ลดลงจากประเทศต่างๆ ทั่วโลกทั้งในทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย (7) สำหรับกลไกการดื้อยากลุ่ม β-lactams ของเชื้อ MRSA เกิดจากเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่ยาจะไปออกฤทธิ์ คือมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน penicillin binding protein (PBP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น transpeptidase ที่ทำหน้าที่สำคัญในการเชื่อมต่อ peptide ของ peptidoglycan เข้าด้วยกันในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยเชื้อ MRSA จะมีการเปลี่ยนแปลง PBP เป็น PBP2a ที่มีบริเวณ active site เปลี่ยนไปทำให้ยากลุ่ม β-lactams เข้าจับไม่ได้หรือจับได้น้อยมาก เอนไซม์ PBP2a จึงไม่ถูกยับยั้งการทำงาน ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างผนังเซลล์ที่สมบูรณ์ได้ เชื้อแบคทีเรียจึงสามารถอยู่รอดได้ (8) การสร้างโปรตีน PBP2a ของเชื้อ MRSA จะถูกควบคุมด้วยกลุ่มยีน mec โดยภายในกลุ่มยีนนี้จะ

ประกอบด้วยยีน mecA, mecI และ mecRI โดยยีน mecA ทำหน้าที่สร้างโปรตีน PBP2a ซึ่งจะถูกควบคุมโดยยีน mecI และ mecRI ที่อยู่ทางด้าน upstream ของ mecA promoter การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง mecI และ mecRI ของเชื้อ MRSA นั้น จะทำให้ยีน mecA สามารถสร้างโปรตีน PBP2a ได้ (9) สำหรับในประเทศไทย จากการเก็บข้อมูลเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพจากโรงพยาบาลจำนวน 28 แห่ง ในช่วงปี พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2556 โดยศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Staphylococcus* spp. ต่อยา erythromycin เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 28 ในปี พ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 47.5 ในปี พ.ศ. 2556 นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีอัตราการดื้อยา clindamycin เพิ่มสูงขึ้นจากร้อยละ 13.3 ในปีพ.ศ. 2543 เป็นร้อยละ 31.7 ในปี พ.ศ. 2556 (2) จากการเพิ่มขึ้นของเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพ ทำให้เกิดผลที่ตามมาที่สำคัญ เช่น เกิดความยุ่งยากในการรักษา เนื่องจากต้องใช้ยาร่วมกันหลายชนิด หรือต้องใช้ยาตัวใหม่ที่มีราคาแพงมาใช้ในการรักษาผู้ป่วย เพราะยาต้านจุลชีพตัวเก่าที่เคยใช้นั้นไม่ได้ผลเท่าที่ควร ทำให้ผู้ป่วยต้องมีค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น ใช้เวลาในการรักษานานขึ้น และมีโอกาสที่ผู้ป่วยจะเสียชีวิตสูงขึ้น

วัตถุประสงค์

1 เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำดีโมสปันเจียได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อราและเอคทิโนมันซีส บริเวณเกาะสาหร่าย อำเภอเมือง จังหวัดสตูล

2 เพื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำดีโมสปันเจีย

3 เพื่อทำสิ่งสกัดจากแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำดีโมสปันเจีย พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดดื้อยาปฏิชีวนะ

4 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้อ 3 และทำการเลี้ยงในปริมาณมากเพื่อผลิตสิ่งสกัดหยาบระดับกรัม

5 แยกและทำสารออกฤทธิ์ในข้อ 4 ให้บริสุทธิ์พร้อมทั้งศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์อย่างละเอียด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับหน่วยงานที่นำการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานการศึกษา ค้นคว้าวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การประมงและเกษตรศาสตร์
2. หน่วยงานการศึกษาระดับมหาวิทยาลัยและหน่วยงานวิจัยอื่นๆ
3. ได้เชื้อจุลชีพอาศัยร่วมฯที่สร้างสารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดื้อยา MRSA
4. ได้สารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA และแนวทางการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์
5.ได้งานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่และสิทธิบัตรการผลิตสารจากเชื้อจุลชีพอาศัยร่วมฯเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำ

1.1 การแยกแบคทีเรียจากฟองน้ำทะเล และเลี้ยงปริมาณมาก (isolation and mass culture)

ใช้วิธีของ Wichels *et al* (2006) สรุปดังนี้ ตัวอย่างฟองน้ำขนาด 1 เซนติเมตร แช่ในน้ำทะเลฆ่าเชื้อเป็นจำนวน 10 ครั้ง เพื่อล้างแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ภายนอกเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นบดชิ้นตัวอย่างฟองน้ำให้ละเอียดในชุดบดปลอดเชื้อ เติมน้ำทะเลฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร เขย่าผสมด้วย vertex กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำ[1] นำไปทำ Spread plate บน MA (Marine Agar, HIMEDIA Lab EA, products code 95021752) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง (ข้อมูลจากการทำ preliminary) จากนั้นคัดเลือกเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี 16 streaks นำเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วไปเลี้ยงใน MB (Marin broth, HIMEDIA Lab, product code 95021754) ใช้ฟลาสขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุ MB ปริมาณ 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในระบบสั่นสะเทือนด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที (ข้อมูลจาก preliminary test) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และมากกว่า 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ ราเอนโดไฟต์และสเตปโตมัยสีท

1.2 การแยกราเอนโดไฟต์/สเตรปโตมัย

1) ราเอนโดไฟท์

นำตัวอย่างฟองน้ำที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ว มากำจัดเชื้อบริเวณผิว โดยแช่ใน 95% เอทานอล นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 5% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน 95% เอทานอล อีกครั้ง นาน 30 วินาที นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วนาน 3-5 วินาที แล้วนำตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร corn meal agar (CMA) ที่เติมยา tetracycline และ ampicillin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่ามีการเจริญของเชื้อรางอกออกมาจากชิ้นตัวอย่างให้ทำการตัดส่วน hyphal tip ของเชื้อรา ภายใต้กล้อง stereo miroscope นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ไม่เติมยาปฏิชีวนะ โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน นับจากวันแรกที่พบการงอกของเชื้อรา เมื่อแยกได้เชื้อราบริสุทธิ์แล้วทำการเก็บเชื้อใน 15 % กลีเซอรอล อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2) สเตรปโตมัยสีท

