

การคัดกรองสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากไซยาโนแบคทีเรีย

Anabaena spp. และ *Nostoc* spp.

Screening of Antibacterial Substances from Cyanobacteria *Anabaena* spp. and *Nostoc* spp.

สุกัลยา อุทัยดา, วิภาวดี แขวงเมฆ, สุเปญญา จิตตพันธ์

และเทพปัญญา เจริญรัตน์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Sugunya Utaida, Vipawadee Khlangmake, Supenya Chittapun

and Theppanya Charoenrat*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

ไซยาโนแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Anabaena* spp. และ *Nostoc* spp. ถือเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญหลายชนิด จากการทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดกรองสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion พบว่ามีไซยาโนแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และพบว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยเมทานอล และเอทิลอะซิเตทสามารถสกัดสารยับยั้งแบคทีเรียได้ ในขณะที่สารสกัดโดยใช้โทลูอีน เฮกเซน และน้ำไม่มีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ สำหรับการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) พบว่า *Enterobacter aerogenes* TISTR 1540 ถูกยับยั้งได้มากที่สุด โดยสารสกัดที่ได้จาก *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 ซึ่งให้ค่า MIC เท่ากับ 2.08 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร รวมถึงยังสามารถยับยั้ง *Escherichia coli* TISTR 780, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 และ *Bacillus subtilis* TISTR 008 โดยให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 4.17-8.33 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีค่า MBC เท่ากับ 16.67 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* C5-BG001 ที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถฆ่า *Staphylococcus aureus* TISTR 885 ที่ค่า MBC เท่ากับ 8.33 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร จากการวิจัยนี้เป็นเครื่องยืนยันว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* spp. และ *Anabaena* spp. เป็นแหล่งที่สำคัญสำหรับคัดกรองยาชนิดใหม่ในอนาคต

คำสำคัญ: *Anabaena* spp.; *Nostoc* spp.; การออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย; ไซยาโนแบคทีเรีย

*ผู้รับผิดชอบบทความ : thep@tu.ac.th

Abstract

Anabaena spp. and *Nostoc* spp. are a potential source of many important bioactive compounds. Primary screening for antibacterial compounds employing disk diffusion technique revealed that five from six of cyanobacterial isolates produced antibacterial substances. Solvents used affected the extraction efficiency. Methanol and ethyl acetate extracts exhibited antibacterial activity, whereas toluene, hexane, and aqueous extracts showed no activity against the bacteria tested. Minimum inhibitory concentration test unveiled that *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 extract had the most effective activity against *Enterobacter aerogenes* TISTR 1540 with the MIC value of 2.08 mg dry weight ml⁻¹. Likewise, the extract inhibited growth of *Escherichia coli* TISTR 780, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, and *Bacillus subtilis* TISTR 008 with MICs in a range of 4.17-8.33 mg dry weight ml⁻¹. Additionally, most of the extracts showed minimum bactericidal concentration of 16.67 mg dry weight ml⁻¹ against the bacteria tested. Nevertheless, methanol extract of *A. siamensis* C5-BG001 had the MBC value of 8.33 mg dry weight ml⁻¹ against *Staphylococcus aureus* TISTR 885. The results strengthen that *Nostoc* spp. and *Anabaena* spp. are meaningful sources for screening of novel drugs in the future.

Keywords: *Anabaena* spp.; *Nostoc* spp.; antibacterial activity; cyanobacteria

1. บทนำ

ปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคและการอุบัติของโรคชนิดใหม่มีมากขึ้น ทำให้การศึกษาเพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตได้รับความสนใจและศึกษาอย่างแพร่หลาย โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่คัดกรองได้ส่วนใหญ่มาจากพืช รา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีท อย่างไรก็ตาม การคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันไป ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ มีจำนวนชนิดของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์มากมาย ซึ่งจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญในการศึกษาคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิต [1]

