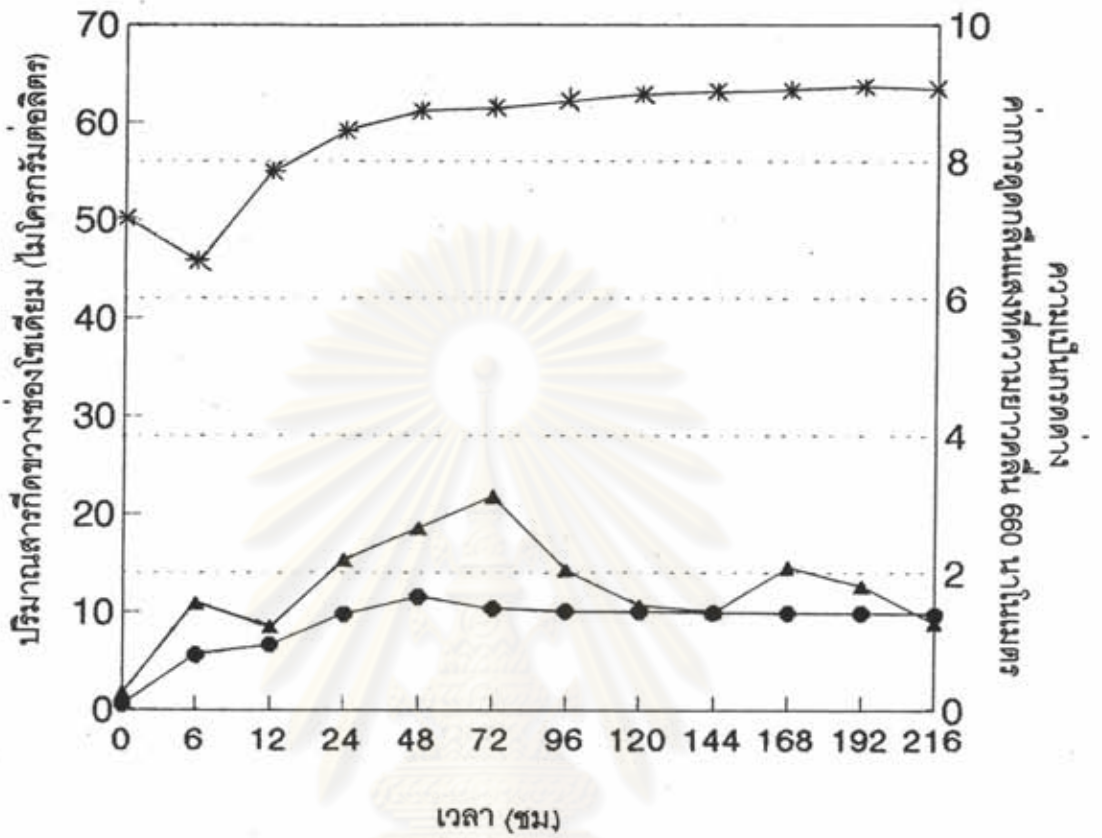
บทที่ 3

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1ที่ช่วงเวลาต่างๆ โดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อ

จากการทดสอบการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ช่วงเวลาต่างๆ โดยทำการเพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว L - medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) พบว่า เชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่ 48 ชม. และแบคทีเรียจะสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ปริมาณสูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม. โดยจะพบปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม 21.74 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 1ลิตร และเมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงผลในรูปที่ 7 และตารางที่ 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 การเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว L - medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชม.

- ● ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
- ▲ ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (ไมโครกรัมต่อลิตร)
- ✳ ค่าความเป็นกรดด่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลว L- medium

เวลา (ชม)	[1]การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)	[2]ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg) ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร
0	0.079	7.17	1.81
6	0.795	6.54	10.87
12	0.947	7.85	8.51
24	1.388	8.44	15.25
48	1.640	8.73	18.51
72	1.468	8.77	21.74
96	1.429	8.88	14.24
120	1.434	8.97	10.61
144	1.411	9.02	10.01
168	1.414	9.04	14.49
192	1.407	9.09	12.59
216	1.391	9.16	8.87

หมายเหตุ [1]การเจริญของเซลล์ โดยนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

[2]ค่าที่ได้จากการคำนวนระหว่างน้ำหนักแห้งของสารสกัดกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro 2A ที่ยังมีชีวิตกับปริมาณสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) เมื่อใช้สารเทโทรโดทอกซินเป็นตัวแทนของสารกีดขวางช่องโซเดียม

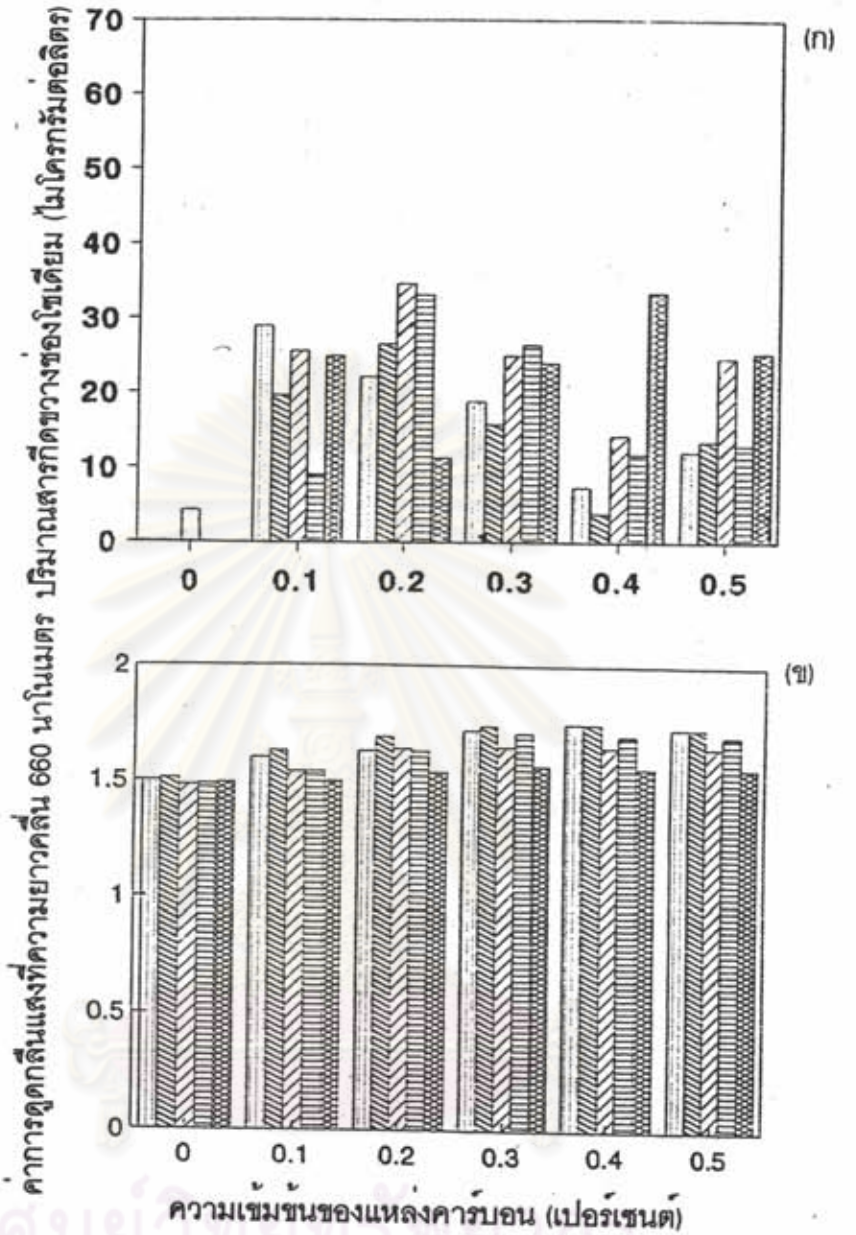
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1

ในการทดลองนี้ต้องการทดสอบว่า *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นนอกเหนือจากกลูโคสในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้หรือไม่

จากการผันแปรปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับกลูโคส พบว่า *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ดีที่สุดเมื่อมีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงสุดเท่ากับ 34.57 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่วนการเจริญสูงที่ 72 ชั่วโมงจะพบว่า เชื้อจะเจริญได้ใกล้เคียงกัน ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 8 และตารางที่ 4 และ 5 และเมื่อวัดความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างจะใกล้เคียงกันโดยจะอยู่ในช่วง 9.05-9.60 ดังแสดงในตารางที่ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในภาคผนวก ก ข้อ 1 โดยแปรผันชนิดปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลีเซอรอล ซูโครส กลูโคส สารละลายแป้งฟรุกโตส ความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม.

กลีเซอรอล
ซูโครส
กลูโคส
สารละลายแป้ง
ฟรุกโตส
ค่าเฉลี่ยปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ

ตารางที่ 4 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)				
	กลีเซอรอล	ซูโครส	กลูโคส	สารละลายแป้ง	ฟรุกโตส
0	4.01	5.00	4.28	4.57	4.89
0.1	28.93	19.64	25.56	8.98	24.87
0.2	22.06	26.46	34.57	33.04	11.21
0.3	18.79	15.71	24.91	26.41	23.94
0.4	7.37	3.91	14.22	11.79	33.40
0.5	12.12	13.47	24.63	12.95	25.32

ตารางที่ 5 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)				
	กลีเซอรอล	ซูโครส	กลูโคส	สารละลายแป้ง	ฟรุกโตส
0	1.51	1.51	1.48	1.49	1.49
0.1	1.60	1.63	1.54	1.54	1.50
0.2	1.63	1.69	1.64	1.63	1.54
0.3	1.72	1.74	1.65	1.71	1.57
0.4	1.75	1.75	1.65	1.70	1.56
0.5	1.73	1.73	1.65	1.70	1.56

ตารางที่ 6 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	ค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5)				
	กลูโคส	ฟรุกโตส	ซูโครส	กลีเซอรอล	สารละลายแป้ง
0	9.13	9.28	9.24	9.22	9.53
0.1	9.09	9.26	9.32	9.25	9.60
0.2	9.12	9.13	9.22	9.25	9.50
0.3	9.07	9.05	9.37	9.17	9.50
0.4	9.05	9.19	9.29	9.22	9.56
0.5	9.06	9.18	9.36	9.21	9.45

ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม โดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1

ในการทดลองที่ผ่านมาแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 คือ โพลีเปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ งานวิจัยนี้จะหาแหล่งไนโตรเจนอื่นที่ยังคงให้การเจริญและเพิ่มปริมาณการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ให้สูงขึ้น

1. ผลการแปรความเข้มข้นโพลีเปปโตนโดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์

จากการแปรความเข้มข้นโพลีเปปโตนตั้งแต่ 0-0.5 เปอร์เซนต์ในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ พบว่า *Vibrio* sp.

