

รายงานโครงการวิจัย  
งบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๓

การศึกษาการส่งสัญญาณควอรัมเซนซิงจากแบคทีเรียในทะเล  
Study of Quorum sensing signaling from marine bacteria



ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH

QR

106

๗๖๔๙๕

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน.....  
วัน,เดือน,ปี 17 ก.พ. 2549

58933

11506222  
b.....  
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาต  
ให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง  
ไม่รวมค่า.....

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการศึกษาการส่งสัญญาณควอรัมเซนซิงจากแบคทีเรียในทะเลดำเนินงานไปได้เป็นอย่างดีโดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2547 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย และขอขอบคุณ นางสาววิภาวี แบบประเสริฐ นักศึกษาปริญญาโทที่ช่วยเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และช่วยในการทำโครงการวิจัยนี้

ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษย์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญรูป.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 การสื่อสารในแบคทีเรีย.....	4
2.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก.....	4
2.3 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ.....	5
2.4 เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (Acyl-homoserine lactone).....	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	11
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	11
3.2 สารเคมี.....	11
3.3 อุปกรณ์.....	13
3.4 สถานที่ทำการวิจัย.....	13
3.5 วิธีการศึกษา.....	14
บทที่ 4 ผลลัพธ์และอภิปรายผล.....	21
4.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล.....	21
4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	23
4.3 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน.....	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของ ไอโซเลท C-001, C-002 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin Salt Agar (GS).....	35
4.5 การศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเฮซิทโซโมเซอรินแลคโตน.....	37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	41
บรรณานุกรม .....	43
ภาคผนวก ก .....	47
ภาคผนวก ข .....	50



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมบวกโดยผ่าน โมเลกุลสัญญาณเปปไทด์.....	5
2.2 โครงสร้างของ โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (3-oxo-C6-HSL).....	6
2.3 โครงสร้างของ โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีความยาว ของสายโซ่เอซิลแตกต่างกัน .....	8
2.4 การสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน .....	9
2.5 ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบโดยผ่าน โมเลกุลสัญญาณเอซิล โฮโมเซอรินแลคโตน.....	9
3.1 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน ด้วยวิธี cross streak assay.....	15
4.1 สถานที่เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล บ้านแหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี .....	22
4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน ด้วยวิธี cross streak assay และลักษณะการเกิดสีฟ้าของ <i>A. tumefaciens</i> A136 เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียที่เป็น positive control <i>E. coli</i> IFO3310 (ก), แบคทีเรียที่เป็น negative control <i>A. tumefaciens</i> KYC6 (ข) และตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล ไอโซเลท C-011 (ค).....	25
4.3 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มที่ 3 จากการคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิต โมเลกุลสัญญาณเอซิล โฮโมเซอรินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay .....	26
4.4 จีโนมิกส์เอ็นเอของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 จากการแยกด้วยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	29
4.5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Bifidobacterium brve</i> , <i>Escherichia coli</i> และ <i>Marinobactor</i> sp. ....	31
4.6 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA .....	32
4.7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 599 คู่เบส ของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 .....	33
4.8 การเจริญของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS agar).....	36

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
4.9 การเจริญของตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 30, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร .....	37
4.10 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของตัวอย่างแบคทีเรียจาก น้ำทะเลไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 .....	38
4.11 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของตัวอย่างแบคทีเรียจาก น้ำทะเลไอโซเลท C-011 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MB และเมื่อเติมละลายกลูโคส ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลาที่ 2 และช่วงเวลาที่ 4 ของการ เพาะเลี้ยง .....	40



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1	18
4.1	34

3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่.....18

4.1 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในรณการยีน.....34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบว่า แบคทีเรียมีคุณสมบัติเหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ นั่นคือ มีความสามารถในการติดต่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์ (cell-to-cell communication) ได้ โดยแบคทีเรียจะผลิตและปล่อยสารเคมีออกมาเพื่อส่งสัญญาณ (signal) ซึ่งกันและกัน และร่วมกันทำกิจกรรมบางอย่าง แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ใช้สารโมเลกุลเล็กจำพวกโพลิโกเปปไทด์เป็นตัวส่งสัญญาณ (Dunny and Leonard, 1997) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) จะส่งสัญญาณโมเลกุลหลายชนิด (Bassler, 1999) ระบบควอรัมเซนซิง (quorum sensing) เป็นการสื่อสารระบบหนึ่งที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ และเป็นระบบที่มีความสำคัญต่อการควบคุมจำนวนประชากรของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นของประชากรเพิ่มขึ้น จะมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (*N*-acyl-homoserine lactone หรือ acyl-HSL) โดยเอนไซม์ในกลุ่มของโปรตีน LuxI เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นสัญญาณโมเลกุลนี้จะอยู่ภายในเซลล์หรือถูกขับออกนอกเซลล์ และสามารถจับกับรีเซพเตอร์ (receptor) ในกลุ่มของโปรตีน LuxR ที่มีความจำเพาะ เมื่อสัญญาณโมเลกุลจับกับตัวรีเซพเตอร์แล้วจะไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการแสดงออกทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกันออกไป และในที่สุดสามารถลดจำนวนประชากรของแบคทีเรียลงได้

ตัวอย่างงานวิจัยระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ การศึกษาการแสดงออกของการเรืองแสง (bioluminescence) ในแบคทีเรีย *Vibrio fischeri* และ *Vibrio harveyi* แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้จะผลิตและตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน นั่นคือเมื่อเชื้อเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น จะมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน และสะสมอยู่ในอาหารจนกระทั่งมีปริมาณสูงพอที่จะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด signal transduction cascade จะส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) โดย LuxI สร้างโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนมาจับกับรีเซพเตอร์ LuxR แล้วกระตุ้นการถอดรหัสของยีนโครงสร้างของเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (*luxCDABE*) (Engebrecht *et al.*, 1983; Engebrecht and Silverman, 1984; 1987) มีรายงานวิจัยพบว่า ระบบควอรัมเซนซิงมีประโยชน์ทางการแพทย์และเกษตรกรรม เนื่องจากระบบควอรัมเซนซิงควบคุมการแสดงออกของการถอดรหัสของยีนและการหลังโปรตีนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนหรือในพืช การศึกษาระบบควอรัมเซนซิงที่กลไก