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นจุลสาหร่าย สามารถ

สังเคราะห์ด้วยแสงเพื่อการเติบโตเช่นเดียวกับพืช ใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว ไซยาโนแบคทีเรียจึงเป็นสิ่งมีชีวิตอีกกลุ่มหนึ่งที่เป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ [2] โดยมีรายงานว่าไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านทานแบคทีเรีย [3] สารต้านรา [4] สารต้านไวรัส และสารต้านการเกิดมะเร็ง [5,6] Pedersen และ Dasilva (1973) ได้รายงานว่า *Calothrix brevissima* สามารถผลิตสาร bromophenol ที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย [7] และ Mundt และคณะ (2003) รายงานว่า *Oscillatoria redekei* สามารถผลิตกรดไขมันที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เช่นเดียวกัน [8] นอกจากนี้ไซยาโนแบคทีเรียในวงศ์ Nostocaceae โดยเฉพาะสกุล *Nostoc* และ *Anabaena* มีการรายงานอย่างต่อเนื่อง

ว่าสามารถผลิตสารยับยั้งและต้านทานจุลินทรีย์ได้ โดย *Nostoc mucorum* สามารถผลิตสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบรวมถึงราได้ [9] *Anabaena wisconsinense* สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา [2] *N. insulare* สามารถผลิตสาร 4,4'-dihydroxybiphenyl ที่มีสมบัติในการยับยั้งได้ทั้งสาหร่าย รา และแบคทีเรีย [10] และจากการสืบค้นเอกสารที่เกี่ยวข้องพบว่านอกจากชนิดของไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเป็นอีกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อชนิดของสารสกัด โดยมีรายงานว่า เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก *Anabaena* sp. Bory ISC55 ซึ่งมีสมบัตียับยั้งได้ทั้งราและแบคทีเรีย [11] ในขณะที่เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดสารยับยั้งราและแบคทีเรียจาก *A. flosaquae* [12]

ไซยาโนแบคทีเรียในวงศ์ Nostocaceae หลายชนิดสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ประกอบกับการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรียในประเทศไทยยังมีอยู่น้อย งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียจากวงศ์ Nostocaceae ที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย รวมถึงศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด และทดสอบสารสกัดที่ได้ด้วยวิธีมาตรฐานตาม NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [13,14] เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาทางการแพทย์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยนี้มี 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena siamensis* TISTR 8012, *Anabaena siamensis* C5-BG001, *Nostoc* sp.

C8A2-BG002, *Nostoc* sp. *A2-BG003*, *Nostoc* sp. *A3A1-BG004* และ *Nostoc* sp. *A1-BG005* โดยสายพันธุ์ที่มีรหัส TISTR ได้จากฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และสายพันธุ์ที่มีรหัส BG เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากโครงการวิจัยก่อนหน้าของกลุ่มวิจัยสาหร่ายและแพลงก์ตอน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

2.2 การเพาะเลี้ยงและการเตรียมเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย

เลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ ในถังฟองอากาศ (bubble tank) ขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารสูตร Blue Green 11 (BG-11) [15] ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน (NaNO_3) เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ทุกสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ อาหาร BG-11 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.04 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036 กรัม กรดซิตริก ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 6.56 มิลลิกรัม เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Fe}_x\text{N}_y\text{O}_7$) 6.0 มิลลิกรัม อีดีทีเอ (EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid) 1.04 มิลลิกรัม Na_2CO_3 0.02 กรัม และธาตุอาหารรอง Trace metal mix A5 1 มิลลิลิตร โดยธาตุอาหารรอง Trace metal mix A5 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย H_3BO_3 2.86 กรัม $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 กรัม $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.222 กรัม $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.39 กรัม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 มิลลิลิตร (ที่มีความเข้มข้น 79 กรัมต่อลิตร) และ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 มิลลิลิตร (ที่มีความเข้มข้น 49.4 กรัมต่อลิตร) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ให้แสงด้วยหลอดแสงขาวแบบเย็น (cool white) ที่มีกำลังไฟขนาด 36 วัตต์ ตลอด 24 ชั่วโมง โดยตั้งหลอดไฟห่างจากผนังด้านนอกของถังฟองอากาศประมาณ 30 เซนติเมตร เมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ซึ่งใช้เวลาประมาณ

10 วัน จึงเก็บเกี่ยวเซลล์โดยอาศัยการนอนก้นในกรวยอิมฮอฟ (imhoff funnel) และ/หรือ การเหวี่ยงแยก นำเซลล์ที่ได้อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดให้เป็นผงละเอียดสำหรับใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