สายพันธุ์ St-1-1 สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมและเจริญได้ปริมาณต่ำ ดังแสดงผลในรูปที่ 9 และตารางที่ 7และ8 และเมื่อตรวจหาค่าความเป็นกรดด่างพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 8.26-8.97 ดังแสดงผลในตารางที่ 9

2. ผลของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) ต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม

จากการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์สาร ลงไปในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน และมีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเสริม โดยแปรความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนตั้งแต่ 0-0.5 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบกับการใช้โพลีเปปโตน ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 10 และตารางที่ 7 และ8 พบว่าโพลีเปปโตนใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด โดยเชื้อเจริญได้ดี และสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงสุดเท่ากับ 25.16 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อใช้โพลีเปปโตน 0.1 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่ใช้ไฟโตนเปปโตน โปรติ-โอสเปปโตน หมายเลข 3 เปปโตน แต่ละชนิดในปริมาณ 0.1-0.3 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เจริญได้ใกล้เคียงกันและสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้แต่น้อยกว่าเมื่อใช้โพลีเปปโตน และเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อจะสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม และเจริญได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ นอกจากนั้นยังพบว่า ถ้าให้แหล่งไนโตรเจนดังกล่าวในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างขึ้นลดลงหรือไม่มีการสร้างขึ้นมาเลย และเมื่อวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันโดยจะอยู่ในช่วง 8.26-9.12 ดังแสดงในตารางที่ 9

3. ผลของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen) ต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม

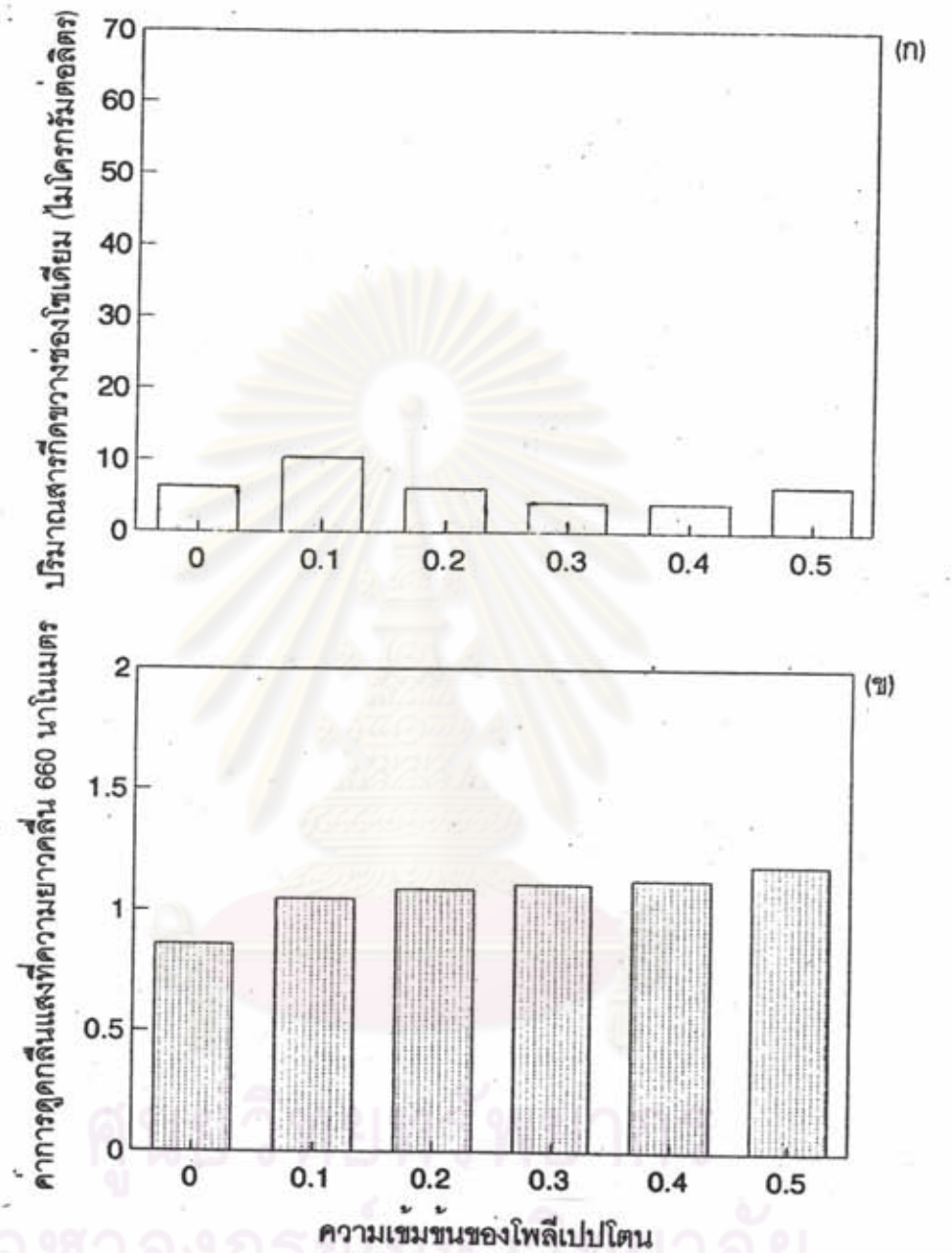
จากการแปรแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ เติมลงในสูตรอาหารเพื่อทดแทนโพลีเปปโตน ดังแสดงผลในรูปที่ 11 และตารางที่ 10 และ 11 พบว่า *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เจริญได้ดีใกล้เคียงกันเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนและเชื้อสามารถใช้สารนี้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อ

สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ โดยการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ จะให้ผลดีที่สุดและได้ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม 12.18 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่เกิดขึ้นก็ยังไม่สูงเท่ากับการใช้โพลีเปปโตน 0.1 เปอร์-เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และพบว่าเชื้อเจริญได้ใกล้เคียงกันเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่างๆ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันโดยอยู่ในช่วง 8.34-8.92 ดังแสดงในตารางที่ 12

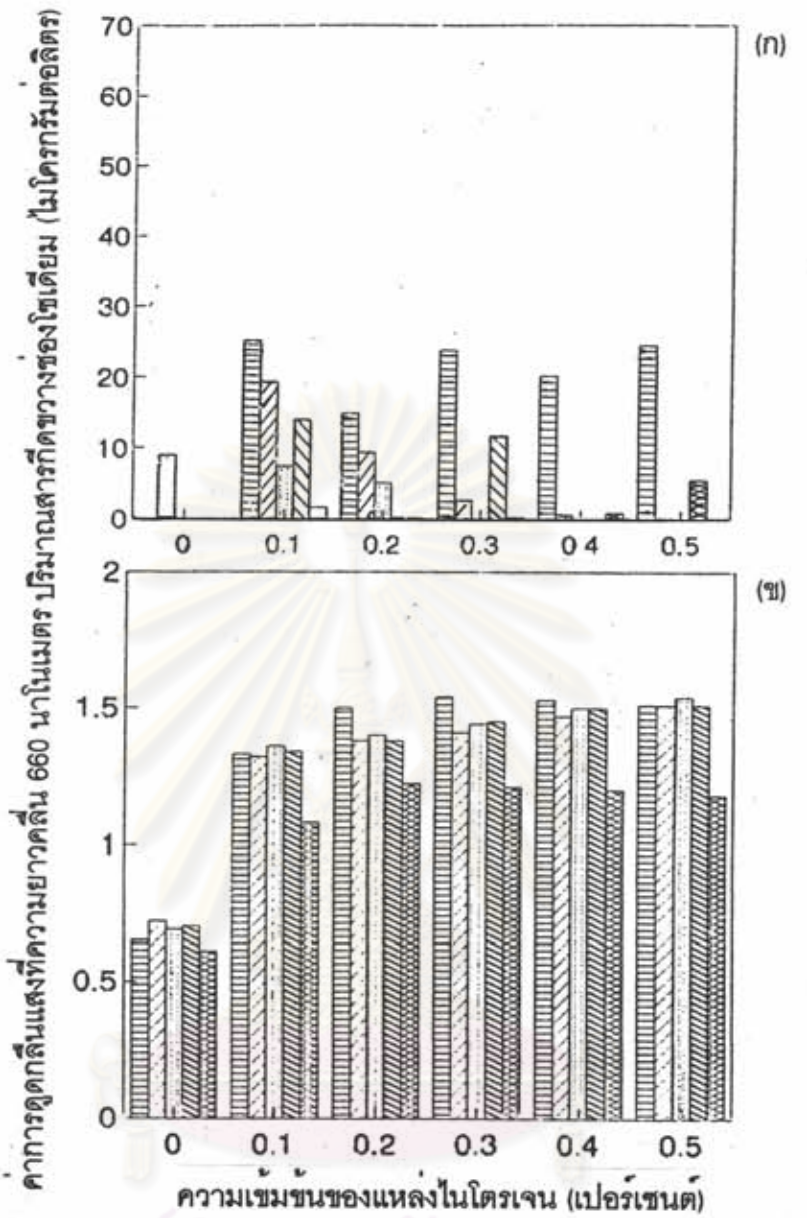
ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะทดลองในขั้นต่อไป เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณเกลือแร่ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 จึงประกอบด้วย

กลูโคส	0.2	เปอร์เซนต์
โพลีเปปโตน	0.1	เปอร์เซนต์
สารสกัดจากยีสต์	0.5	เปอร์เซนต์
โซเดียมคลอไรด์	1.8	เปอร์เซนต์
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.25	เปอร์เซนต์
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	เปอร์เซนต์
ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ	7.5	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันปริมาณโพลีเปปโตนความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ St-1-1 ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่นและภาวะการเลี้ยงดังกล่าวไว้ภายใต้รูปที่ 8



รูปที่ 10 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันชนิดและปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ โพลีเปปโตน ไฟโตนเปปโตน โปรติโอสเปปโตน หมายเลข 3 เปปโตน และยูเรีย ความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

โพลีเปปโตน
ไฟโตนเปปโตน
โปรติโอสเปปโตน หมายเลข 3
เปปโตน
ยูเรีย
ค่าเฉลี่ยปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ

ตารางที่ 7 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจน ชนิดอินทรีย์สาร ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)					
	โพลีเปปโตนไม่เติมสารสกัดจากยีสต์	โพลีเปปโตน	โปรติโอสเปปโตนหมายเลข 3	ไฟโตนเปปโตน	เปปโตน	ยูเรีย
0	6.26	5.01	4.56	5.26	5.11	4.34
0.1	10.26	25.16	7.42	19.41	14.06	1.64
0.2	6.03	14.97	5.11	9.42	0.27	0.23
0.3	4.15	23.86	0	2.75	11.80	0.32
0.4	4.09	20.25	0	0.65	0.07	0.89
0.5	6.50	24.54	0	0.17	5.64	0.09