การก่อโรคเป็นที่ทราบกันเป็นอย่างดีในวงการแพทย์ คือ การศึกษาระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* แบคทีเรีย *P. aeruginosa* จะผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนชนิด 3-oxo-C12-HSL จากการทำงานของโปรตีน LasI เมื่อโมเลกุลสัญญาณเข้าจับกับรีเซพเตอร์ LasR จะเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อีลาสเทส (elastase) ที่ทำหน้าที่ย่อยอีลาสติน (elastin) และคอลลาเจน (collagen) แล้วยับยั้งการทำงานของอิมมูโนโกลบูลินจี ทำให้ความรุนแรงของการเกิดโรคเพิ่มขึ้น (Passador *et al.*, 1993) แบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่เข้าไปเจริญในปอดจะเจริญติดกับผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อปอดและแสดงคุณสมบัติที่เรียกว่า twitching เกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นโคโลนีเล็กๆ (microcolony) และขยายขนาดหนาขึ้นเป็นไบโอฟิล์ม ทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถเข้าไปฆ่าเชื้อที่อยู่ภายในได้ ก่อให้เกิดปัญหาโรคเรื้อรัง มีงานวิจัยพบว่า *P. aeruginosa* สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถผลิต 3-oxo-C12-HSL จะไม่สามารถพัฒนาและเกิดเป็นไบโอฟิล์มได้ ทำให้เชื้อถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะได้ง่ายขึ้น (Rashid *et al.*, 2000) สำหรับพาโทเจน *Agrobacterium tumefaciens* ที่ก่อให้เกิดโรคมุ่มปม (crown gall tumor) ในพืช อาศัยระบบควอรัมเซนซิงกระตุ้นการขนส่งพลาสมิด Ti เข้าสู่พืช (Zhang *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* สายพันธุ์กลายที่ขาดยีนในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตน จะแสดงความรุนแรงของการก่อโรคลดลง (Pirhonen *et al.*, 1993) ดังนั้นการศึกษาระบบควบคุมจำนวนประชากรหรือระบบควอรัมเซนซิง และการเข้าใจกลไกในการส่งสัญญาณจึงเป็นเป้าหมายหนึ่งในการพัฒนาแนวทางการรักษาโรคแนวใหม่โดยไม่ใช้ยาปฏิชีวนะ แต่เป็นการรบกวนความรุนแรงของการก่อโรคของแบคทีเรียแทน

มีรายงานการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงเป็นจำนวนมาก แต่ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลยังมีรายงานการศึกษาไม่มากนัก ทะเลเป็นระบบนิเวศหนึ่งที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูง มีความแปรผันทั้งแรงดัน ความเค็มและอุณหภูมิ ทำให้แบคทีเรียมีการปรับตัว โดยการพัฒนาศรีวิทยาและเมตาบอลิซึมเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดในสภาพแวดล้อมนั้นได้ แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลบางชนิดถูกค้นพบว่าผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น *Alteromonas rubra* ผลิตยาปฏิชีวนะซึ่งมีฤทธิ์ต้านทานการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (McCraen and Hemscheidt, 2000) แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลที่พบส่วนใหญ่มักเป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคนได้ แบคทีเรีย *Vibrio fischeri* เป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่มีรายงานการพบโมเลกุลสัญญาณเอสซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตน (Eberhard *et al.*, 1981) และใช้เป็นรูปแบบในการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงจนกระทั่งถึงปัจจุบัน นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงใน *Vibrio harveyi* ว่าเกี่ยวข้องกับการเรืองแสง (Cao and Meighen, 1989) ใน *Vibrio anguillarum* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในปลาทะเล (Milton *et al.*, 1997) และใน

*Vibrio cholerae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคน (Cámara *et al.*, 2002) แต่ยังมีแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp. อีกหลายสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค รวมถึงแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลสายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่มีรายงานการศึกษาระบบควอรัมเซนซิง ดังนั้นแบคทีเรียในน้ำทะเลจึงจัดเป็นแบคทีเรียที่น่าสนใจในการศึกษาระบบควอรัมเซนซิง หรือกลไกการส่งโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โครงการวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาแบคทีเรียในทะเลที่มีคุณสมบัติในการผลิตและส่งสัญญาณควอรัมเซนซิง ซึ่งอาจนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ รวมถึงการลดระดับความรุนแรงของการก่อโรคของจุลินทรีย์ได้ในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาเทคนิคการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากทะเล
- 1.2.2 ศึกษาคุณสมบัติและชนิดของแบคทีเรียในทะเลที่สร้างและส่งสัญญาณควอรัมเซนซิง
- 1.2.3 ศึกษาลักษณะของการส่งสัญญาณควอรัมเซนซิง รวมถึงการควบคุมประชากรของตัวเองและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เป็นการศึกษาควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียในทะเล โดยเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากทะเล นำมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นทดสอบการสร้างสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนกับ reporter strain แล้วนำแบคทีเรียที่ผลิตสัญญาณดังกล่าวมาศึกษาชนิด พร้อมทั้งคุณสมบัติทางชีวเคมีและจุลชีววิทยา รวมถึงศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rDNA และศึกษาคุณสมบัติของการส่งสัญญาณควอรัมเซนซิง