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 1) แต่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น Yeast-Malt Extract (YM) ที่ไม่ต้องเติมยาปฏิชีวนะ และเก็บตัวอย่างสเตรปโตมัยสีทเป็นเวลา 7 วัน เมื่อแยกได้เชื้อราบริสุทธิ์แล้วทำการเก็บเชื้อใน 15 % กลีเซอรอล อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ / สเตรปโตมัยสีท

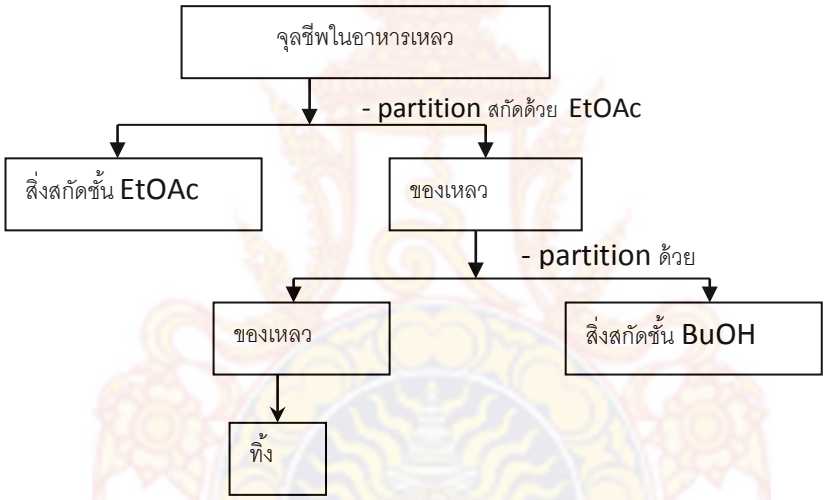
นำราเอนโดไฟต์/สเตรปโตมัยสีท ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (PDA / YM) ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส จนพบมีการเจริญของ colony เชื้อ ตัดชิ้นส่วนบริเวณ

[1] ใช้ชุดกรอง Buchner มี Sintered glass รองด้านบนด้วยสำลีหนา 2-3 cm.

ขอบ colony ให้มีขนาดชิ้นละประมาณ 1x1 ตารางเซนติเมตร แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว PDB/YM ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมา 2 ส่วน คือส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ และเซลล์ของเชื้อ

3. การทำสิ่งสกัดหยาบจากจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (ภาพที่ 4)

นำเชื้อจุลชีพในอาหารเหลว ไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องอัลตราโซนิกส์จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำ ก่อนนำส่วนที่เป็นของเหลวไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามความแรงขั้วเริ่มต้นด้วยเอทิลอะซิเตต (EtOAc) จากนั้นเปลี่ยนเป็นบิวทานอล (BuOH) ตามลำดับ โดยก่อนเปลี่ยนตัวทำละลายอินทรีย์จะตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดด้วยโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อให้แน่ใจว่าสกัดสารแต่ละชั้นสกัดออกมาหมด



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการทำสิ่งสกัดหยาบ

4 การตรวจหาและเตรียมยาเมทิซิลิน (MRSA)

1 การเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

เจ้าหน้าที่ในกลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช จะเก็บเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (MRSA) ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำรายกันในโรงพยาบาลท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560

2 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน (MRSA)

1) การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพโดยวิธี disk diffusion (10)

โดยการนำโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) ประมาณ 3-5 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด tryptic soy broth (TSB) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการเขย่าตลอดเวลา นาน 6 ชั่วโมง

จากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อมาเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland แล้วใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วบิดกับข้างหลอดให้หมาดๆ นำมาป้ายบน Mueller Hinton agar (MHA) ให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งประมาณ 3-10 นาที จากนั้นใช้ forceps คีบแผ่นยา cefoxitin (30 ไมโครกรัม) มาวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อกดเบาๆ เพื่อให้แผ่นยาต้านจุลชีพติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดโซนยับยั้ง (inhibition zone) ของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ โดยถ้าเป็นเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน จะให้ขนาดโซนยับยั้งต่อแผ่นสารต้านจุลชีพ cefoxitin (30 ไมโครกรัม) เท่ากับหรือน้อยกว่า 21 มิลลิเมตร

2) การตรวจหายีนดื้อยา methicillin ชนิด *mec*A ในเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลิน โดยวิธี PCR (11)

โดยการนำ genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียมาตรวจหายีนดื้อยา methicillin ชนิด *mec*A โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะเตรียมโดยปริมาตรสุดท้ายทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา โดยในปฏิกิริยาจะมีความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์แต่ละเส้น, PCR buffer, deoxyneucleotide triphosphates (dNTPs), $MgCl_2$ และ *Taq* DNA polymerase เท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์, 1x, 0.20 มิลลิโมลาร์, 1.50 มิลลิโมลาร์ และ 0.65 ยูนิต ตามลำดับ และเติม DNA ต้นแบบ จำนวน 2 ไมโครลิตร สำหรับขั้นตอนการทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ขั้นตอนการทำ PCR ในการตรวจหายีนดื้อยา methicillin ชนิด *mec*A (28)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ (รอบ)
Initial denaturation	94	5 นาที	1
Denaturation	95	45 วินาที	40
Annealing	59	45 วินาที	
Extension	72	45 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	1

5 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดจากจุลชีพร่วมอาศัย

นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์มาสกัดด้วยตัวทำละลายจะได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบของเซลล์ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะ MRSA ที่แยกได้จากข้างต้น ของสารสกัดหยาบทั้งสองส่วนที่ได้จากเชื้อราด้วยวิธี agar well diffusion หรือ colorimetric broth microdilution method และหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และค่า minimal bactericidal concentration (MBC) ด้วยวิธี broth microdilution โดยใช้ resazurin เป็น indicator โดยใช้ยา Vancomycin เป็นตัวควบคุม (reference drug) สำหรับแบคทีเรีย (18)