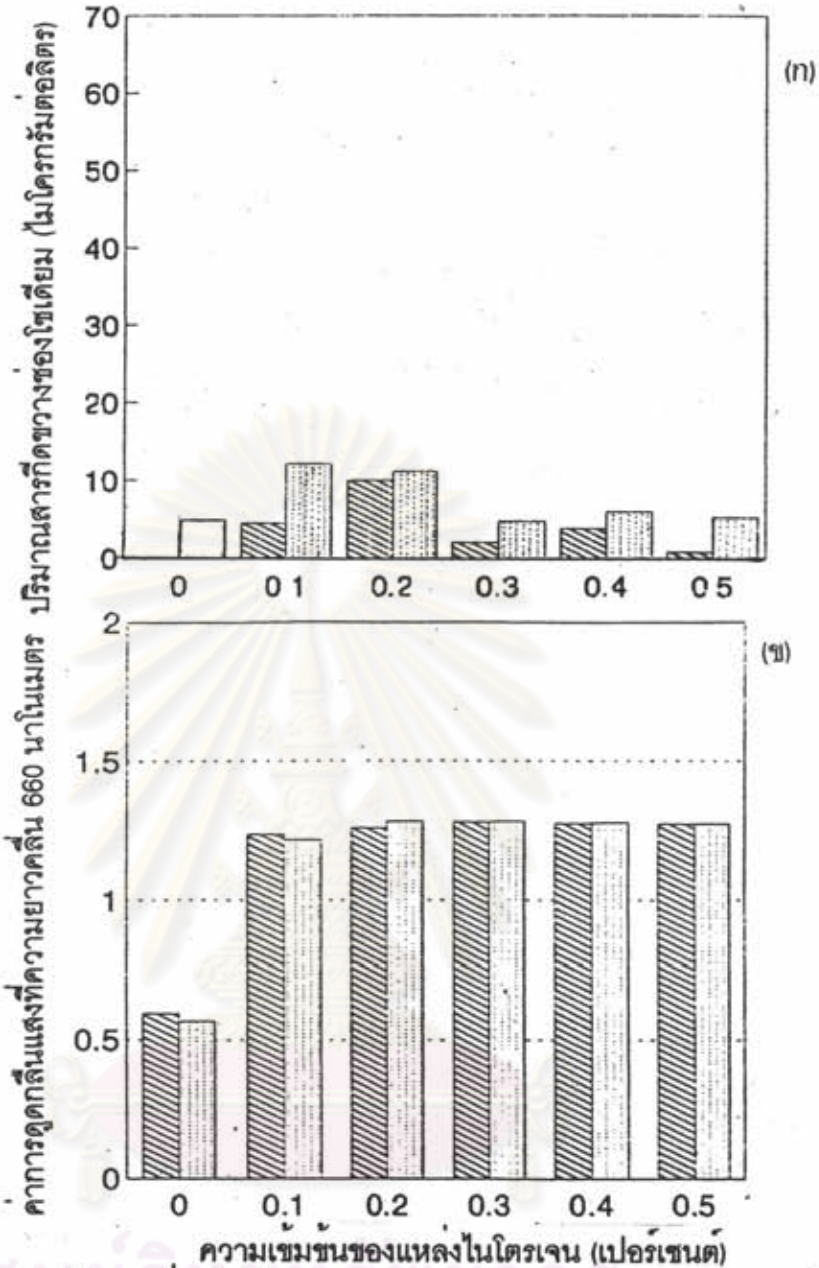
ตารางที่ 8 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์สาร ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)					
	โพลีเปปโตนไม่เติมสารสกัดจากยีสต์	โพลีเปปโตน	โปรติโอสเปปโตนหมายเลข 3	ไฟโตนเปปโตน	เปปโตน	ยูเรีย
0	0.86	0.65	0.69	0.72	0.70	0.51
0.1	1.05	1.33	1.36	1.32	1.34	1.08
0.2	1.09	1.50	1.40	1.38	1.38	1.22
0.3	1.11	1.54	1.44	1.41	1.45	1.21
0.4	1.13	1.53	1.50	1.47	1.50	1.20
0.5	1.19	1.54	1.54	1.51	1.51	1.18

ตารางที่ 9 ค่าความเป็นกรดด่าง(pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์สาร ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	ค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5)					
	โพลีเปปโตนที่ไม่เติมสาร สกัดจากยีสต์	ไฟโตน เปปโตน	โปรติโอส เปปโตน หมายเลข 3	เปปโตน	โพลีเปปโตน	ยูเรีย
0	8.26	8.81	8.50	8.58	8.49	8.92
0.1	8.97	8.69	8.41	8.89	8.58	8.60
0.2	8.79	8.73	8.71	9.02	8.57	8.62
0.3	8.77	8.99	8.72	9.07	8.76	8.82
0.4	8.77	8.90	8.75	9.07	8.79	8.42
0.5	8.82	8.93	8.78	9.12	8.78	8.94

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ Vibrio sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอนโดยแปรผันชนิดและปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยไม่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ ปรับความเป็นกรดด่างที่ 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

▯ แอมโมเนียมซัลเฟต

▨ แอมโมเนียคลอไรด์

□ ค่าเฉลี่ยปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ

ตารางที่ 10 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์สาร ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)	
	แอมโมเนียมซัลเฟต	แอมโมเนียมคลอไรด์
0	4.98	5.12
0.1	4.51	12.11
0.2	10.03	11.18
0.3	2.07	4.79
0.4	3.87	6.02
0.5	0.81	5.30

ตารางที่ 11 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์สาร ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)	
	แอมโมเนียมซัลเฟต	แอมโมเนียมคลอไรด์
0	0.59	0.57
0.1	1.24	1.22
0.2	1.26	1.28
0.3	1.28	1.28
0.4	1.28	1.28
0.5	1.27	1.27

ตารางที่ 12 ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์สารชนิดต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	ค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5)	
	แอมโมเนียมซัลเฟต	แอมโมเนียมคลอไรด์
0	8.61	8.39
0.1	8.67	8.82
0.2	8.63	8.86
0.3	8.48	8.75
0.4	8.40	8.68
0.5	8.59	8.58

ผลของเกลือแร่ต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1

เกลือแร่ต่างๆ มีความจำเป็นในการเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมดังนั้นจึงได้ทำการทดลองศึกษาผลของเกลือแร่ต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 โดยแปรผันชนิดและปริมาณของเกลือแร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงผลการทดลองต่อไปนี้

1. ผลการเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้มีการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงที่สุดเท่ากับ 34.74 ไมโครกรัมต่อลิตร ในขณะที่ไม่เติมสารนี้เลยเชื้อจะไม่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม และเจริญได้น้อยกว่าเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 12และตารางที่ 13 และ 14

2. ผลการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่าการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้มีการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงที่สุดเท่ากับ 11.85 ไมโครกรัมต่อลิตร ในขณะที่เติมสารนี้ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.3 เปอร์เซนต์ จะมีผลทำให้การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมลดลง และพบว่าเชื้อจะมีการเจริญได้ใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 13และ ตารางที่ 15 และ 16

3. ผลการเติมไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่าการเติมไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้มีการสร้างสารกีดขวางช่องสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงที่สุดเท่ากับ 20.34 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่ถ้าเติมสารนี้โดยใช้ความเข้มข้นมากกว่า 0.1เปอร์เซนต์ จะมีผลทำให้การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมลดลง และพบว่าเชื้อจะเจริญได้ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 14 และตารางที่ 17 และ 18

4. ผลการเติมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 . 2H_2O$) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

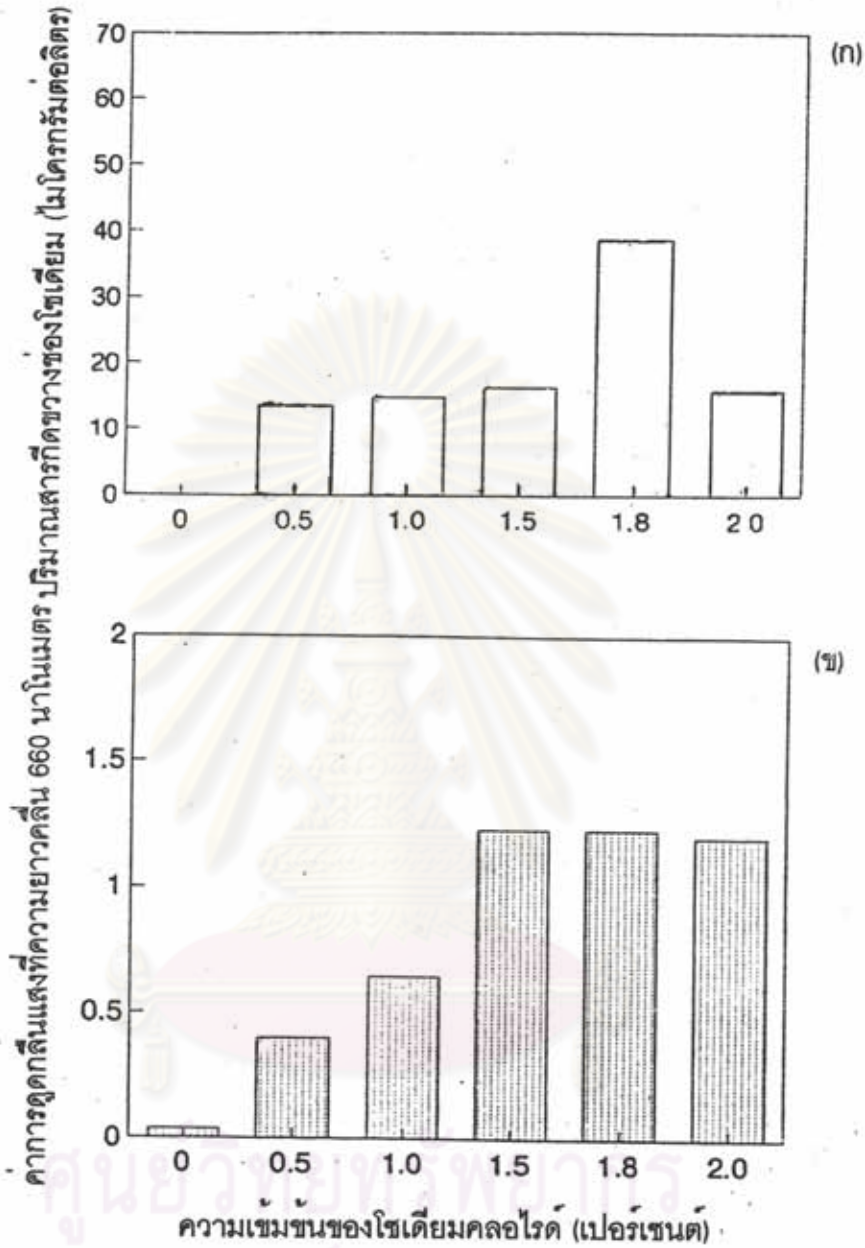
พบว่าการเติมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้มีการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงสุดเท่ากับ 52.61 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเติมไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่เติมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นมากกว่า 0.1 เปอร์เซนต์ จะมีผลทำให้การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมลดลง และพบว่าเชื้อจะเจริญได้ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 15 และตารางที่ 19 และ 20