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการสร้างและส่งสัญญาณควอรัมเซนซิงซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยด้านอื่นๆ ได้ เช่น การศึกษาแบคทีเรียที่ผลิตสารต้านต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และใช้ในการรักษาโรคโดยใช้วิธีควบคุมประชากรของจุลินทรีย์หรือลดความรุนแรงของการก่อโรค

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 การสื่อสารในแบคทีเรีย

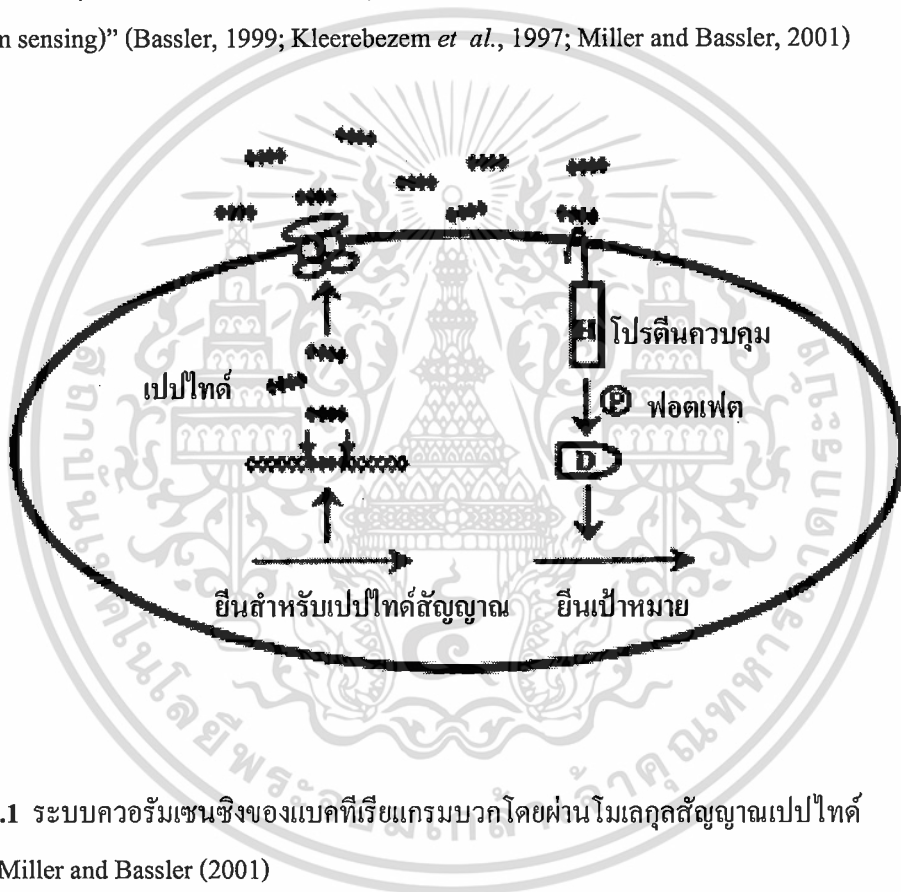
ในโลกปัจจุบัน สิ่งมีชีวิตต่างๆ หลายชนิดอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ชุมชน และมีการติดต่อสื่อสารระหว่างกัน มนุษย์ก็สามารถสื่อสารระหว่างกันได้โดยอาศัยภาษาและท่าทางเป็นสื่อ ผ่านระบบกลไกจากสมองทำให้สามารถพัฒนาการสื่อสารออกมาในรูปแบบของเสียงและท่าทาง สัตว์อาศัยการสื่อสารด้วยท่าทาง สัญญาณเสียง การสัมผัส และสารเคมีที่เรียกว่าฟีโรโมน (pheromone) สำหรับแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่ยังไม่มีการพัฒนาเซลล์ขึ้นเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเหมือนกับในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง มนุษย์อาจไม่คิดว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีการติดต่อสื่อสารกันได้ แบคทีเรียหลายชนิดอาศัยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (community) และมีการติดต่อสื่อสารระหว่างกันได้เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่จะส่งสัญญาณเคมีในการติดต่อสื่อสารเพื่อทำกิจกรรมบางอย่างร่วมกัน นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสามารถติดต่อสื่อสารระหว่างสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างสายพันธุ์ โดยการตอบสนองต่อสัญญาณภายนอก (external signal) จากเซลล์ข้างเคียง ไม่ว่าจะเซลล์นั้นจะเป็นเซลล์แบคทีเรีย เซลล์พืช หรือเซลล์สัตว์ การติดต่อสื่อสารในแบคทีเรียแกรมลบต่างกับแบคทีเรียแกรมบวก โดยแบคทีเรียแกรมลบจะส่งสัญญาณโมเลกุลประเภทเอสซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน (*N*-acyl homoserine lactone) หรือ acyl-HSL (Parsek and Greenberg, 2000) แต่แบคทีเรียแกรมบวกจะส่งสัญญาณประเภทเปปไทด์ขนาดเล็ก (Dunny and Leonard, 1997)

### 2.2 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวก

แบคทีเรียแกรมบวกมีภาษาที่ใช้ในการสื่อสารระหว่างกันและสามารถตอบสนองต่อความหนาแน่นของเซลล์สูงได้ เมื่อสัญญาณถูกสร้างขึ้นจะไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกทางสรีรวิทยาต่างๆ ของเซลล์ เช่น ความสามารถในการนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ (uptake DNA) ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Streptococcus pneumoniae* ความรุนแรงในการก่อโรคของ *Staphylococcus aureus* การสืบพันธุ์แบบคอนจูเกชัน (conjugation) ของ *Enterococcus faecalis* และการผลิตไมโครซิน (microcin) ของ *Lactobacillus sake* และ *Carnobacterium piscicola* (Kleerebezem *et al.*, 1997; Novick and Muir, 1999)