6 การวิเคราะห์ชนิดของจุลชีพโดยวิธี 16s rRNA

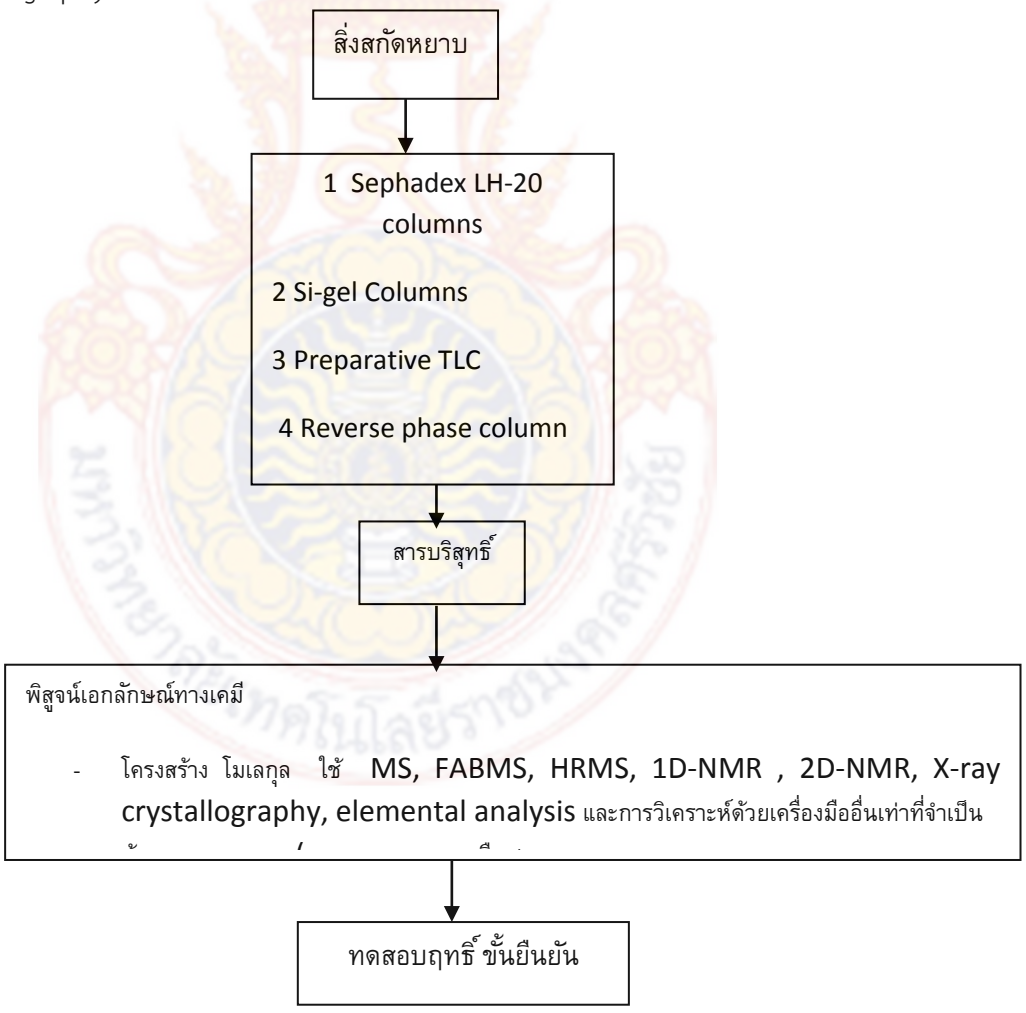
วิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Pathell *et al*., (2000)

7 การแยกหาและทำสารมีฤทธิ์ให้บริสุทธิ์

ใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบต่างๆ (ภาพที่ 5) พร้อมๆ กับใช้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวชี้นำการแยก

8 การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารบริสุทธิ์

ใช้วิธีการทางสเปกโทรสโกปีแบบต่างๆ เริ่มต้นจากการวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเครื่อง Low Mass spectrometry ลำดับต่อมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Nucleasr Magnetic Resonance (NMR) โดยวิเคราะห์ H NMR ก่อน นำผลทั้งสองเครื่องมือมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Marinlit หากพบว่าเป็นสารใหม่หรือมีสัญญาณซับซ้อนจะวิเคราะห์ต่อด้วย ^{13}C-NMR, HMQC, HMBC, COSY, NOESY ตามลักษณะโครงสร้างที่พบ กรณีเป็นสารใหม่จะวิเคราะห์ HRMS หรือ X-ray crystallography เพิ่มเติม