จากผลการทดลองข้างต้น และเมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะอยู่ในช่วง 7.62- 8.94 และพบว่า ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้เคียงกันซึ่งอยู่ในช่วง 8.58-8.87 ดังแสดงผลในตารางที่

21 และพบว่าองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เพื่อสร้างสารกีดขวางช่องมีองค์ประกอบดังนี้

กลูโคส	0.2 เปอร์เซนต์
โพลีเปปโตน	0.1 เปอร์เซนต์
สารสกัดจากยีสต์	0.5 เปอร์เซนต์
โซเดียมคลอไรด์	1.8 เปอร์เซนต์
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.05 เปอร์เซนต์
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.35 เปอร์เซนต์
ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ	7.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โพลีเปปโตน 0.1 เปอร์เซนต์และสารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจน แหล่งเกลือแร่ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 เปอร์เซนต์ และไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซนต์ แล้วแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-2.0 เปอร์เซนต์ ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

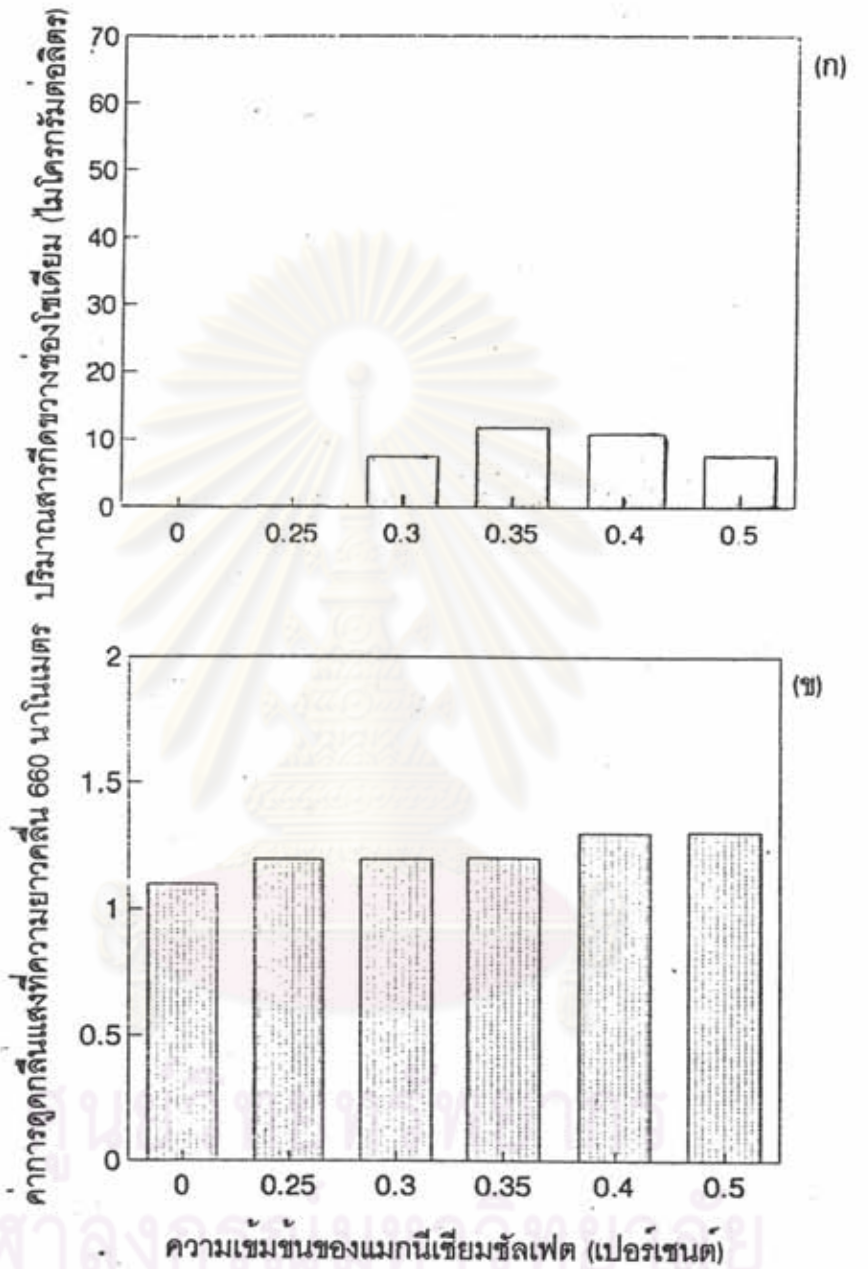
ตารางที่ 13 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (เปอร์เซนต์)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)
0	0.02
0.5	13.64
1.0	14.85
1.5	16.33
1.8	38.74
2.0	15.87

ตารางที่ 14 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (เปอร์เซนต์)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)
0	0.04
0.5	0.40
1.0	0.65
1.5	1.23
1.8	1.23
2.0	1.20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและภาวะในการเลี้ยงเช่นเดียวกับที่ระบุไว้ใต้รูปที่ 12 ยกเว้นใช้โซเดียมคลอไรด์ 1.8 เปอร์เซนต์ และแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0-0.4 เปอร์เซนต์

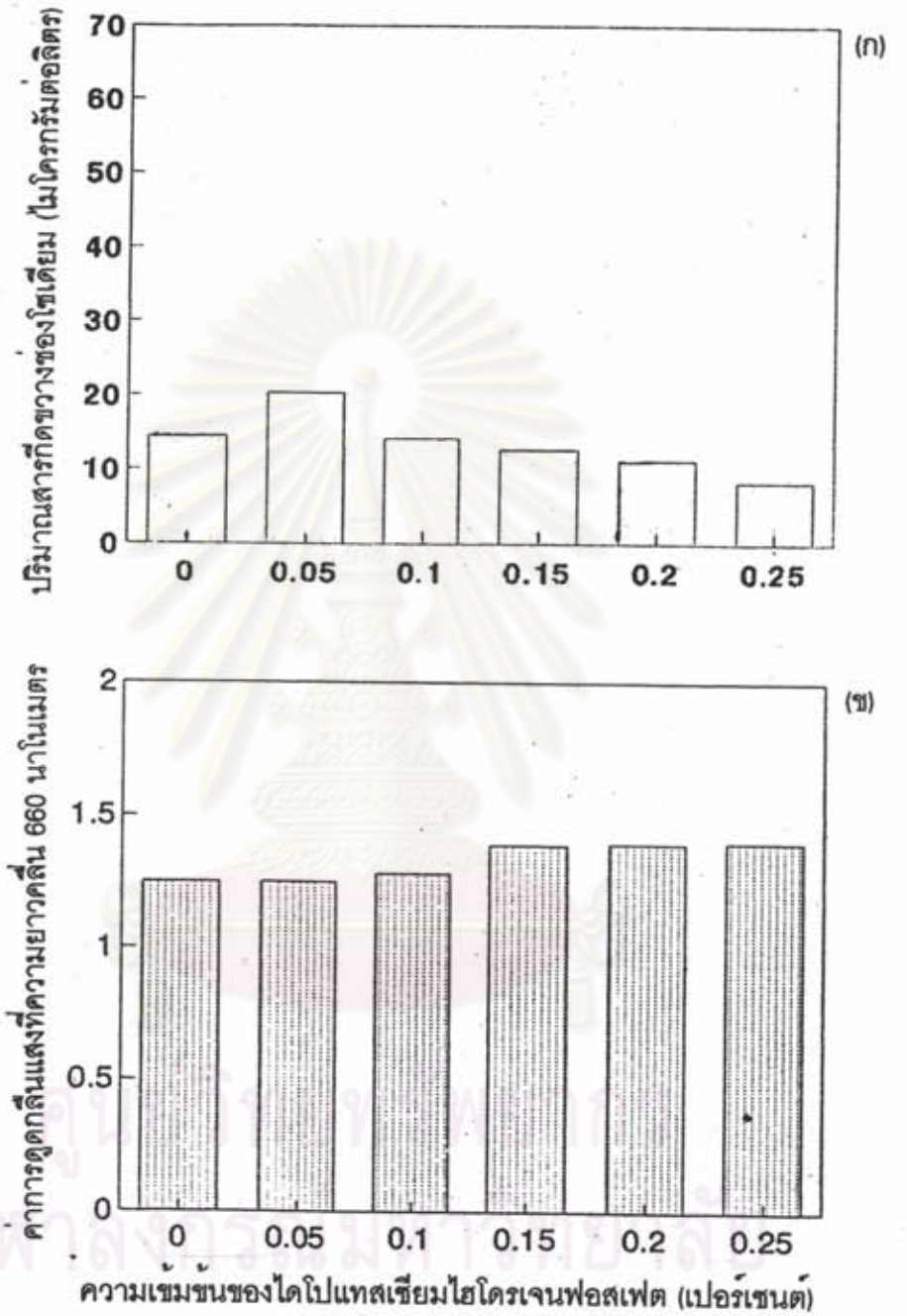
ตารางที่ 15 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต (เปอร์เซนต์)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)
0	0.19
0.25	0.26
0.3	7.47
0.35	11.85
0.4	10.85
0.5	7.65

ตารางที่ 16 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต (เปอร์เซนต์)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)
0	1.10
0.25	1.20
0.3	1.20
0.35	1.21
0.4	1.31
0.5	1.31

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 13 ยกเว้นใช้ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.35 เปอร์เซนต์ และแปรผันปริมาณไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0-0.25 เปอร์เซนต์