แบคทีเรียแกรมบวกส่งโมเลกุลสัญญาณจำพวกโอลิโกเปปไทด์ ซึ่งไม่สามารถแพร่ออกนอกเซลล์ได้โดยตรง แต่จะส่งออกนอกเซลล์โดยจับกับโปรตีนขนส่งประเภท ABC (ATP-binding

cassette) เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโอลิโกเปปไทด์ซึ่งมีขนาดเล็กลงจึงถูกส่งผ่านออกนอกเซลล์ได้ เปปไทด์ที่ผ่านกระบวนการนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติหรือฟีโรโมน โดยมีโปรตีนเซนเซอร์สำหรับโคเนสที่เซลล์เมมเบรนเป็นตัวจดจำ เซนเซอร์ที่ได้รับสัญญาณเปปไทด์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการเติมฟอสเฟตด้วยตัวเอง (autophosphorylation) ที่บริเวณกรดอะมิโนฮิสทีดีนและเกิดการย้ายหมู่ฟอสเฟตไปยังโปรตีนควบคุม (regulator) ที่อยู่ข้างเคียง เมื่อมีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่โปรตีนควบคุมบริเวณกรดอะมิโนแอสปาร์เตทแล้ว โปรตีนนี้จะกระตุ้นหรือยับยั้งการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการตอบสนองต่อสัญญาณเปปไทด์ที่สร้างขึ้น (รูปที่ 2.1) ดังนั้นขบวนการขนส่งสัญญาณหรือการสื่อสารของแบคทีเรียแกรมบวกจึงจัดเป็นแบบ phosphorylase cascade โดยเรียกการควบคุมประชากรเซลล์ด้วยโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์นี้ว่า “เปปไทด์ควอรัมเซนซิง (peptide quorum sensing)” (Bassler, 1999; Kleerebezem *et al.*, 1997; Miller and Bassler, 2001)



รูปที่ 2.1 ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมบวกโดยผ่านโมเลกุลสัญญาณเปปไทด์  
ที่มา : Miller and Bassler (2001)

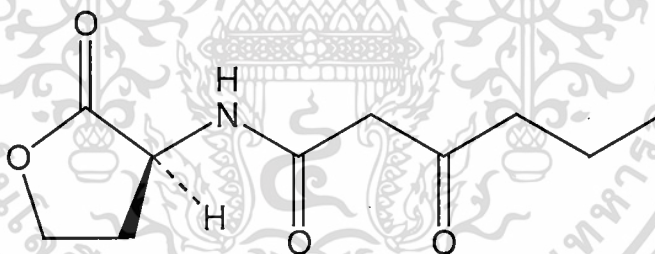
### 2.3 การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบ

การสื่อสารของแบคทีเรียแกรมลบมีหลายประเภท “ระบบควอรัมเซนซิง (quorum sensing)” เป็นการสื่อสารและการส่งสัญญาณประเภทหนึ่งที่มีความสำคัญและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง แบคทีเรียแกรมลบอาศัยระบบควอรัมเซนซิงเพื่อตอบสนองต่อความหนาแน่นของจำนวนประชากร (Fuqua *et al.*, 1994) นั่นคือ เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตและมีความหนาแน่นของจำนวนประชากร

เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งซึ่งมากพอ (threshold level) จะเกิดการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์สัญญาณโมเลกุลที่มีชื่อว่า “เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน (acyl-HSL)” และส่งสัญญาณนี้ออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของสัญญาณสูงถึงระดับที่สามารถจับกับรีเซพเตอร์จะเกิดการกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรีย และนำไปสู่การควบคุมความหนาแน่นของจำนวนประชากรในที่สุด มีรายงานว่าโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนมีผลต่อการเกิดไบโอฟิล์ม (biofilm formation) การสร้างเฮเทอโรซิสต์ (heterocyst formation) การเคลื่อนที่ (swarming) การส่งถ่ายพลาสมิด (plasmid conjugal transfer) และการสังเคราะห์ของยาปฏิชีวนะ (antibiotic biosynthesis) โดยขึ้นกับชนิดของเชื้อ (Creps, 2001) สัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนอาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าตัวเหนี่ยวนำอัตโนมัติ (autoinducer) ได้ ในกรณีที่สารนี้ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อกระตุ้นหรือยับยั้งตัวเอง นอกจากนี้สัญญาณดังกล่าวอาจแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปยังเซลล์อื่นๆ โดยทำหน้าที่เทียบเท่ากับฟีโรโมน (pheromone) ได้อีกด้วย

## 2.4 เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน (Acyl-homoserine lactone)

เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนเป็นสัญญาณโมเลกุลขนาดเล็ก พบในแบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปมีสูตรโครงสร้างเป็น 3-oxo-C6-HSL ดังแสดงในรูปที่ 2.2