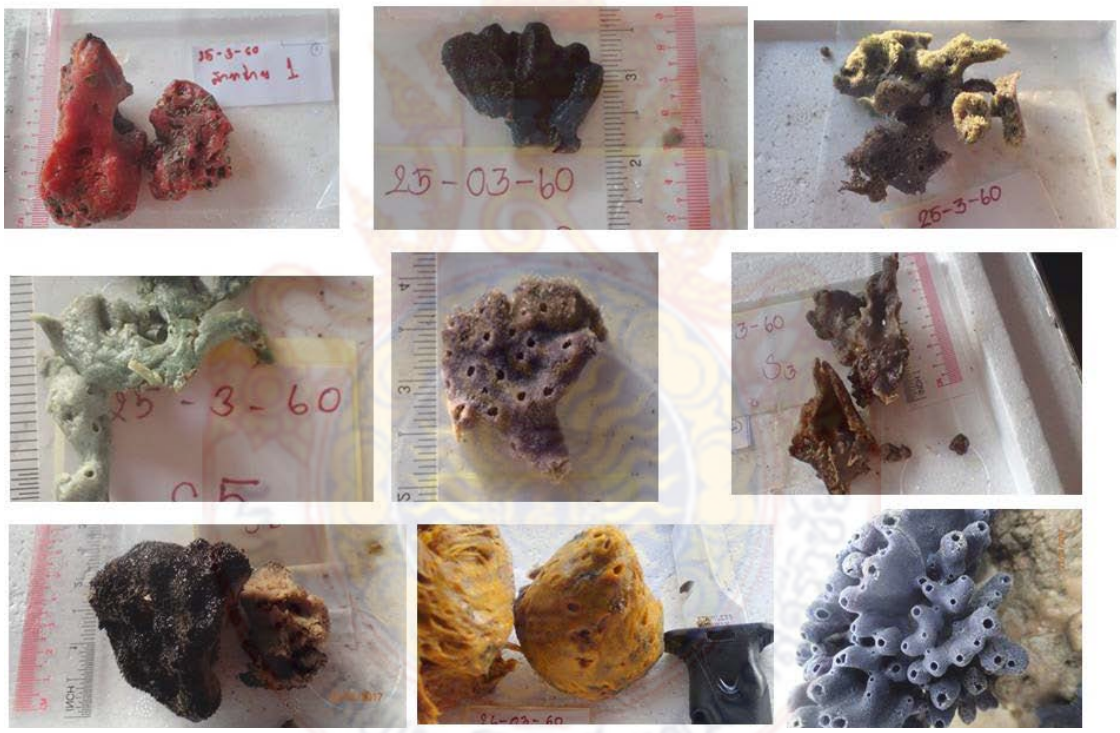


ภาพที่ 5 การแยกและทำสารมีฤทธิ์ให้บริสุทธิ์

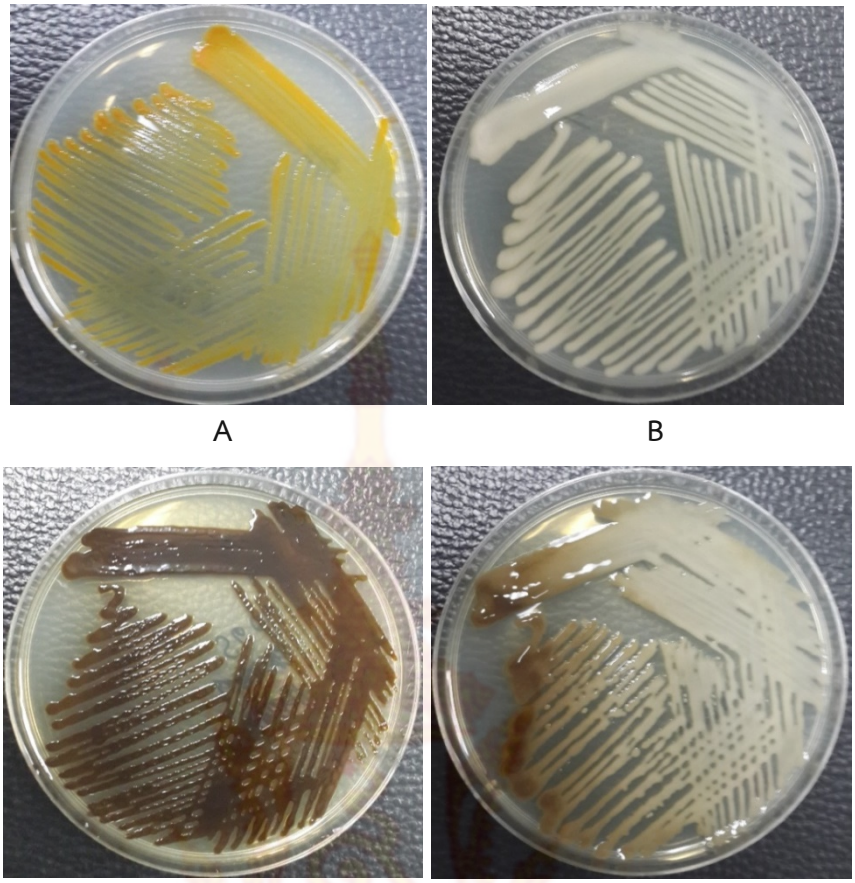
ผลการวิจัย

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมและที่เป็นเอนโดไฟต์ในฟองน้ำทะเล

จากการแยกแบคทีเรียอาศัยอยู่อย่างอิสระในทะเลและอาศัยร่วมกับฟองน้ำ (ภาพที่ 6) บริเวณเกาะสาหร่าย จังหวัดสตูล การแยกเชื้อเอนโดไฟต์แบคทีเรีย โดยวิธีการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวบนอาหาร marine agar (MA) และวิธีขีดเชื้อสำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียจากโคลนบริเวณที่อยู่อาศัยของฟองน้ำ ได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต แบ่งเป็นแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล 4 ไอโซเลต (ภาพที่ 7) และที่เป็นเอนไดรไฟด์แบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลต (ภาพที่ 8) และพบแบคทีเรียจากโคลนบริเวณฟองน้ำอยู่อาศัยจำนวน 2 ไอโซเลต (ภาพที่ 9) แบคที่เรียที่พบทั้งหมกส่วนใหญ่เป็นแกรมลบ มีการเจริญสร้างแคปซูลทำให้มีลักษณะเป็นเมือกลื่น หรือมูกเยิ้ม พบได้ทั้งในรูปแบบ free-living และเป็น epibiotic



ภาพที่ 6 ฟองน้ำดีโมสปองเจียที่ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัย