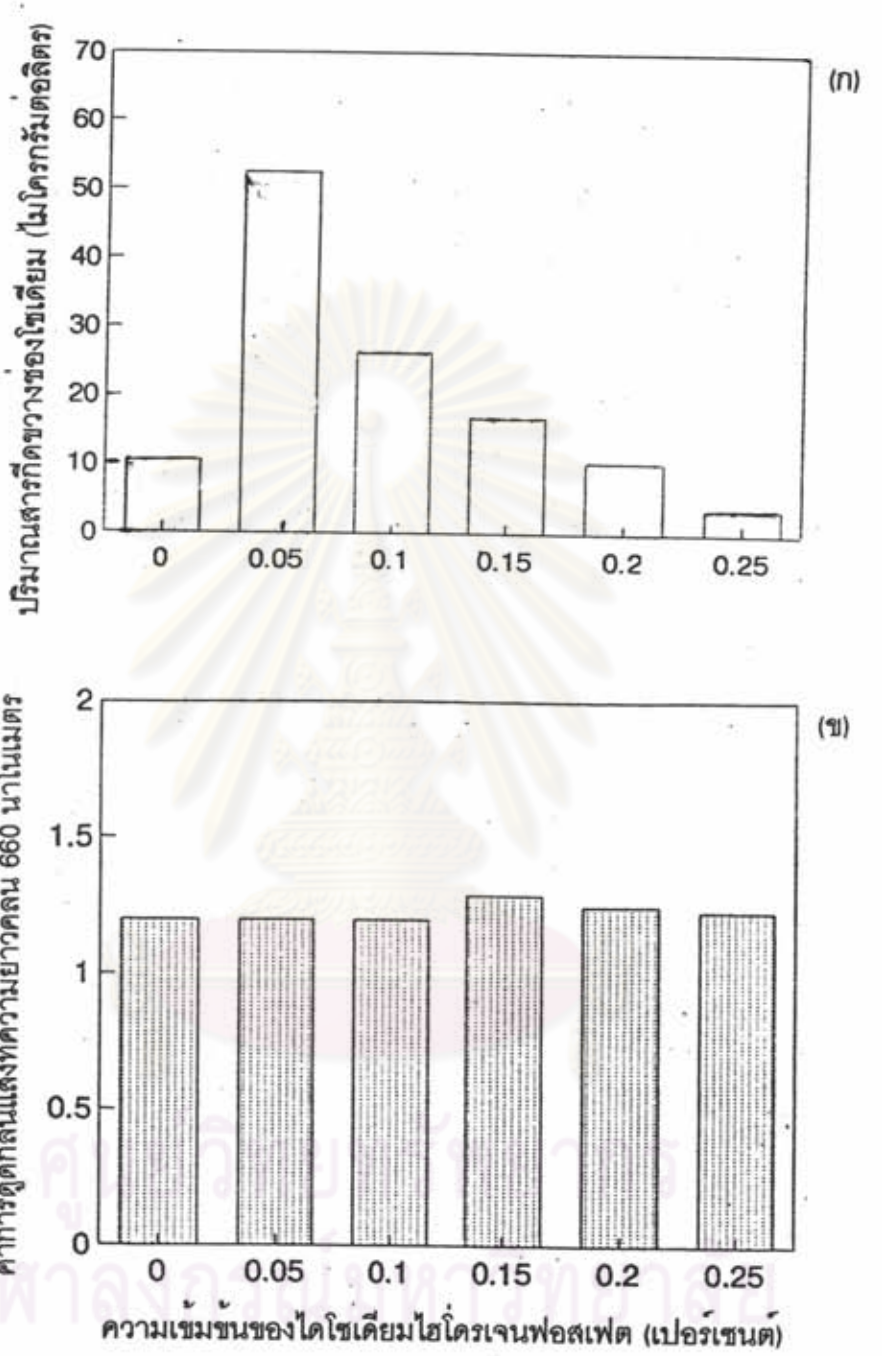
ตารางที่ 17 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (เปอร์เซนต์)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)
0	14.54
0.05	20.34
0.10	14.21
0.15	12.70
0.20	11.25
0.25	8.34

ตารางที่ 18 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (เปอร์เซนต์)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 660 นาโนเมตร)
0	1.25
0.05	1.25
0.10	1.28
0.15	1.39
0.20	1.40
0.25	1.40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและภาวะในการเลี้ยงเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ใต้รูปที่ 14 ยกเว้น ไม่เติม K_2HPO_4 และ แปรผันปริมาณไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0-0.25 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 19 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณไดโซเดียมไ ฮโดรเจนฟอสเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (เปอร์เซนต์)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)
0	10.54
0.05	52.61
0.10	26.33
0.15	16.94
0.20	10.40
0.25	3.57

ตารางที่ 20 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (เปอร์เซนต์)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)
0	1.20
0.05	1.20
0.10	1.20
0.15	1.29
0.20	1.25
0.25	1.23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่แปรผันเกลือแร่ชนิดต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเข้มข้นของสาร (เปอร์เซนต์)	ค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันเกลือแร่ชนิดต่างๆ (ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5)			
	โซเดียมคลอไรด	แมกนีเซียมซัลเฟต	ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
0	7.62			
0.5	8.89			
1.0	9.02			
1.5	9.08			
1.8	9.01			
2.0	9.07			
0		8.94		
0.25		8.74		
0.3		8.87		
0.35		8.47		
0.4		8.72		
0.5		8.68		
0			8.92	8.87
0.05			8.88	8.84
0.1			8.80	8.86
0.15			8.70	8.73
0.2			8.62	8.58
0.25			8.66	8.87

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เพื่อสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม มีองค์ประกอบดังนี้

กลูโคส	0.2	เปอร์เซนต์
โพลีเปปโตน	0.1	เปอร์เซนต์
ผงสกัดจากยีสต์	0.5	เปอร์เซนต์
โซเดียมคลอไรด์	1.8	เปอร์เซนต์
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.05	เปอร์เซนต์
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.35	เปอร์เซนต์
ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ	7.5	

ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงใช้สูตรอาหารดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 72 ชม.

ภาวะในการเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เพื่อสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม

1. ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมดังกล่าวไว้ข้างต้น โดยแปรระดับความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-8.5 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 16 และตารางที่ 22 และ23 พบว่าระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 6.5 และการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม ของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 คือ pH 7.5 ได้ปริมาณสารเท่ากับ 64.41 ไมโครกรัมต่อลิตร และความสามารถในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมจะลดลงเมื่อความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงกว่า 7.5 และต่ำกว่า 7.0

2. ผลของอุณหภูมิต่อการเพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เพื่อสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

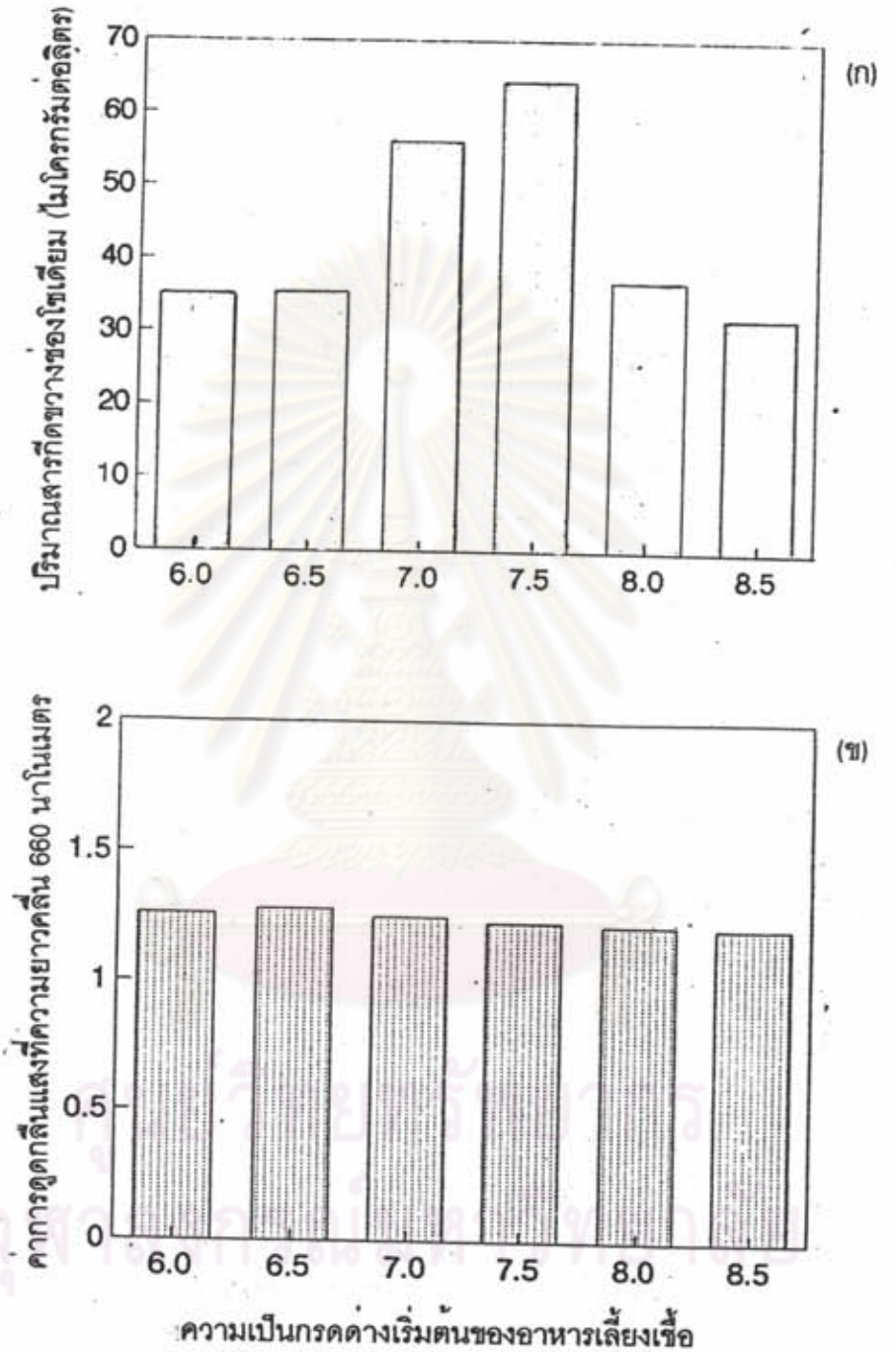
เหลวที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้สูงสุดเท่ากับ 62.38 ไมโครกรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสและจะลดลงเมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงสูงขึ้นหรือต่ำกว่า 28 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 17 และตารางที่ 24 และ 25

3. ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการเพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เพื่อสารสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่า 100, 200 รอบต่อนาที และไม่เขย่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อสามารถเจริญและสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงสุดเท่ากับ 55.66 ไมโครกรัมต่อลิตรโดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 18 และตารางที่ 26 และ 27 ความเร็วรอบที่สูงกว่า 200 รอบต่อนาที อาจมีผลในการเพิ่มความสามารถในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม แต่เนื่องจากขีดจำกัดของอุปกรณ์ที่มีอยู่จึงไม่สามารถทดสอบที่ความเร็วรอบสูงกว่านี้

4. ผลของการหารูปแบบการเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1

จากการหารูปแบบการเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยเลี้ยง เชื้อ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวสูตรที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ค หมายเลข 3) ทำการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 0-216 ชม. และเมื่อนำมาตรวจวัดการเจริญ วิเคราะห์หาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (ภาคผนวก ค หมายเลข 7) ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อและหาปริมาณไนโตรเจน (ภาคผนวก ค หมายเลข 6) พบว่าเชื้อจะเจริญได้สูงสุดที่เวลา 24 ชม. แต่จะสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงสุดเท่ากับ 64.27 ไมโครกรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม. ซึ่งมีน้ำตาลรีดิวส์เหลืออยู่ 18.8 เปอร์เซนต์ และมีไนโตรเจนเหลืออยู่ 0.037 เปอร์เซนต์ และพบว่าความเป็นกรดด่างของอาหารลดลงใน 6 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 6 ชั่วโมงถัดมา จากนั้นจะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดการเพาะเลี้ยงดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 16 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) และแปรผันความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0-8.5 บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชม.