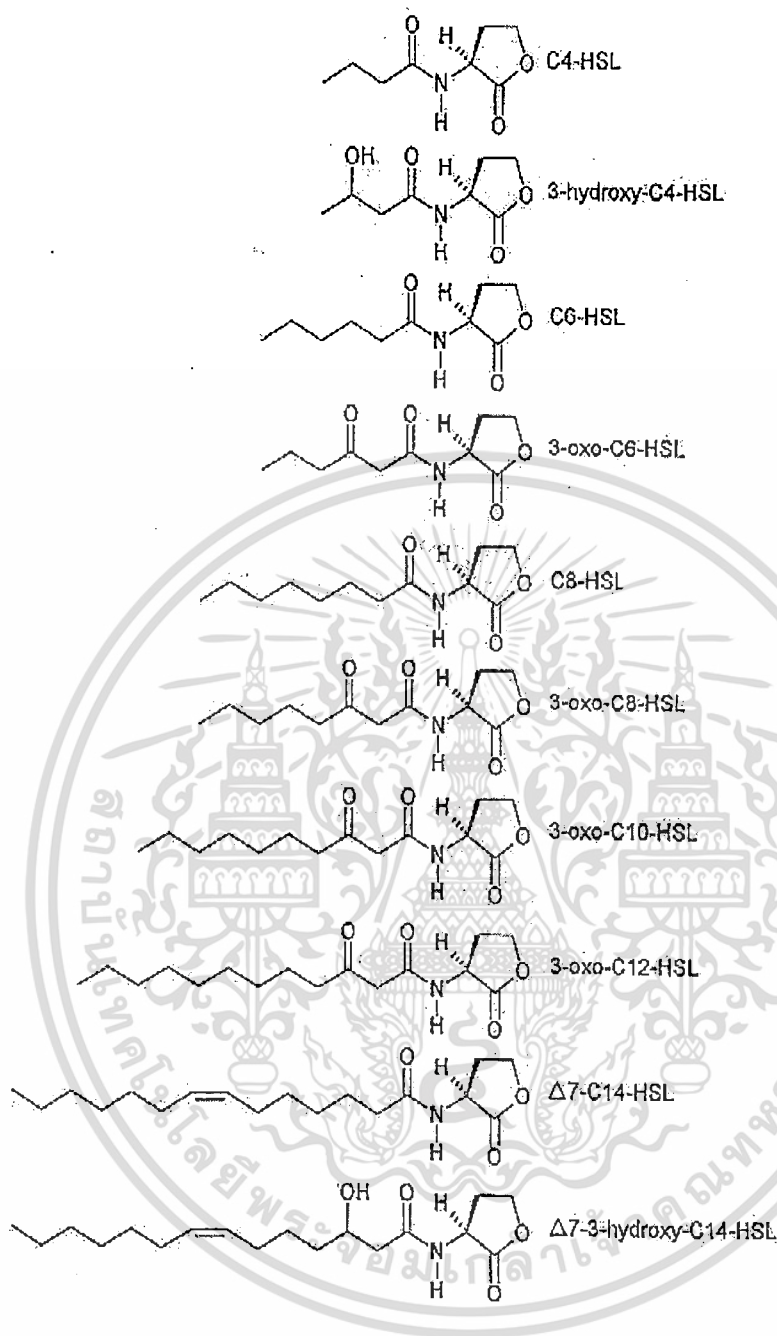
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตน (3-oxo-C6-HSL)

สารเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนสังเคราะห์จากสารตั้งต้น *S*-adenosylmethionine (SAM) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดอะมิโนและ acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) ที่เป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยมีเอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนซินเทส (acyl-homoserine lactone synthase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Moré *et al.*, 1996; Schaefer *et al.*, 1996) เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนซินเทสของแบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxI

ความแตกต่างของกรดอะมิโนในโปรตีน LuxI ของแบคทีเรียต่างชนิดกันทำให้มีการผลิตสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน สัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนมีโครงสร้างแตกต่างกันที่ความยาวของสายโซ่เอซิล (acyl side chain) ตั้งแต่ 4 ถึง 16 คาร์บอนอะตอม และบริเวณคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 ของสายโซ่เอซิลอาจอยู่ในรูปอิมิตัวหรือรูปคาร์บอนิล (O) หรือไฮดรอกซิล (OH) (Fuqua and Eberhard, 1999; Greenberg, 2000) (รูปที่ 2.3) โปรตีน Ahyl ในแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* จะสังเคราะห์ C4-HSL ซึ่งสามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้อย่างอิสระ (Swift *et al.*, 1997) โปรตีน LuxI ในแบคทีเรีย *V. fischeri* สังเคราะห์ 3-oxo-C6-HSL (Eberhard *et al.*, 1981) และโปรตีน LasI ในแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สังเคราะห์ 3-oxo-C12-HSL (Pearson *et al.*, 1994) ที่สามารถแพร่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้เช่นเดียวกันแต่ในอัตราเร็วที่ช้ากว่า นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่มีพันธะคู่ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 และ 8 ในสายโซ่เอซิลของแบคทีเรียบางชนิด เช่น ใน *Rhizobium leguminosarum* มีโปรตีน CinI ที่สังเคราะห์ 3-hydroxy-7-cis-C4-HSL และใน *Rhodobacter sphaeroides* มีโปรตีน CerI ที่สังเคราะห์ 7,8-cis-C4-HSL (Lithgow *et al.*, 2000; Puskas *et al.*, 1997)

เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโต แบ่งเซลล์และมีจำนวนประชากรหนาแน่นขึ้น โปรตีน LuxI จะกระตุ้นการสังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้น โดยโปรตีน LuxI ทำให้สารตั้งต้น SAM จับกับ acyl-ACP ด้วยพันธะเอไมด์ (amide bond) ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของสายโซ่เอซิล แล้วเกิดการย้ายหมู่แลคโตน (lactonization) ของสารตัวกลาง ซึ่งจะเกิดขึ้นพร้อมกับการหลุดออกของเมธิลไทโออะดีโนซีน (methylthioadenosine) ทำให้เกิดสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้น (รูปที่ 2.4) จากนั้นจะเกิดการแพร่ผ่านออกภายนอกเซลล์และสามารถจับกับรีเซพเตอร์ที่มีความจำเพาะซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน LuxR ตัวรีเซพเตอร์ที่มีสารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของยีนเป้าหมายและกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) ของยีนนั้นๆ (รูปที่ 2.5) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของแบคทีเรีย

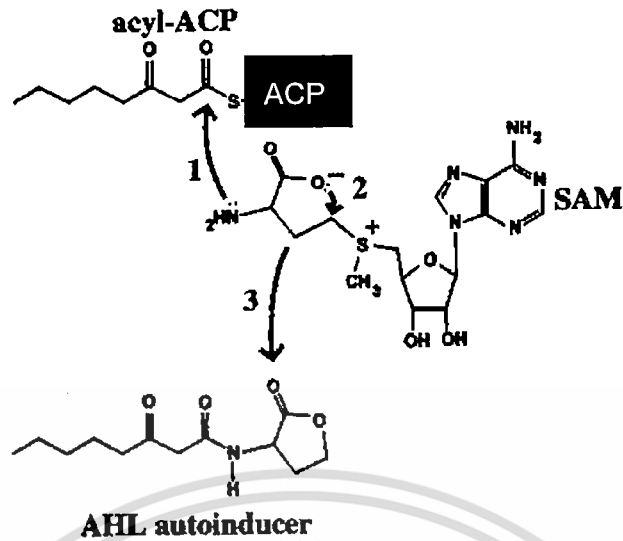
จากการศึกษาโปรตีน LuxR ใน *V. fischeri* พบว่าโปรตีน LuxR มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย 2 โดเมน (domain) คือ ด้านปลาย N (amino-terminal domain) ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (Slock *et al.*, 1990) และจะจับกับโมเลกุลสัญญาณเมื่อความเข้มข้นของโมเลกุลสัญญาณสูงถึงระดับนาโนโมลาร์ (nanomolar) (Kaplan and Greenberg, 1985) ด้านปลาย C (carboxyl-terminal domain) เป็นบริเวณที่จับกับดีเอ็นเอสำหรับกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมาย (Choi and Greenberg, 1991)



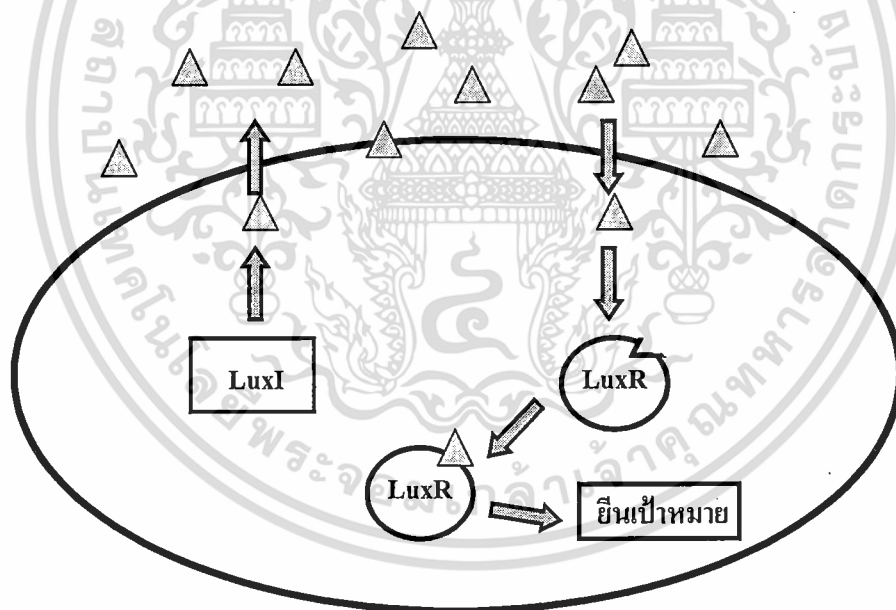
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรีนแลคโตนที่มีความยาวของสายโซ่เอซิลแตกต่างกัน

ที่มา : Fuqua and Eberhard (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน  
ที่มา : Miller and Bassler (2001)



รูปที่ 2.5 ระบบควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียแกรมลบโดยผ่านโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโม-  
เซอรินแลคโตน  
ที่มา : Bassler (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย *V. fischeri* และ *V. harveyi* ที่อาศัยแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) กับสัตว์ทะเลจะมีกลไกตอบสนองต่อโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน นั่นคือเมื่อโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในสภาพแวดล้อมมีปริมาณสูงถึงระดับหนึ่งจะจับกับรีเซพเตอร์ และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด signal transduction cascade ส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) (Engebrecht *et al.*, 1983; Engebrecht and Silverman, 1984; 1987)

ในปัจจุบันพบว่า การศึกษาระบบควอรัมเซนซิงในพาโทเจนมีประโยชน์ต่อวงการแพทย์และเกษตรกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากระบบควอรัมเซนซิงสามารถควบคุมการเจริญเติบโตและความรุนแรงของการเกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียในคนหรือในพืชได้ ยกตัวอย่าง เช่น เมื่อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ และเจริญติดอยู่บนผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อปอด เซลล์เดี่ยวแต่ละเซลล์ที่ติดกับผิวสัมผัสของเนื้อเยื่อจะแสดงคุณสมบัติของการเคลื่อนที่ที่เรียกว่า twitching หลังจากนั้นจะเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเป็นโคโลนีเล็กๆ และขยายขนาดหนาขึ้นเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายดอกเห็ด (mushroom shape) เซลล์แบคทีเรียถูกห่อหุ้มด้วยสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และมีช่องว่างที่ยอมให้สารอาหารผ่านเข้า และปล่อยของเสียออกนอกไบโอฟิล์ม เซลล์ของ *P. aeruginosa* ที่เจริญพัฒนาไปเป็นไบโอฟิล์มมีคุณสมบัติในการต้านทานยาปฏิชีวนะ เนื่องจากยาไม่สามารถเข้าไปทำลายเชื้อที่อยู่ภายในได้ ทำให้เกิดปัญหาโรคเรื้อรัง (Parsek and Greenberg, 2000) มีรายงานการวิจัยพบว่า แบคทีเรีย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่ขาดยีนในการสังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จะเกิดการรวมตัวเป็นโคโลนีขนาดเล็กที่เนื้อเยื่อผิวสัมผัส แต่ไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปเป็นไบโอฟิล์มได้ ทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะได้ง่ายขึ้น (Davies *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Erwinia stewartii* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวเฉาในข้าวโพดหวาน โดยในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ขาดยีนในการสังเคราะห์สารเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะมีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดโรคลดลง (Beck von Bodman and Farrand, 1995) ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ของระบบควอรัมเซนซิงกับความรุนแรงของการเกิดโรคจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการแพทย์และเกษตรกรรม และเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนารักษาโรคด้วยวิธีใหม่ที่ไม่ฆ่าแบคทีเรียโดยตรง แต่จะไปรบกวนความสามารถในการก่อโรค นอกจากนี้การศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน และยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง กับระบบควอรัมเซนซิงอาจนำไปสู่การควบคุมจำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้อีกด้วย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้