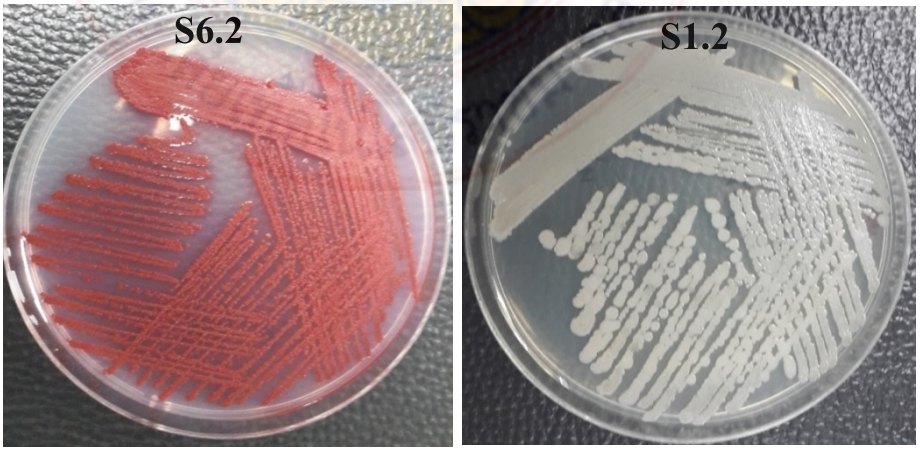


A B

C D

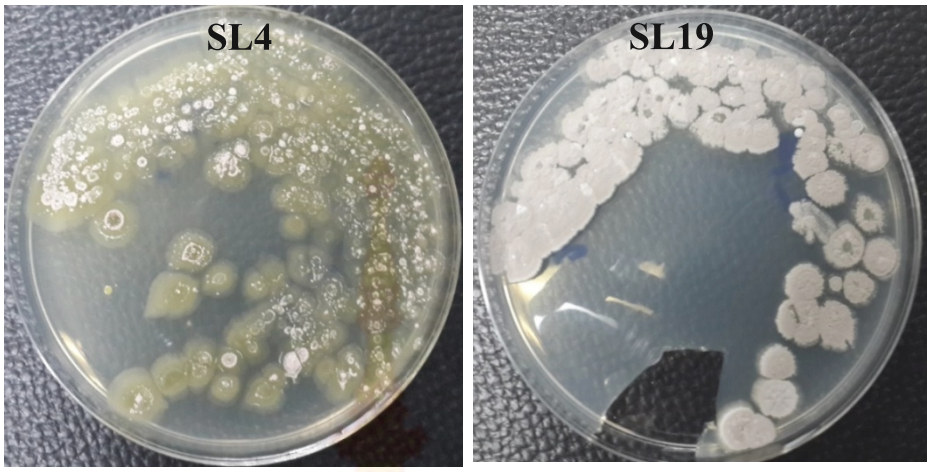
ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียมูกเยิ้ม มันวาว ที่ตรวจพบเป็นประชากรส่วนใหญ่จากแบคทีเรียร่วมอาศัยกับฟองน้ำ

สำหรับโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบเฉพาะในชิ้นส่วนฟองน้ำมีลักษณะสำคัญ คือฝังวุ้นผิวหน้าด้าน พบจากฟองน้ำรหัส S6.2 มีโคโลนีสีแดง (ภาพที่8 A) และโคโลนีสีครีม แบนราบ ลักษณะผิวหน้าด้าน พบจากฟองน้ำรหัส S1.2 (ภาพที่8 B) ซึ่งทั้งสองลักษณะแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นดัชนี



A B

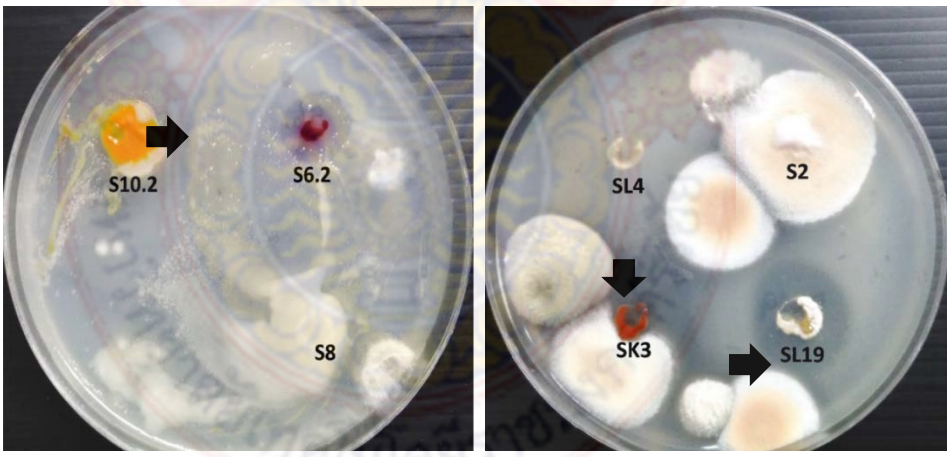
ภาพที่ 8 ลักษณะโคโลนีเอนโดไฟต์ที่พบในฟองน้ำโดยให้ A เป็นรหัส S6.2 และให้ B เป็นรหัส S1.2



A B

ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่แยกได้จากโคลน โดยให้ A รหัสเป็น SL4 และ B ให้รหัสเป็น SL19

ในเบื้องต้นพบว่าโคโลนี S6.2, SL19 และ ไอโซเลท SK3 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมาตรฐาน *Staphylococcus aureus* TISTR 517 ได้เมื่อทดสอบด้วยวิธีราดทับ (overlay) (ภาพที่ 10) และพบว่าเฉพาะไอโซเลท S6.2 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อ MRSA ได้ ส่วนไอโซเลท S1.2 สามารถต้านการเจริญของเชื้อราได้



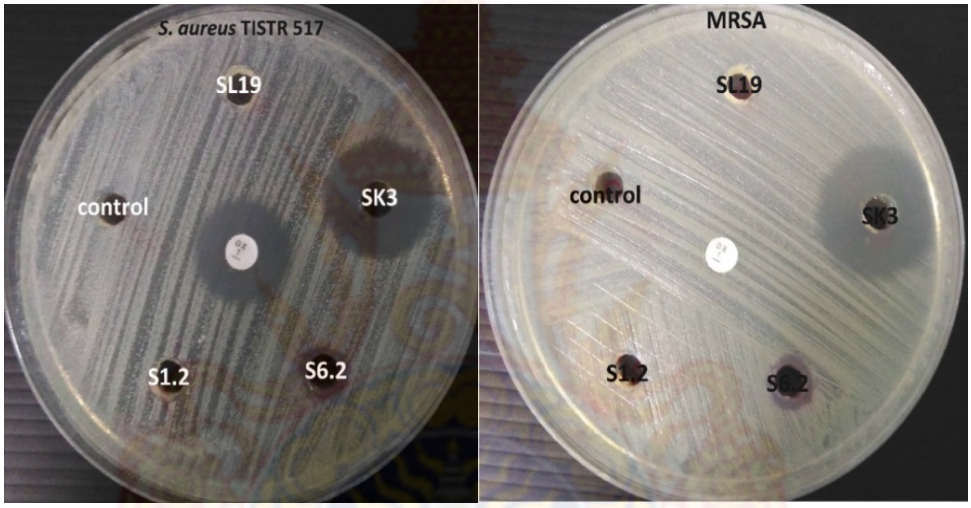
A B

ภาพที่ 10 แสดงวงใส (บริเวณลูกศรชี้) ของการต้าน *S. aureus* TISTR 517 ของไอโซเลท S6.2 (A), SL19 และ SK3 (B) ด้วยวิธีราดทับ (overlay)

ทำการคัดเลือกไอโซเลท S1.2, S6.2, SK3 และ ไอโซเลท SL19 (ภาพที่ 10) ไปศึกษาต่อโดยนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Marine broth (MB) และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปศึกษาฤทธิ์ต้าน *S. aureus* TISTR517 และ ฤทธิ์ต้าน MRSA พบว่าไอโซเลท SK3 แสดงฤทธิ์ปฏิชีวนะต้านเชื้อดัชนีทั้ง 2 ชนิด ได้วงใสของการยับยั้งเชื้อได้สูงสุด ภายในระยะเวลาของการบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ในสภาวะการบ่มเลี้ยงที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่11