2.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียจากไฮยาโนแบคทีเรีย

Kaushik และ Chauhan (2008) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของสารสกัดจากไฮยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis* โดยพบว่าชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดมีผลต่อการออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของสารที่สกัดได้ [16] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลายสกัดที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ เมทานอล เอทิลอะซิเตท โทลูอีน เฮกเซน และน้ำ

การสกัดทำได้โดยชั่งผงเซลล์ไฮยาโนแบคทีเรียที่ผ่านการอบแห้งแล้ว 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เก็บสารสกัดส่วนใส ทำการสกัดซ้ำเป็นจำนวน 3 รอบ รวบรวมสารสกัดส่วนใสจากทั้ง 3 รอบของการสกัดเข้าด้วยกัน นำสารสกัดที่รวบรวมได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศ ละลายสารสกัดแห้งที่ได้ให้มีปริมาตรสุดท้าย 3 มิลลิลิตร ในสารละลายดีเอ็มเอสโอ (DMSO, dimethyl sulfoxide) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดที่ได้ 1 มิลลิลิตร ได้จากเซลล์ไฮยาโนแบคทีเรียแห้ง 33.33 มิลลิกรัม โดยการศึกษาการออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียตลอดการวิจัยนี้จะรายงานความเข้มข้นของสารสกัดในรูปปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาตรของสารสกัด ซึ่งวิธีการสกัดและการรายงานความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ดัดแปลงจาก Khairy และ El- Kassas (2010)

2.4 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากไฮยาโนแบคทีเรีย

2.4.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

การวิจัยนี้ใช้แบคทีเรียทดสอบทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Enterobacter aerogenes* TISTR 1540, *Escherichia coli* TISTR 780, *Klebsiella pneumonia* TISTR 1383, *Proteus mirabilis* TISTR 100 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 และแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Enterococcus faecalis* TISTR 888, *Micrococcus luteus* TISTR 884 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 885 โดยเลี้ยงในอาหาร Muller Hilton broth (MHB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที โดยให้แบคทีเรียมีความเข้มข้นเริ่มต้น 10^8 CFU/มิลลิลิตร

2.4.2 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียในเบื้องต้นด้วยวิธี disk diffusion

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion ดำเนินการตามมาตรฐาน NCCLS [14] โดยนำสารสกัดจากไฮยาโนแบคทีเรียจากหัวข้อ 2.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นทดสอบที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร (AA DISCS 6 mm, GE Healthcare, UK) ทิ้งให้แห้ง โดยแต่ละแผ่นทดสอบมีสารสกัดที่ได้จากเซลล์ไฮยาโนแบคทีเรีย 1.67 มิลลิกรัม ตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้ น้ำกลั่น สารละลายดีเอ็มเอสโอความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดไฮยาโนแบคทีเรียที่สกัดด้วยน้ำ และตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ใช้ ampicillin 10 ไมโครกรัม ciprofloxacin 5 ไมโครกรัม sulfanilamide 30 ไมโครกรัม และ chloramphenicol 50 ไมโครกรัม จากนั้นใช้ไม้พัน

ลำลีปราศจากเชื้อ เกลี่ยแบคทีเรียทดสอบที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร MHA ทิ้งไว้ 10-15 นาที วางแผนทดสอบลงบนผิวน้ำอาหาร โดยทำการวิจัยทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร เปรียบเทียบขนาดของโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นกับแผ่นทดสอบที่มีตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ

2.4.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี broth dilution

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) ในการวิจัยนี้ดำเนินการตามมาตรฐาน NCCLS [13] โดยใช้วิธี broth dilution ซึ่งทำโดยเติมสารแขวนลอยเซลล์ที่มีความเข้มข้น 10^6 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน microtiter plate ชนิด 96 หลุม เติมน้ำอาหาร MHB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใส่สารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่ได้จากการวิจัยในหัวข้อ 2.3 ลงไป 100 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดเท่ากับ 33.33 มิลลิกรัม ของเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ความเข้มข้นลดลงทีละครึ่ง (2-fold serial dilution) โดยมีหลุมที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก คือ หลุมที่ไม่มีสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย (ใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในกรณีที่แบคทีเรียมีการเติบโต) และหลุมที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบ คือ หลุมที่ไม่ใส่แบคทีเรีย (ใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในกรณีที่ไม่มีแบคทีเรียเติบโตของแบคทีเรีย) ในการวิจัยนี้เลือกใช้ resazurin ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นสารบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย จากนั้นผสมให้เข้ากัน

แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านการเจริญของแบคทีเรียโดยพิจารณาว่าหากสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้จะแสดงผลลบ คือ สารจะยังคงเป็นสีม่วงเข้ม ในทางกลับกันหากสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเข้มเป็นสีชมพู ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย คือ ค่า MIC

2.4.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (minimal bactericidal concatenation, MBC) ในการวิจัยนี้ดำเนินการตามมาตรฐาน NCCLS [13] ซึ่งสามารถดำเนินการต่อเนื่องจากการหาค่า MIC ซึ่งการวิจัยนี้ใช้วิธี drop plate โดยนำสารละลายในหลุมที่ให้ผลว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากการหาค่า MIC จากข้อ 2.4.3 หยดลงบนจานอาหาร MHA โดยแต่ละจุดใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหาร MHA 10-15 นาที แล้วนำเข้าตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียชนิดใด และ/หรือ ที่ความเข้มข้นใดสามารถฆ่าแบคทีเรียได้ก็จะแสดงผลเป็นลบ คือ ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียปรากฏบนจานอาหารทดสอบ ทั้งนี้ ความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย คือ ค่า MBC

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

งานวิจัยนี้เลือกใช้ไซยาโนแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ในสกุล *Anabaena* และ *Nostoc* เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเนื่องจากก่อนหน้านี้มีการ

รายงานว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล นี้สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ [17] ทั้งนี้เนื่องจากไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจึงไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจน เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเป็นเซลล์แห้ง ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียมีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารที่สกัดได้ [16] งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลายสกัดที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ เมทานอล เอทิลอะซิเตท โทลูอีน เฮกเซน และน้ำ ดังนั้นจึงมีสารสกัดทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากไซยาโนแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งหมด 5 ชนิด

วิธีการสกัดที่ใช้เป็นวิธีการที่ดัดแปลงจาก Khairy และ El-Kassas (2010) โดยใช้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียแห้ง 100 มิลลิกรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แล้วระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นจึงละลายสารสกัดที่ได้ในสารละลายดีเอ็มเอสโอความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยการรายงานความเข้มข้นของสารสกัดในงานวิจัยนี้จะรายงานในรูปปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการสกัดต่อปริมาตรของสารสกัด ดังนั้น สารสกัดเริ่มต้นที่สกัดได้จึงมีความเข้มข้น 33.33 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร

3.1 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียในเบื้องต้นด้วยวิธี disk diffusion

ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียในเบื้องต้นด้วยวิธี disk diffusion แสดงดังตารางที่ 1 โดยจากตัวอย่างสารสกัดทั้งหมด 30 ตัวอย่าง มีเพียง 10 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย คือ สารสกัดจาก *A. siamensis* TISTR 8012, *A. siamensis* C5-BG001, *Nostoc* sp. A₂-BG003, *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 และ *Nostoc* sp. A₁-BG005 ที่สกัดด้วยเมทานอลและ

เอทิลอะซิเตท โดยมีเพียงไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. C₈A₂-BG002 สายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้เลย และพบว่าจากแบคทีเรียทดสอบทั้ง 9 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ โดยสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *E. aerogenes* TISTR 1540, *E. coli* TISTR 780, *P. aeruginosa* TISTR 781, *B. subtilis* TISTR 008 และ *S. aureus* TISTR 885 โดยแบคทีเรียทดสอบอีก 4 สายพันธุ์ คือ *K. pneumonia* TISTR 1383, *P. mirabilis* TISTR 100 *E. faecalis* TISTR 888, *M. luteus* TISTR 884 ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยนี้