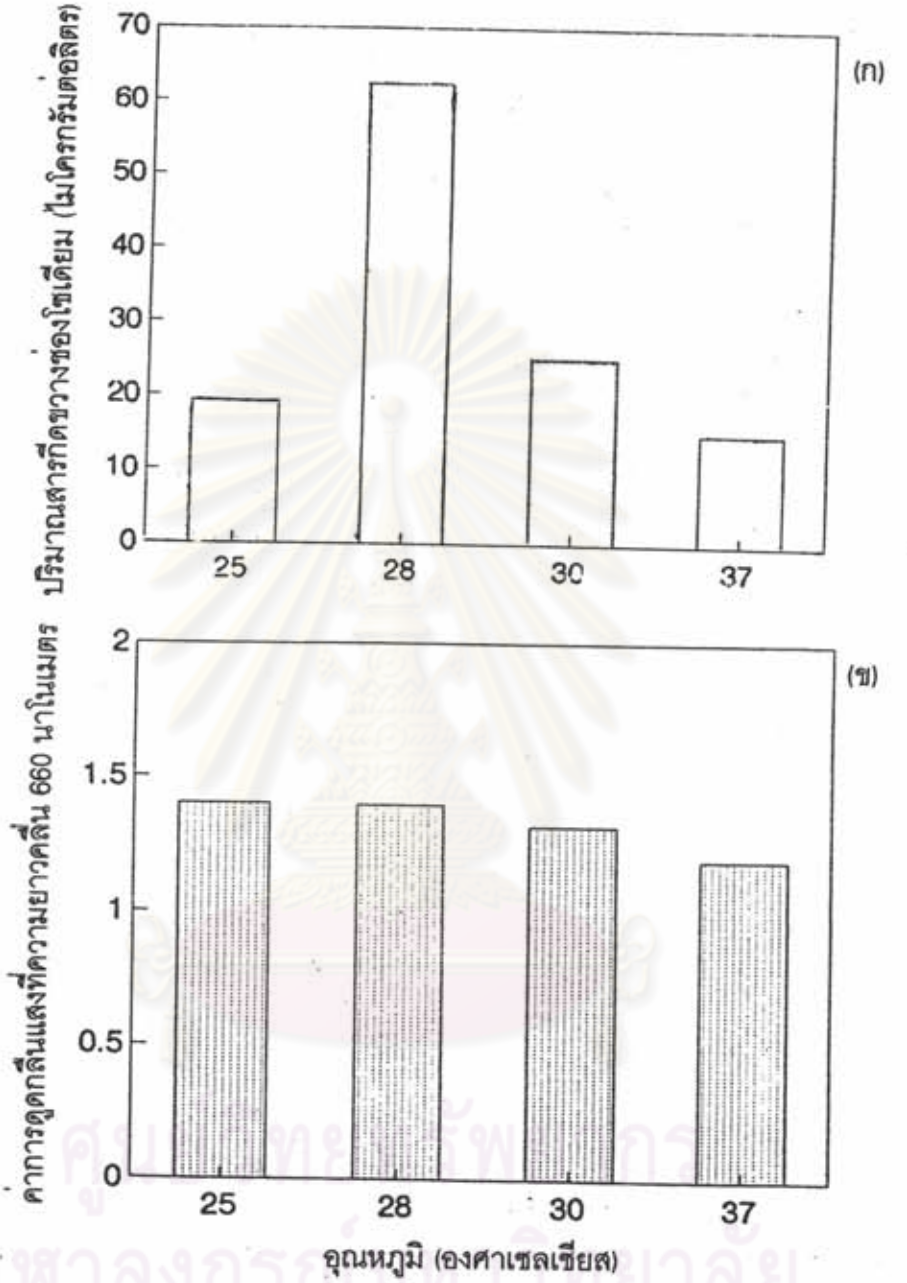
ตารางที่ 22 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)
6.0	35.11
6.5	35.50
7.0	56.05
7.5	64.41
8.0	37.03
8.5	32.01

ตารางที่ 23 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญ(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)
6.0	1.26
6.5	1.28
7.0	1.25
7.5	1.23
8.0	1.22
8.5	1.21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) และปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส บ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 72 ชม.

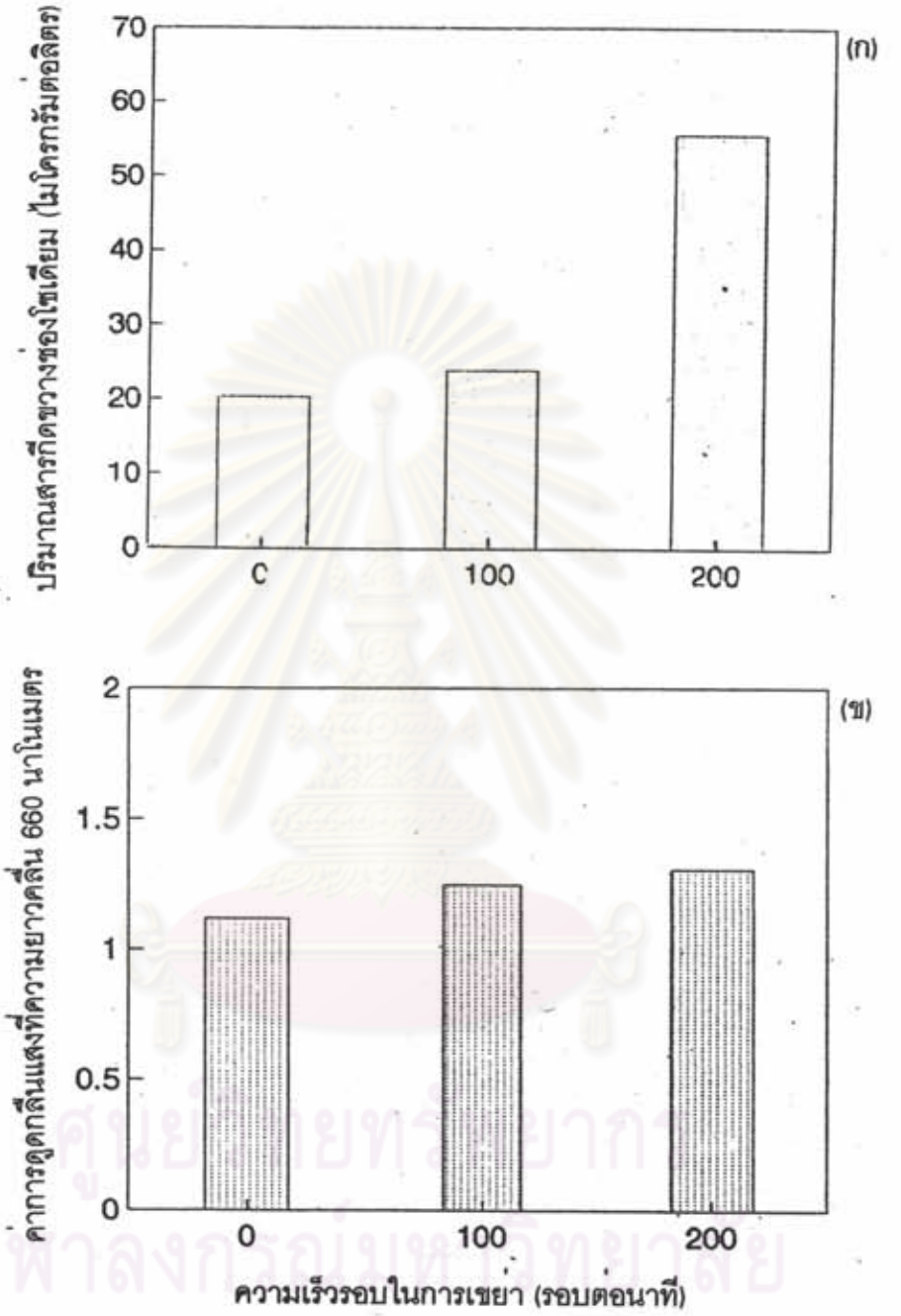
ตารางที่ 24 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้วที่อุณหภูมิต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)
25	19.31
28	62.38
30	25.17
37	15.03

ตารางที่ 25 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้วที่อุณหภูมิต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)
25	1.40
28	1.39
30	1.32
37	1.20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงแล้วปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 และแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 100, 200 รอบต่อนาทีและไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม.