อย่างไรก็ตามไอโซเลท S6.2 (ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำ) ก็เริ่มให้วงใสของการยับยั้งเชื้อในวันที่ 2 ของการบ่มเลี้ยงดังกล่าวเช่นกัน จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียอาศัยร่วมกับฟองน้ำที่เป็น real endophytic bacteria รหัส S6.2 มาทำการศึกษา เพื่อหาสารออกฤทธิ์ต่อไป

ในเบื้องแรกทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียรหัส S6.2 โดยวิธี 16s rDNA พบว่ามียีนจำนวน 1494 ลำดับเบส (ภาพที่ 12) เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลยีนพบว่าตรงกับแบคทีเรียชนิด *Pseudoalteromonas piscicda* ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้กำลังวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งหนึ่งเพื่อทำ phylogenic tree ในระดับยืนยันผล เมื่อนำแบคทีเรียชนิดนี้ไปเลี้ยงแบบเพิ่มปริมาณ (mass culture) สามารถทำสิ่งสกัดหยาบจากแบคทีเรียที่สร้างสารมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ในปริมาณ 300 มิลลิกรัม พร้อมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้น โดยใช้เครื่อง HPLC (ภาพที่ 13)

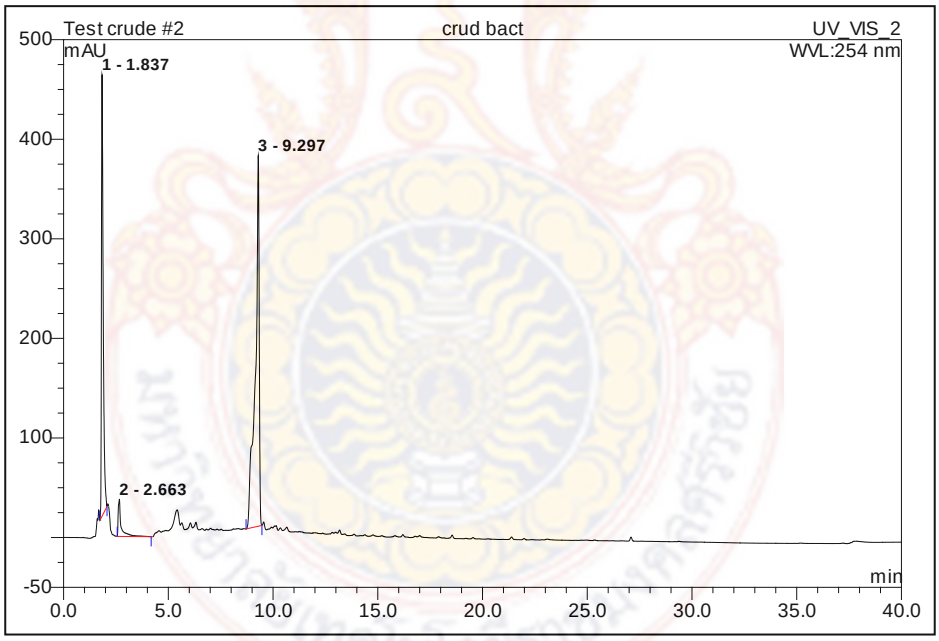


A B

ภาพที่ 11 วงใสของการต้านเชื้อ *S. aureus* TISTR517 (ซ้ายมือ) และ MRSA (ขวามือ) เมื่อ ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion

>BR-c3-completed 1494bp to Pseudoalteromonas piscicida
AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACATTTCTAGCTTGCTAGAA
GATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGCCTTTAGGTGGGGGACAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCG
CATAACGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCAC
TTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGTCGTTAATACCGGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGAGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATG
TGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTCGAACTGGCAAACTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTCAGGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACGCTCATGTACGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGGAGCTGGGGTCTTCGGACAACTTTTCC
AAAGCTAACGCATTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATACAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGT
GCCTTCGGGAACTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTATCCTTAGTTGCCAGCGATTCGGTCGGGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG
TCAAGTCATCATGGCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAGAGTGCTGCGAACTTGCGAGAGTAAGC
GAATCACTTAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
AATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTGGATAGCTT
AACCTTCGGGAGGGCGTTCACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCG

ภาพที่ 12 ผลการวิเคราะห์ 16S rDNA ของแบคทีเรียร่วมอาศัยกับฟองน้ำ (S6.2)



ภาพที่ 13 HPLC chromatogram ของสารสกัดหยาบจากแบคทีเรีย S6.2

วิจารณ์ผลการวิจัย

การค้นสารปฏิชีวนะใหม่ๆ มีความสำคัญมาก เพื่อแก้ไขปัญหาโรคที่เกิดจากเชื้อดื้อยาที่และการเสียชีวิตอันเนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะยาวนาน การหาสารออกฤทธิ์ปฏิชีวนะจากแบคทีเรียในทะเล มีความสำคัญเป็นอย่างมากเพราะมักผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Colwell, 2002) แต่ความเข้มข้นของสารที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลมีความเข้มข้นน้อยกว่า 1 ในล้านของน้ำหนักเปียก (Proksch *et al*., 2002) หากต้องการสารเหล่านี้ในปริมาณสูงจำเป็นต้องใช้สิ่งมีชีวิตดังกล่าวในปริมาณมากอาจทำให้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษากลุ่มจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตดังกล่าว เช่นในเนื้อเยื่อฟองน้ำ มีกลุ่มแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกันแบบ symbiotic โดยแบคทีเรียได้อาหารจากฟองน้ำและทำให้ฟองน้ำคงรูปร่างอยู่ได้ (Monks *et al*., 2002) ซึ่งจะเห็นได้ว่ากลุ่มเอนโดไฟต์แบคทีเรีย สร้างสารมีฤทธิ์ปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี และไม่จำเป็นต้องใช้ทรัพยากรที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