เมื่อพิจารณาผลของสายพันธุ์ของไซยาโนแบคทีเรียต่อกลุ่มของแบคทีเรียทดสอบ พบว่าสารสกัดจาก *A. siamensis* TISTR 8012 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น ในขณะที่สารสกัดจาก *A. siamensis* C5-BG001, *Nostoc* sp. A₂-BG003, *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 และ *Nostoc* sp. A₁-BG005 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ อย่างไรก็ตาม โดยภาพรวมแล้วสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่ศึกษาในการวิจัยนี้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารออกฤทธิ์และกลไกในการออกฤทธิ์จำเป็นที่จะต้องอาศัยการแยกให้ได้สารที่เป็นองค์ประกอบจากสารสกัดหยาบและนำสารที่ได้มาทดสอบต่อไป

สำหรับอิทธิพลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด พบว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสามารถสกัดได้ดีเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีค่าดัชนีความมีขั้ว (polarity index, P) ปานกลาง เช่น เมทานอล (P = 5.1) และ เอทิลอะซิเตท (P = 4.4) ในขณะที่การใช้ตัวทำละลายที่มีค่าดัชนีความมีขั้วสูงมาก เช่น น้ำ (P = 10.2) และ/หรือ ตัวทำละลายที่มีค่าดัชนีความมีขั้วต่ำมาก เช่น

ตารางที่ 1 การออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดจากไชยาโนแบคทีเรียเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion

สายพันธุ์ ไชยาโนแบคทีเรีย	ตัวทำละลาย ที่ใช้สกัด*	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) **				
		ชนิดของแบคทีเรียทดสอบ***				
		<i>E. aerogenes</i> TISTR 1540	<i>E. coli</i> TISTR 780	<i>P. aeruginosa</i> TISTR 781	<i>B. subtilis</i> TISTR 008	<i>S. aureus</i> TISTR 885
<i>A. siamensis</i> TISTR 8012	เมทานอล	n	10.1 ± 0.6	n	n	n
	เอทิลอะซิเตท	n	9.8 ± 0.6	8.0 ± 0.0	n	n
<i>A. siamensis</i> C5-BG001	เมทานอล	13.3 ± 0.5	n	n	10.0 ± 0.0	7.6 ± 0.6
	เอทิลอะซิเตท	7.1 ± 0.6	n	n	10.0 ± 0.0	8.3 ± 0.5
<i>Nostoc</i> sp. C ₈ A ₂ -BG002	เมทานอล	n	n	n	n	n
	เอทิลอะซิเตท	n	n	n	n	n
<i>Nostoc</i> sp. A ₂ -BG003	เมทานอล	n	10.6 ± 0.6	n	n	n
	เอทิลอะซิเตท	n	9.5 ± 0.5	n	n	10.0 ± 0.0
<i>Nostoc</i> sp. A ₃ A ₁ -BG004	เมทานอล	10.1 ± 0.3	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	n	n
	เอทิลอะซิเตท	9.8 ± 0.3	9.5 ± 0.5	10.1 ± 0.3	10.1 ± 0.3	n
<i>Nostoc</i> sp. A ₁ -BG005	เมทานอล	10.0 ± 0.0	10.1 ± 0.3	9.6 ± 0.6	10.8 ± 0.5	n
	เอทิลอะซิเตท	11.1 ± 0.3	10.8 ± 0.3	n	n	n

*นำเสนอข้อมูลเฉพาะตัวทำละลายที่ได้สารสกัดที่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย คือ เมทานอล และเอทิลอะซิเตท สำหรับข้อมูลของสารสกัดที่ได้จากการใช้ตัวทำละลายโทลูอีน เฮกเซน และน้ำ ไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย

**เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เป็นค่าที่รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นทดสอบ โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± SD และ n คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 0.6 มิลลิเมตร (ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย)

***นำเสนอข้อมูลเฉพาะแบคทีเรียทดสอบที่ถูกยับยั้งได้โดยสารสกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย คือ *E. aerogenes* TISTR 1540, *E. coli* TISTR 780, *P. aeruginosa* TISTR 781, *B. subtilis* TISTR 008 และ *S. aureus* TISTR 885 สำหรับแบคทีเรียทดสอบ *K. pneumonia* TISTR 1383, *P. mirabilis* TISTR 100 *E. faecalis* TISTR 888 และ *M. luteus* TISTR 884 ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย

เฮกเซน (P = 0.1) และโทลูอีน (P = 2.4) ไม่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์จากไชยาโนแบคทีเรียได้ ซึ่งแสดงว่าสารที่มีสมบัติยับยั้งแบคทีเรียทดสอบจากไชยาโนแบคทีเรียเป็นสารที่มีสภาพขั้วปานกลางที่สามารถถูกสกัดได้ดีโดยเมทานอลและเอทิลอะซิเตท โดยเมื่อพิจารณาถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง พบว่า

เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมากกว่าเอทิลอะซิเตท นอกจากนี้เมทานอลยังเป็นตัวทำละลายที่ระเหยได้ง่าย ทำให้ง่ายต่อการแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัด อีกทั้งยังสามารถลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในระหว่างการสกัดเนื่องจากเมทานอลมีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์

ทั้งนี้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งการสกัดสารจากสมุนไพร ซึ่งสารที่สกัดโดยใช้เมทานอลเป็นสารที่มีขั้วปานกลางจึงสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าสารที่สกัดได้โดยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ

พบว่าสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* C5-BG001 ที่สกัดด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. aerogenes* TISTR 1540 ได้ดีที่สุดโดยให้เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13.3 ± 0.5 มิลลิเมตร สำหรับแบคทีเรียทดสอบ *E. coli* TISTR 780 ถูกยับยั้งได้โดยสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012, *Nostoc* sp. A₂-BG003, *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 และ *Nostoc* sp. A₁-BG005 ที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตท โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมีค่าในช่วง 9.5 ± 0.5 ถึง 10.8 ± 0.3 มิลลิเมตร ส่วนแบคทีเรียทดสอบ *P. aeruginosa* TISTR 781 ถูกยับยั้งได้โดยสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* TISTR 8012 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 ที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตท และ *Nostoc* sp. A₁-BG005 ที่สกัดด้วยเมทานอล โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งมีค่าในช่วง 8.0 ± 0.0 ถึง 10.1 ± 0.3 มิลลิเมตร

กรณีแบคทีเรียทดสอบแกรมบวก สารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *A. siamensis* C5-BG001 ที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งทั้ง *B. subtilis* TISTR 008 และ *S. aureus* TISTR 885 ในขณะที่สารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. A₂-BG003 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งได้เฉพาะ *S. aureus* TISTR 885 และสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และ *Nostoc* sp. A₁-BG005 ที่

สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งได้เฉพาะ *B. subtilis* TISTR 008

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียทดสอบต่อสารปฏิชีวนะ (ตัวควบคุมเชิงบวก) ได้แก่ ampicillin, ciprofloxacin, sulfanilamide และ chloramphenicol ด้วยวิธี disk diffusion ได้ผลการวิจัยที่มีค่าอยู่ในช่วงของค่ามาตรฐานตามวิธีการทดสอบของ NCCLS (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และเมื่อพิจารณาถึงผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียทดสอบต่อตัวควบคุมเชิงลบ ได้แก่ น้ำกลั่น สารละลายดีเอ็มเอสโอความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดไซยาโนแบคทีเรียที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าตัวควบคุมเชิงลบทั้งหมดไม่มีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดกับสารปฏิชีวนะ พบว่าสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 30 ตัวอย่าง มีการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียต่ำกว่าเมื่อเทียบกับยามาตรฐาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้น้อย และ/หรือ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดยังไม่เหมาะสมต่อการสกัดสารออกฤทธิ์ที่ยับยั้งแบคทีเรียจากไซยาโนแบคทีเรีย นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดที่ได้มีความเข้มข้นต่ำจึงออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยตามไปด้วย

3.2 ผลการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี broth dilution

ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี disk diffusion (ตอนที่ 3.1) เป็นการทดสอบเบื้องต้นว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียหรือไม่ ซึ่งการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) จะสามารถรายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ ซึ่งการวิจัยในขั้นตอนนี้ได้เลือกศึกษา