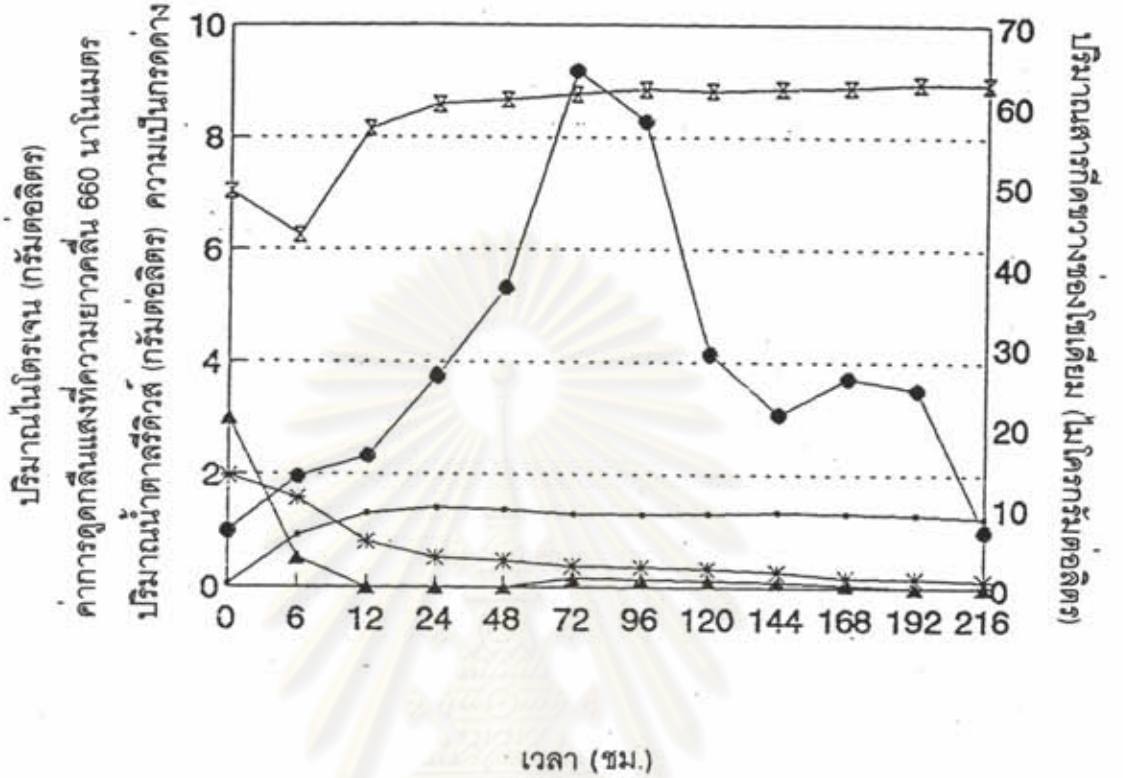
ตารางที่ 26 ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้ว และนำไปบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที, 100 รอบต่อนาที และภาวะที่ไม่เขย่า ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบต่อนาที)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg/l)
0	20.33
100	23.86
200	55.62

ตารางที่ 27 การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้ว และนำไปบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที, 100 รอบต่อนาที และภาวะที่ไม่เขย่า ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม.

ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบต่อนาที)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)
0	1.12
100	1.25
200	1.31

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 รูปแบบของการเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม ของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการปรับปรุงแล้วซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ โพลีเปปโตน 0.1 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์ 1.8 เปอร์เซนต์ แมกนีเซียมซัลเฟต0.35 เปอร์เซนต์ และไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชม.

- ● ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (ไมโครกรัมต่อลิตร)
- ⊸ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
- ✳ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
- ▲ ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
- ⧖ ความเป็นกรดด่าง

ตารางที่ 28 แสดงค่าการเจริญ ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณไนโตรเจน เมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่ได้ทำการปรับปรุงแล้ว ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ โพลีเปปโตน 0.1 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์ 1.8 เปอร์เซนต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.35 เปอร์เซนต์ และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชม.

เวลา (ชม)	การเจริญ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร)	ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม (µg) ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.06	6.97	7.03	3.00	1.97
6	0.92	13.71	6.25	0.52	1.58
12	1.31	16.26	8.15	0	0.81
24	1.42	26.24	8.58	0	0.53
48	1.38	37.27	8.66	0	0.47
72	1.30	64.27	8.76	0.16	0.38
96	1.30	58.00	8.85	0.14	0.36
120	1.31	29.14	8.82	0.13	0.34
144	1.33	21.56	8.86	0.10	0.28
168	1.32	26.06	8.88	0.05	0.17
192	1.30	24.67	8.95	0	0.16
216	1.25	7.08	8.95	0	0.13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)

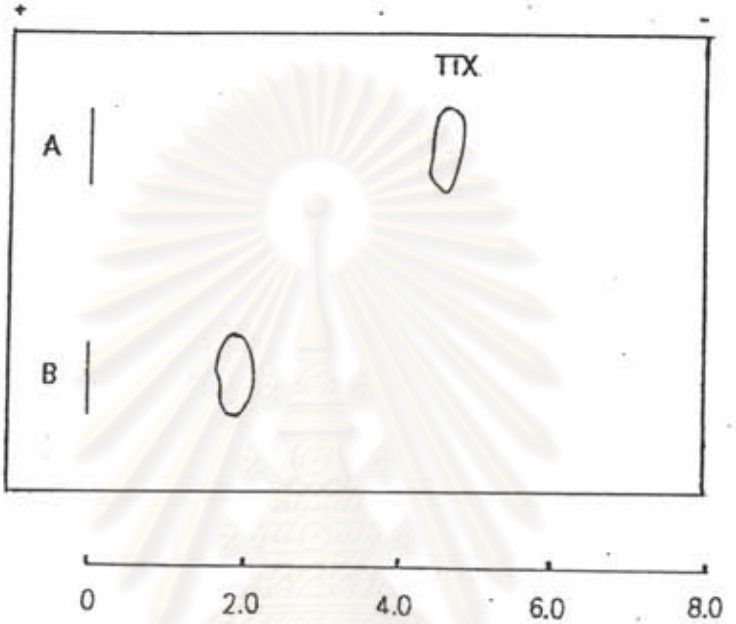
เมื่อนำสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ปรับปรุงแล้ว มาวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์ของสารกลุ่มกอนิออทอกซิน (GTXs) โดยใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย โดยดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่า สารมาตรฐานและสารสกัดจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบและมีระยะทางที่เคลื่อนที่เท่ากับ 0.31 ซึ่งตรงกับสารมาตรฐานอนุพันธ์ GTX1 ดังแสดงผลในรูปที่ 20 แต่เมื่อวิเคราะห์สารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 โดยใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ได้พบว่าสารสกัดไม่มีอนุพันธ์ที่มีระยะทางในการเคลื่อนที่อยู่ในตำแหน่งเท่ากับหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกลุ่ม TTXs ดังแสดงผลในรูปที่ 21

รูปที่ 20 ผลการวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs) ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 1 หน้า 32

A คือสารมาตรฐานกอนิออทอกซิน (GTX1-4)

B คือสารสกัดจาก *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 ผลการวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (TTXs) ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 1 หน้า 32

A คือสารมาตรฐานเทโทรโดทอกซิน

B คือสารสกัดจาก *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1

ผลการวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 โดยวิธีเอชพีแอลซี (HPLC)

เมื่อนำสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ปรับปรุงแล้วมาวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน ได้แก่ เทโทรโดทอกซิน (TTX), 6 อีพิเทโทรโดทอกซิน (6 epi-TTX), 6 อี-แอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน (6 e-anhTTX), 4 อีพิ-เทโทรโดทอกซิน (4 epi-TTX) และแอนไฮโดรเทโทรโดทอกซิน (anh-TTX) โดยวิธี HPLC ตรวจพบพีคลักษณะ shoulder ที่มี retention time เท่ากับ 22.063 นาที โดยพีคของสารมาตรฐาน 4 epi-TTX มี retention time เท่ากับ 22.0.85 นาที ซึ่งอาจจะเป็นอนุพันธ์ 4epi-TTX ดังแสดงผลในตารางที่ 29 และโครมาโตแกรมแสดงการวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซีของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซินและสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในรูปที่ 22

จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยได้แก่กลุ่มซัคซิทอกซิน (STXs) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน, นีโอซัคซิทอกซิน (NSTX) ดีคาร์บา-โมอิลซัคซิทอกซิน (DSTX) และกลุ่มกอนิออทอกซิน (GTXs) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์กอนิออทอกซิน 1, 2, 3, 4 และ 5 (GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 และ GTX5) และกลุ่มซี (C) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ซี 1, 2, 3 และ4 (C1, C2, C3, และC4) สามารถตรวจพบอนุพันธ์ GTX2 และGTX4 ซึ่งมีค่า retention time เท่ากับ 18.365 และ 8.421 นาที ตามลำดับ โดยพีคของสารมาตรฐาน GTX2 และ GTX4 มีค่า retention time เท่ากับ 18.395 และ 8.388 นาที ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 30 และโครมาโตแกรมแสดงการวิเคราะห์เอช พี แอล ซี ของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยและสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 แสดงในรูปที่ 23, 24 และ 25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 29 ชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทโดทอกซิน (TTXs) ที่ตรวจพบในสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ปรับปรุงแล้ว และวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

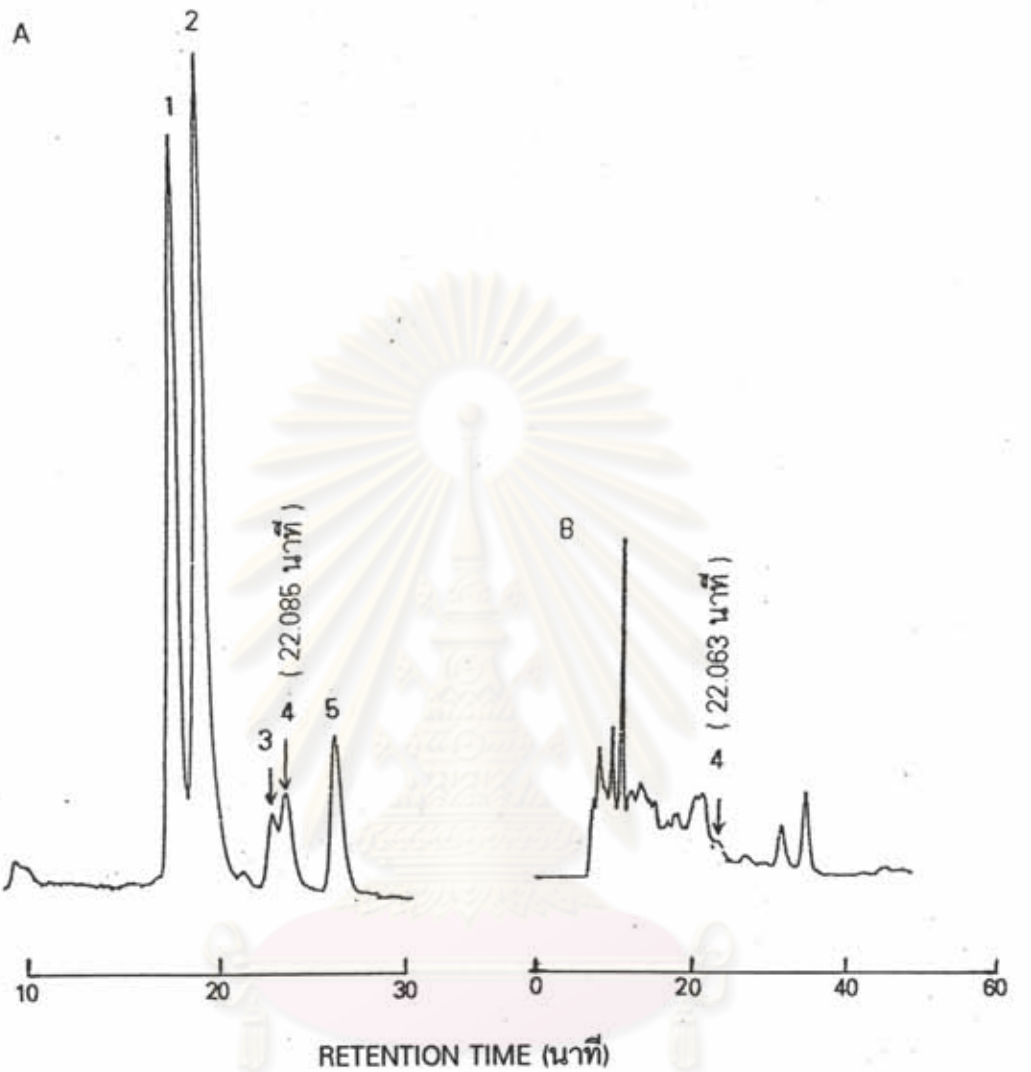
ตัวอย่าง	ชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม TTXs				
	TTX	6epi-TTX	6e-anhTTX	4epi-TTX	anh-TTX
[1]สารสกัดจาก *Vibrio sp.*สายพันธุ์ St-1-1	-	-	-	±	-