- 3.1.1 *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 (Ti)(pCF218)(pCF372)
- 3.1.2 *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ KYC6 (*traM::Tn5-gusA* harboring pCF218)
- 3.1.3 *Escherichia coli* สายพันธุ์ IFO3301

#### 3.2 สารเคมี

##### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.2.1.1 Marine broth (MB) และ Marine agar (MA)
- 3.2.1.2 Luria-Bertani medium (LB)
- 3.2.1.3 AT medium
- 3.2.1.4 Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS)
- 3.2.1.5 Gelatin salt agar (GS)

##### 3.2.2 ยาปฏิชีวนะ

- 3.2.2.1 สเปกตินอมัยซิน (spectinomycin)
- 3.2.2.2 เตตราไซคลิกลิน (tetracycline)

##### 3.2.3 เอนไซม์

- 3.2.3.1 เอนไซม์ *Taq* ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)
- 3.2.3.2 เอนไซม์ RNaseA (Promega, USA)

##### 3.2.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 3.2.4.1 แลम्บ์ดา ( $\lambda$ ) คัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (ขนาด 125, 564, 2,027, 2,322,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4,361, 6,557, 9,416 และ 23,130 คู่เบส) (Promega, USA)

3.2.4.2 100 bp Ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 และ 1,500 คู่เบส) (Promega, USA)

### 3.2.5 เคมิภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ

3.2.5.1 อะกาโรส (agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)

3.2.5.2 เจลสตาร์ (gelstar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)

3.2.5.3 ดีโออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) (Promega, USA)

3.2.5.4 สีย้อมดีเอ็นเอ (tracking dye) (ซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์, โบรโมฟินอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์, Tris-boric-EDTA 1 เท่า)

3.2.5.5 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์)

3.2.5.6 บัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์)

3.2.5.7 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) (Merck, Germany)

3.2.5.8 ไลโซไซม์ (lysozyme)

3.2.5.9 โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate)

3.2.5.10 ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ Tris-EDTA (TE-buffer saturated phenol)

3.2.5.11 คลอโรฟอร์ม (CHCl<sub>3</sub>)

3.2.5.12 ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamylalcohol)

3.2.5.13 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.5.14 เอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์

### 3.2.6 ชุดทดสอบ (kit)

3.2.6.1 ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany)

### 3.2.7 เคมิภัณฑ์สำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase activity)

3.2.7.1 O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside (ONPG) (Sigma Aldrich, Germany)

3.2.7.2 บัฟเฟอร์ Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.06 โมลาร์, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 0.04 โมลาร์, KCl 0.01 โมลาร์, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.001 โมลาร์,  $\beta$ -mercaptoethanol 0.05 โมลาร์)

3.2.7.3 คลอโรฟอร์ม (CHCl<sub>3</sub>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.7.4 โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

## 3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) Olympus, UFX-DX, Japan
- 3.3.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) Hirayama, Hiclave HV-50, Japan
- 3.3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Hermle, Z383K, Germany
- 3.3.4 ตู้เป่าเชื้อ (laminar flow) ISSCO, HS123, Thailand
- 3.3.5 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (incubator shaker) Gallenkamp, T490188, UK
- 3.3.6 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubator) Scientific promotion, Binder control, Japan
- 3.3.7 เครื่องผสมสาร (vortex) Genies 2, USA
- 3.3.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Shimadzu, UV-1601, Japan
- 3.3.9 คิวเวต (semimicro rectangular 10 mm) Hellma, USA
- 3.3.10 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) Perkin Elmer, DNA thermal cycler 480, USA
- 3.3.11 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment) Pharmacia, GNA100, Sweden
- 3.3.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) Cyberscan, 2000, Singapore
- 3.3.13 เครื่องให้กระแสไฟฟ้า (power supply) Bio-Rad, model 1000, USA
- 3.3.14 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองขนาดเล็ก (thermo-block) Biosan, TDB-120 Thermostat, Germany
- 3.3.15 ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพอะกาโรสเจล (documentation gel analysis) Syngene, BTS-20-M Germany
- 3.3.16 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 3.3.17 เครื่องแก้วต่างๆ (glasswares)

## 3.4 สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5 วิธีการศึกษา

#### 3.5.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล

ทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียโดยใช้ฟองน้ำชนิดเซลลูโลสที่มีขนาด 125 ลูกบาศก์เซนติเมตร (5 ซม.×5 ซม.×5 ซม.) เป็นตัวค้ำจุน และมีอาหารคัดเลือกสูตร MA (ภาคผนวก ก1) จุ่มในน้ำทะเลบริเวณแหลมแท่น ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เป็นระยะเวลา 6 วัน เมื่อนำตัวค้ำจุนซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Marine agar ขึ้นจากน้ำทะเลแล้วตัดชิ้นฟองน้ำออกให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (1 ซม.×1 ซม.×1 ซม.) จากนั้นนำชิ้นฟองน้ำที่ตัดใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 30 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MB (ภาคผนวก ก1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กระจายเซลล์ออกจากชิ้นฟองน้ำด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 วินาที ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างในอัตราส่วน  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  และ  $10^{-3}$  แล้วนำ 100 ไมโครลิตรมา spread บนอาหารแข็งสูตร MA ในอัตราการเจือจางละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 14 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ โดยนำเข็มเย็บเชื้อที่ผ่านการลนไฟมาแตะเชื้อและเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 14 ชั่วโมง เมื่อแบคทีเรียเจริญจึงทำซ้ำตามขั้นตอนข้างต้นจนกระทั่งได้เซลล์เดี่ยว แล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MB ต่อไป