เฉพาะสารสกัดที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion เท่านั้น โดยจากผลการวิจัยในตอนต้นที่ 3.1 มีสารสกัดที่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรีย *E. aerogenes* TISTR 1540 จำนวน 6 ตัวอย่าง สารสกัดที่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* TISTR 780 จำนวน 8 ตัวอย่าง สารสกัดที่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรีย *P. aeruginosa* TISTR 781 จำนวน 4 ตัวอย่าง สารสกัดที่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR 008 จำนวน 4 ตัวอย่าง และสารสกัดที่ให้ผลยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* TISTR 885 จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดที่ใช้ คือ 33.33 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2 พบว่า *E. aerogenes* TISTR 1540 ถูกยับยั้งได้มากที่สุดโดยสารสกัดจาก *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 ที่สกัดโดยเมทานอลและเอทิลอะซิเตท โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 2.08 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบการยับยั้ง *E. coli* TISTR 780 พบว่าถูกยับยั้งได้มากที่สุดโดยสารสกัดจาก *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 ที่สกัดโดยเมทานอล และ *Nostoc* sp. A₁-BG005 ที่สกัดโดยเอทิลอะซิเตท โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 4.17 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบการยับยั้ง *P. aeruginosa* TISTR 781 พบว่าสารสกัดจาก *A. siamensis* TISTR 8012 โดยเอทิลอะซิเตท สารสกัดจาก *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 ที่สกัดโดยเมทานอล และเอทิลอะซิเตท และสารสกัดจาก *Nostoc* sp. A₁-BG005 ที่สกัดโดยเมทานอล ให้ค่า MIC เท่ากัน คือ 4.17 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตรในกรณีสารสกัดจาก *A. siamensis* C5-BG001 ที่สกัดโดยเมทานอล และเอทิลอะซิเตท พบว่าสามารถยับยั้งได้ทั้ง *B. subtilis* TISTR 008 และ *S. aureus* TISTR 885 ในขณะที่สารสกัดจาก *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 โดยเอทิลอะซิเตท และสารสกัดจาก *Nostoc* sp. A₁-BG005 โดยเมทานอล สามารถยับยั้ง

ได้เฉพาะ *B. subtilis* TISTR 008 และสารสกัดจาก *Nostoc* sp. A₂-BG003 โดยเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *S. aureus* TISTR 885

3.3 ผลการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียด้วยวิธี drop plate method

ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี broth dilution (ตอนที่ 3.2) ทำให้ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) จากนั้นจึงนำสารละลายจากหลุมที่ตรวจพบการยับยั้งมาติดตามว่าเชื้อในหลุมที่เกิดการยับยั้งยังมีชีวิตอยู่หรือไม่โดยวิธี drop plate จากการวิจัยดังกล่าวทำให้ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (MBC) จากตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีค่า MBC เท่ากับค่าความเข้มข้นสูงที่สุดของสารสกัด คือ 16.67 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากไชยานแบคทีเรีย *A. siamensis* C5-BG001 ที่สกัดด้วย เมทานอลสามารถฆ่า *S. aureus* TISTR 885 ได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 8.33 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อมิลลิลิตรในขณะที่สารสกัดจากไชยานแบคทีเรียที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น สารสกัดจาก *Nostoc* sp. A₁-BG005 ที่สกัดด้วย เมทานอล พบว่าไม่สามารถฆ่าแบคทีเรียทดสอบ *E. aerogenes* TISTR 1540, *E. coli* TISTR 780 และ *B. subtilis* TISTR 008 ถึงแม้ว่าจะใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงที่สุดแล้วก็ตาม ทั้งนี้ เนื่องจากการฆ่าเชื้อแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่าการยับยั้งเชื้อ

4. สรุป

การศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดไชยานแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด พบว่าไชยานแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. siamensis* TISTR 8012, *A. siamensis*

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) และสามารถฆ่า (MBC) แบคทีเรียของสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย

ชนิดของ แบคทีเรียทดสอบ	สายพันธุ์ ไซยาโนแบคทีเรีย	ตัวทำละลาย สกัด*	ค่า MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่า MBC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
<i>E. aerogenes</i> TISTR 1540	<i>A. siamensis</i> C5-BG001	เมทานอล	4.17	16.67
		เอทิลอะซีเตท	4.17	16.67
	<i>Nostoc</i> sp. A ₃ A ₁ -BG004	เมทานอล	2.08	16.67
		เอทิลอะซีเตท	2.08	16.67
	<i>Nostoc</i> sp. A ₁ -BG005	เมทานอล	4.17	N
		เอทิลอะซีเตท	4.17	N
<i>E. coli</i> TISTR 780	<i>A. siamensis</i> TISTR 8012	เมทานอล	8.33	16.67
		เอทิลอะซีเตท	8.33	16.67
	<i>Nostoc</i> sp. A ₂ -BG003	เมทานอล	8.33	16.67
		เอทิลอะซีเตท	8.33	16.67
	<i>Nostoc</i> sp. A ₃ A ₁ -BG004	เมทานอล	4.17	N
		เอทิลอะซีเตท	8.33	N
	<i>Nostoc</i> sp. A ₁ -BG005	เมทานอล	8.33	N
		เอทิลอะซีเตท	4.17	16.67
<i>P. aeruginosa</i> TISTR 781	<i>A. siamensis</i> TISTR 8012	เอทิลอะซีเตท	4.17	16.67
	<i>Nostoc</i> sp. A ₃ A ₁ -BG004	เมทานอล	4.17	N
		เอทิลอะซีเตท	4.17	N
	<i>Nostoc</i> sp. A ₁ -BG005	เมทานอล	4.17	16.67
<i>B. subtilis</i> TISTR 008	<i>A. siamensis</i> C5-BG001	เมทานอล	4.17	16.67
		เอทิลอะซีเตท	8.33	16.67
	<i>Nostoc</i> sp. A ₃ A ₁ -BG004	เอทิลอะซีเตท	8.33	N
	<i>Nostoc</i> sp. A ₁ -BG005	เมทานอล	8.33	N
<i>S. aureus</i> TISTR 885	<i>A. siamensis</i> C5-BG001	เมทานอล	8.33	8.33
		เอทิลอะซีเตท	8.33	16.67
	<i>Nostoc</i> sp. A ₂ -BG003	เอทิลอะซีเตท	8.33	16.67

N หมายถึง ตรวจพบการเจริญของแบคทีเรียเมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุด

C5-BG001, *Nostoc* sp. A₂-BG003, *Nostoc* sp. A₃A₁-BG004 และ *Nostoc* sp. A₁-BG005 สามารถผลิตสารที่ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ โดยเมทานอลและเอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารยับยั้งแบคทีเรียจากไซยาโนแบคทีเรียได้ ซึ่งสารสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่คัดกรองได้ในการวิจัยนี้ มีทั้งที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ และที่ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรีย แกรมลบ อย่างไรก็ตาม สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้ยังมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบต่ำกว่าสารปฏิชีวนะมาตรฐาน

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับการอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือทางจุลชีววิทยา และขอบคุณหน่วยวิจัยสาหร่ายและแพลงก์ตอน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับสายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K. and Eurwilaichitr L., 2004, Diversity and abundance of *Bacteria* and *Archaea* in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand, *J. Basic Microbiol.* 44: 430-444.

[2] El-Sheekh, M.M., Dawah A.M., El-Rahman A.M.A., El-Adel, H.M. and El-Hay R.A.A., 2008, Antimicrobial activity of the cyanobacteria *Anabaena wisconsinense* and *Oscillatoria curviceps* against

pathogens of fish in aquaculture, *Ann. Microbiol.* 58: 527-534.

- [3] Patil, L.S., Kulkarni, M.V. and Puranik, P.R., 2009, Assessment of antibacterial potential of some indigenously isolated cyanobacterial species, *J. Pharm. Res.* 2: 1116-1119.
- [4] Abedin, R.M.A. and Taha, H.M., 2008, Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. evaluation of medium components by Plackett- Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*, *Global J. Microbiol. Biochem.* 3: 22-31.
- [5] Patterson, G.M.L., Baker, K.K., Baldwin, C.L., Bolis, C.M., Caplan, F.R., Larsen, L.K., Levine, I.A., Moore, R.E., Nelson, C.S., Tschappat, K.D., Tuang, G.D., Boyd, M.R., Cardellina, J.H., Collins, R.P., Gustafson, K.R., Snader, K.M., Weislow, O.S. and Lewin, R.A., 1993, Antiviral activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta), *J. Phycol.* 29: 125-130.
- [6] Liao, W.R., Lin, J.Y., Shieh, W.Y., Jeng, W.L. and Hang, R., 2003, Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 433-439.
- [7] Pedersen, M. and Dasilva, E.J., 1973, Simple brominated phenols in the blue-green alga *Calothrix brevissima*. *West, Planta* 115: 83-96.