ตารางที่ 30 ชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs) ที่ตรวจพบในสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ปรับปรุงแล้ว และวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ตัวอย่าง	ชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม PSPs											
	STX	NSTX	DSTX	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	GTX5	C1	C2	C3	C4
[1]สารสกัดจาก *Vibrio sp.*สายพันธุ์ St-1-1	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

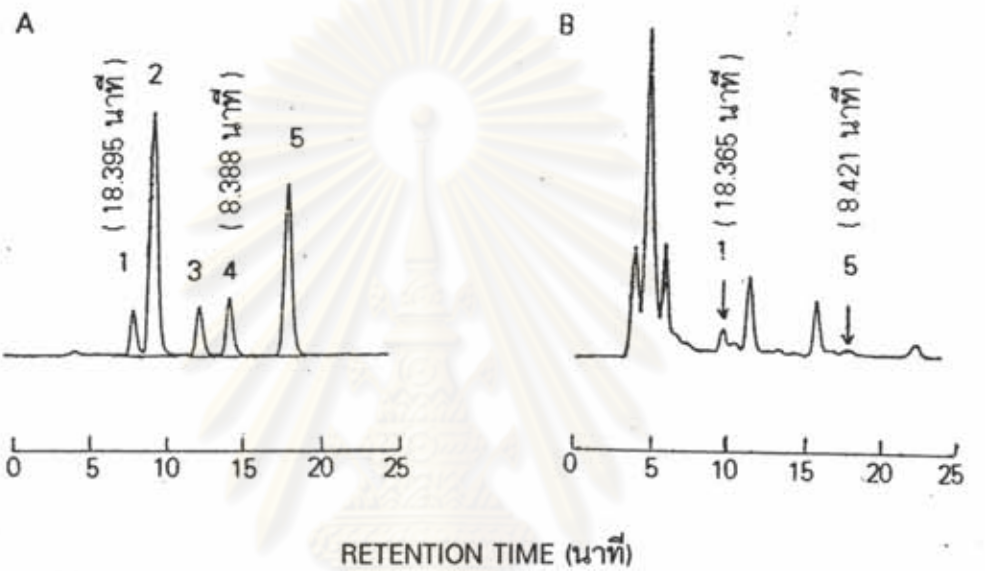
หมายเหตุ [1]วิเคราะห์โดย Professor Masaaki Kodama, Laboratory of Marine Biological Chemistry, School of Fisheries Science, Kitasato University, Japan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



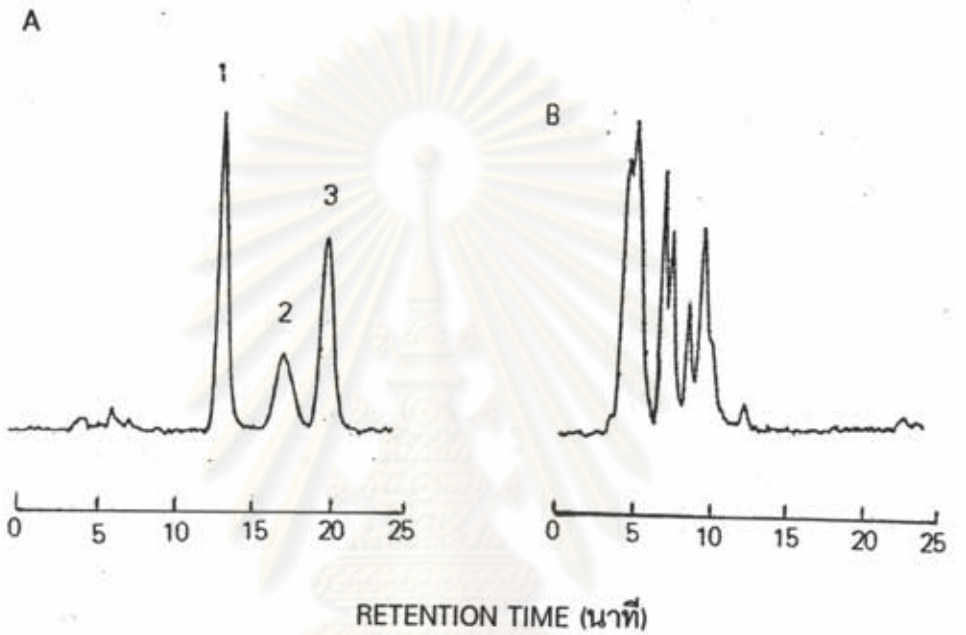
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์โดยวิธี เอช พี แอล ซี ของสารมาตรฐานกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (A) ซึ่งได้แก่ TTX(1), 6epi-TTX(2), 6e anh-TTX(3), 4epi-TTX(4), anh-TTX (5) และโครมาโตแกรมของสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (B) คือพีคของสารสกัดที่มี retention time ใกล้เคียงกับพีคของสารมาตรฐาน 4 epi-TTX



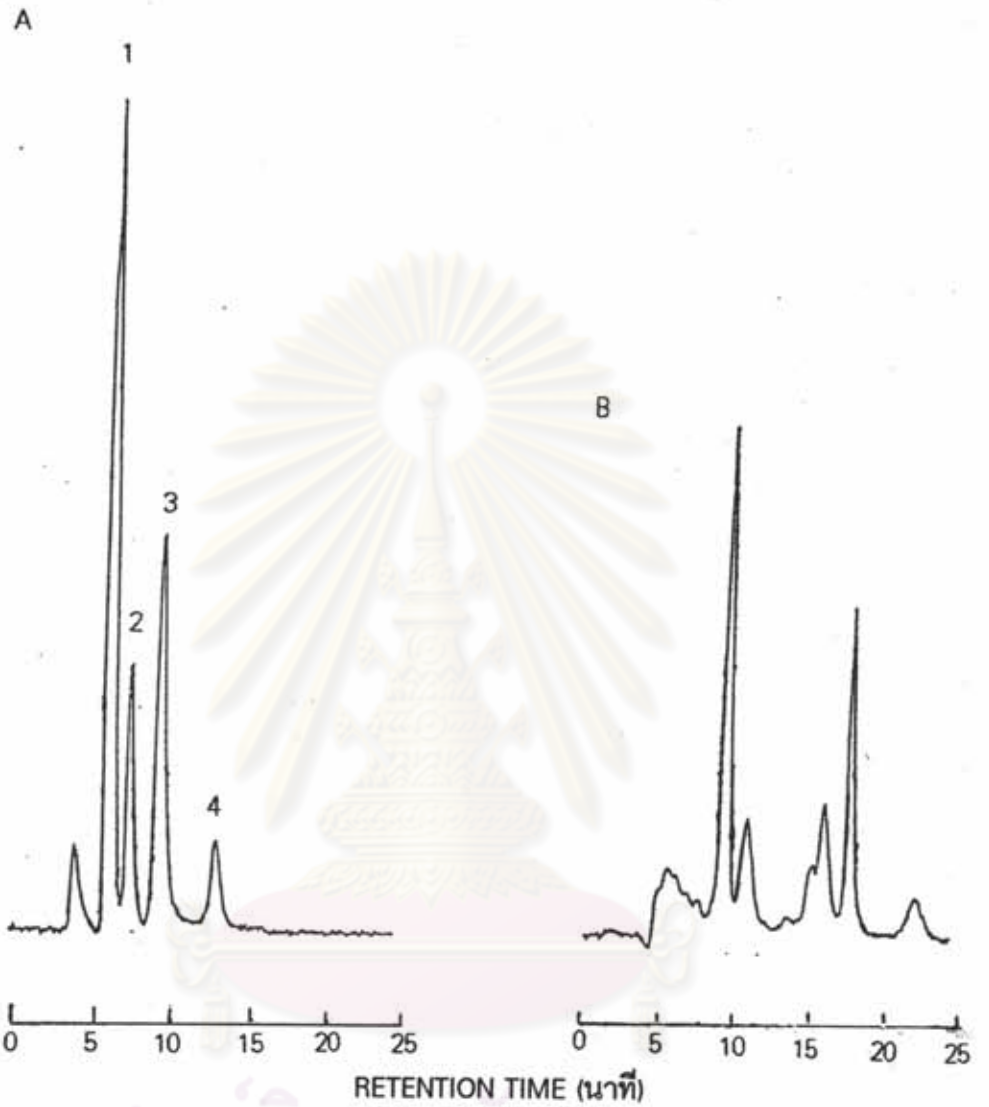
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์โดย เอช พี แอล ซี ของสารมาตรฐานกลุ่มกอนิออทอกซิน (A) ซึ่งได้แก่ GTX4(1), GTX1(2), GTX5(3), GTX3(4), GTX2(5) และโครมาโตรแกรมของสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (B) แสดงพีคของสารสกัดที่มี retention time ตรงกับพีคของอนุพันธ์ GTX2 และ GTX4



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 24 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์โดยวิธี เอช พี แอล ซี ของสารมาตรฐานกลุ่มซัคชิทอกซิน (A) ซึ่งได้แก่ NSTX(1), DSTX(2), STX(3) และโครมาโตแกรมของสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (B) แสดงพีคของสารสกัดซึ่งไม่สามารถตรวจพบพีคของอนุพันธ์ของสารกลุ่มนี้ ที่มีค่า retention time เท่ากับของพีคของสารมาตรฐาน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 25 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์โดยวิธี เอช พี แอล ซี ของสารมาตรฐานกลุ่มซี (A) ซึ่งได้แก่ C1(1), C2(2), C3(3), C4(4) และโครมาโตแกรมของสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (B) ซึ่งไม่พบพีคของสารสกัดที่มีค่า retention time เท่ากับพีคของสารมาตรฐาน