การวิจัยครั้งนี้เป็นปีที่ 1 ของโครงการ ทีมวิจัยพบแบคทีเรียเป้าหมาย (S6.2) แยกได้จากเนื้อเยื่อชั้นในของฟองน้ำชนิดหนึ่ง (กำลังอยู่ในขั้นตอนการจัดจำแนกชนิดฟองน้ำ)จากการวิเคราะห์จำแนกชนิดโดยวิธี 16s rDNA พบว่าเป็นเชื้อ *Pseudoalteromonas piscicida* ลักษณะทางสันฐานวิทยาที่สำคัญของเชื้อนี้ คือโคโลนีมีสีแดงสดหรือแสด ฝังตัวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง โคโลนีมีลักษณะมันวาว แบคทีเรียชนิดนี้มักอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อฟองน้ำหลายชนิด ส่วนมากเป็นกลุ่มดีโมสปองเจีย เช่น ในฟองน้ำ *Hymeniacidon perleve* (Zheng *et al*., 2005) *Suberites* spp. เป็นต้น (Thakur *et al*., 2005) ส่วนสารที่สร้างโดยแบคทีเรียชนิดนี้ แตกต่างกันตามสภาพภูมิประเทศ เท่าที่พบรายงาน คือสายพันธุ์ s204 ซึ่งแยกได้จากฟองน้ำเขตขั้วโลกสร้างสาร Siderophore ซึ่งเป็นสารที่มีการแทนที่ของวงแหวน imidazole มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ยังไม่พบว่ารายงานการยับยั้งเชื้อ MRSA (Sonnenschein *et al.,* 2017) กรณีสายพันธุ์ที่พบโดยทีมวิจัย (S6.2) มีฤทธิ์ชีวภาพแตกต่างไปจากที่พบจากภูมิภาคอื่น คาดว่าน่าจะเป็นสารกลุ่มอื่นเพราะออกฤทธิ์เจาะจงต่อ MRSA ดังนั้นในการวิจัยช่วงที่ทีมวิจัยประสบความสำเร็จในการค้นหาเชื้อเป้าหมาย และจำแนกเชื้อพร้อมทั้งสภาวะการเลี้ยงแบบ mass culture ได้ ในปีที่2 คณะวิจัยจะทำการแยกเอาสารมีฤทธิ์ออกมา เพื่อศึกษาลักษณะทางเคมีอย่างละเอียดต่อไป

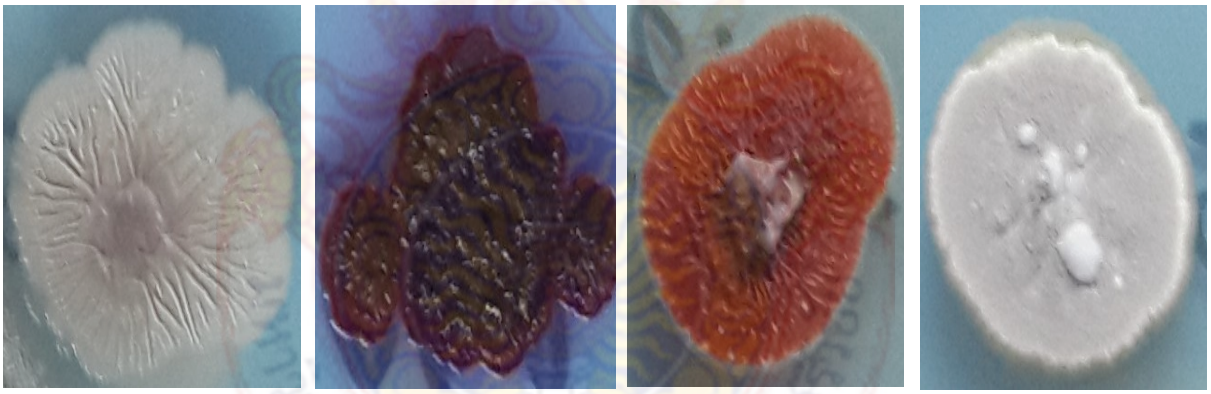
สรุปผลการทดลอง

สามารถคัดแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากตัวอย่างฟองน้ำ และจุลินทรีย์ที่อยู่บนพื้นผิว รวมไปถึงกลุ่มที่อาศัยอยู่เป็นอิสระในทะเลของเกาะสาหร่าย จังหวัดสตูล โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้รหัส S6.2, SK3 และ SL19 แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดัชนีได้ จึงน่าสนใจนำไปแยกสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อศึกษาดูโครงสร้างและนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานของสารออกฤทธิ์ปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์ในทะเลต่อไป

สิ่งที่คาดว่าจะทำต่อไป

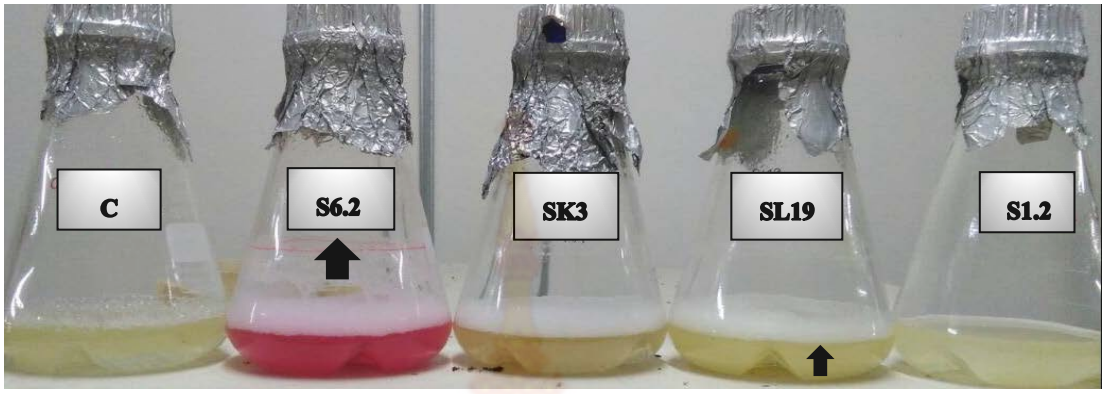
1. พิสูจน์แยกวินิจฉัยชนิดของเชื้อด้วยการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA และหาลำดับวิวัฒนาการที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์แห่งชาติ (ศช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

2. ฝากเก็บรักษาไอโซเลทของเชื้อไว้ที่สำนักงานวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) โดยคัดเลือกไอโซเลท S1.2, S6.2, SK3 และ SL19 ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 โคโลนีของไอโซเลท S1.2, ไอโซเลท S6.2, ไอโซเลท SK3, ไอโซเลท SL19 (เรียงจากซ้ายมือมาทางขวามือ)

3. เตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ (ภาพที่ 15) และแสดงฤทธิ์ปฏิชีวนะต้าน MRSA ให้อยู่ในรูปผงแห้งแล้วส่งไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีต่อไป



ภาพที่ 15 ลักษณะการเจริญของไอโซเลทที่คัดแยกได้ (S6.2, SK3, SL19 และ S1.2) เมื่อเจริญ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine broth (MB) ; C คือ ขวดควบคุมผลลบ. ลักษณะของไอโซเลท S6.2 น่าสนใจเนื่องจากต้าน *S. aureus* TISTR 517 (รูปที่ 10) และต้าน MRSA

เอกสารอ้างอิง

พชร เพ็ชรประดับ. 2553. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกัลปังหา *Junceella* sp. และฟองน้ำ *Xestospongia* sp. บริเวณจังหวัดกระบี่. เอกสารรายงานการวิจัย. สำนักงานสนับสนุนการวิจัย. 84 น.

สถาบันสุขภาพแห่งชาติ. 2556. **สถานการณ์เชื้อดื้อยา.** ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ. แหล่งที่มา: http://narst.dmsc.moph.go.th/antibiotrend.pdf, 8 กันยายน 2557.

สำนักงานนิเทศและประชาสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข. 2556. **สถานการณ์เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในไทย.** ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ. แหล่งที่มา: http://narst.dmsc.moph.go.th/news001.html, 8 กันยายน 2557.

Alipour, F., Ahmadi, M., and Javadi, S. 2014. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J Infect Public Health** 7(3): 186-91.

Appelbaum, P.C. 2006. MRSA-the tip of the iceberg. **Clin Micribiol Infect.** 12 (2)**:** 3-10.

Beam, J.W. and Buckley, B. 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Prevalence and risk factors. **J Athl Train**. 41: 337-40.

Bhilabutra, W., Techowisan, T., Peberdy, J.F. and Lumyong, S. 2007. Antimicrobial activity of bioactive compounds from Periconia siamensis CMUGE015. **Research Journal of Microbiology**. 2: 749-755.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H. and Prinsep, M.R. 2012. Marine natural. **product. Nat. Prod**. 29 : 144-222.

Bugni, T.S. and Ireland, C.M. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Nat. Prod.** 21 : 143-163.

Chinworrungsee, M., Kittahoop, P., Isaka, M., Rungrod, A., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y. 2001. Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus Halorosellinia oceanica. **Bioorganic and Medicinal Letter.** 11: 1965–1969.

Debbab A., Aly A.H., Lin W.H. and Proksch P. 2010. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. Microbial. Biotechnol. 3 : 544-563.

Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, *et al*. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. **Ann Intern Med** 2002; 137(10): 791-799.

Jean, B.P., Melvin, P.W., George, M.E. and James, S.L. 2017. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 37 (1): 248-250.

Hartman, B.J. and Tomasz, A. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**. 158(2): 513-601.

Kelecom, A. 2002. Secondary metabolite from marine microorganisms. Annals. Brazilian. **Acad. Sci** 71:151-170.

Kyung, Y., Lee, H.J. and Lee, H.K. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. **J. Microbiol**. 39: 254-264.

Lee, Y.K., Lee, J.H. and Lee, H.K. 2001. Microbial symbiosis in marine sponge. **J. Microbial.** 39:254-264.

Liu, C. and Chambers, F.H. 2003. *Staphylococcus aureus* with heterogeous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance and critical assessment of diagnostic methods. ***Antimicrob Agents Chemother.*** 47: 304–521.

Mishra, M., Prasad, R. and Varma, A. 2015. Endophytic Fungi: Biodiversity and Function. **Inernational Journal of Pharma and Bio Sciences.** 6(1): 18 – 36.

Photita, W., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Lumyong, S. 2003. Saprobic fungi on dead wild banana. **Mycotaxon.** 80: 345–356.

Proksch, P., Edrada, R.A. and Ebel, R. 2002. Drugs from the seas – current status and microbiological implications. **Microbiol. Biotechnol.** 59:125–134.

Remya, T., Thomas, A., Devanand, P. K. and Ponnapakkam, A. L. 2010. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review. **Drug**. 8: 1417-1468.

Ruppert, E.E. and Barnes, R.D., 1994. Invertebrate zoology, **Sauders College Publishing.** :1056.

Sarker, S.D., Nahar, L. and Kumarasamy, Y. 2007. Microtiterplate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods.** 42: 321–324.

Sonnenschein, E.C., Stierhof, M., Goralczyk, S., Vaber, F.M., Pellissier, L., Hanssen, K.Q., Cruz, M., Diaz, C., witte, P., Commans, D., Andersen, J.H., Hansen, E., Kristoffersen, V., Tormo, J.R., Ebei, R., Milne, B.F., Deng, H., Gram, L., Jaspars, M. andTabudravu, J.N. 2017. Pseudochelin A, asideropore of *Pseudoalteromonas piscicida* S2040. **Tetrahedron**. 73:2633-2637.

Supaphon, P., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J. 2013. Antimicrobialpotential of endophytic fungi derived from three seagrass species: Cymodocea serrulata, Halophila ovalis and Thalassia hemprichii. **PLoSOne**. 16(8): 1099-1371.

Swartz, M.N. 1994. Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. **Proc Natl Acad Sci.** 91(7): 2420-7.

Tenover, F.C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am J Med** 119(61): 3-10.

Thakur, A.N., Thakur, .L., Indap, M.M., Pandit, R.A., Datar, V.V. and Muller, W.E.G. 2005. Antiangiogenic, antimicrobial, and cytotoxic potential of sponge-associated bacteria. **Microbiol. Biotechnol.** 7:245-252.

Unson, M.D., Holland, N.D., Faulkner, D.J. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of marine sponge accumulation of the crystalline metabolite in sponge tissue. **Mar. Biolo.** 119**:** 1-11.

Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrungsi, N. and Meevootisom, V. 2003. Endophytic fungi with anti-micribial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 20: 1–8.

Zheng, L., Chen, H., Han, X., Lin, W. and Yan, X. 2005. Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidom perleve*. **Microbiol. Biotechnol.** 21:201-206.