#### 3.5.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

##### 3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิติลโฮโมเซอรินแลคโตน

นำเชื้อแบคทีเรีย 1 โคลโลนีที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3.5.1 มาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที และเก็บส่วนใส (supernatant) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

##### 3.5.2.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *A. tumefaciens* A136

นำเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 จำนวน 1 โคลโลนี มาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และมียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลินและสเปกโตมิซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4.5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารตามลำดับ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

### 3.5.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตน

#### 3.5.3.1 การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตน

โดยวิธี cross streak assay

தாகเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ที่มีสาร X-Gal ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของอาหาร โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ IFO3310 เป็น positive control, *A. tumefaciens* สายพันธุ์ KYC6 เป็น negative control และ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 เป็น reporter strain ดังแสดงในรูปที่ 3.1 บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตนโดยวิธี cross streak assay

#### 3.5.3.2 การทดสอบแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอร์รินแลคโตน

โดยวิธีวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase activity)

เก็บเซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงดังในข้อที่ 3.5.2.2 โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสแล้วกระจายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AT (ภาคผนวก ก3) ที่มียาปฏิชีวนะเตตระซัยคลิน และสเปกตินอัมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4.5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรของอาหาร ตามลำดับ นำเซลล์ที่ได้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว

คลื่น 600 นาโนเมตร ระหว่าง 0.4 ถึง 0.5 ปีเปิดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เดิม ส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังในข้อ 3.5.2.3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง จากนั้น นำเชื้อมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และบันทึกผล ปีเปิดเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ แล้วเติมบัฟเฟอร์ Z (โคโคเดียมไฮโดรเจน ฟอสเฟต 0.06 โมลาร์, โซเดียมโคโคเดียมฟอสเฟต 0.04 โมลาร์, โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.001 โมลาร์, เมต้าเมอแคปโตเอธานอล 0.05 โมลาร์) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และโซเดียมโดเดคซิล ซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลาย O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside (ONPG) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้แล้วเริ่มจับ เวลาจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียม คาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงของ สารละลายที่ความยาวคลื่น 420 และ 550 นาโนเมตร ตามลำดับ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มา หากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989)

### 3.5.4 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน

#### 3.5.4.1 การทดสอบโดยการย้อมสีแกรม

เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนในหยดน้ำที่อยู่ บนสไลด์ ตรึงเชื้อด้วยความร้อน หยดสี crystal violet ให้ทั่วมรอยเชื้อและทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างสี ออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน จากนั้นหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ทั่วมรอยเชื้อและทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างน้ำยาไอโอดีนด้วยน้ำแล้วตามด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 20 วินาที หยดสี safranin ทิ้ง ไว้นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ ตรวจสอบผลรูปร่างและสีแกรมของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์

#### 3.5.4.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้ลงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อสูตร LB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง ทำการสกัดจีโนมิค ดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน

### 3.5.4.2.1 การสกัดจีโนมคิตีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรีย 1 loop มากระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ที่มี lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายฟีนอลที่อิมัตว์ด้วยบัฟเฟอร์ TE 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมา ปั่นเหยียงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ถึง 5 นาที ดูดส่วนใสขึ้นบนมาสักครั้ง 3 ครั้ง ดูดส่วนใสมาเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ 0.1 เท่าของปริมาตร และเติมเอธานอลความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำหลอดทดลองมาปั่นเหยียงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ คั่วหลอดลงบนกระดาษจนกระทั่งตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNaseA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สกัดด้วยฟีนอลที่อิมัตว์ด้วยบัฟเฟอร์ TE ตามด้วยฟีนอลต่อคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) และคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอลความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ล้างตะกอนด้วยเอธานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ดีเอ็นเอแห้งและละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอะกาโรส 0.64 กรัม เติบบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทำให้ละลายในไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่น เติมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นจึงเทใส่แม่พิมพ์เจล เมื่อแผ่นเจลแข็ง ย้ายแผ่นเจลลงอ่าง (gel chamber) เติบบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล หยอดดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาที่ผสมสีย้อมลงไป ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลไปดูส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

### 3.5.4.2.3 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน 16S rDNA

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอต ที่ได้รับการตีพิมพ์มาเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) จากโปรแกรม MultAlign (multiple sequence alignment by Florence Corpet) เลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันใน

ช่วงต้นและช่วงท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้สร้างไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ไปใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกลูกโซ่ต่อไป

#### 3.5.4.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่

วิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลองโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบเป็นลูกโซ่ และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5	ไมโครลิตร
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 10 มิลลิโมลาร์	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 1 (upstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ตัวที่ 2 (downstream primer) 5 มิลลิโมลาร์	2.5	ไมโครลิตร
จีโนมดีเอ็นเอ 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	2	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) 25 มิลลิโมลาร์	3	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	33.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	50.0	ไมโครลิตร

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 4 ขั้นตอน ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสดังในข้อที่ 3.5.4.2.2 และแยกแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ต่อไป

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	5 นาที
2	94	30 วินาที } 30 รอบ
	55	
	72	
3	72	10 นาที
4	20	$\alpha$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5.4.2.5 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

หลังจากวิเคราะห์ขนาดและปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เดิมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด หลังจากที่เจลละลายเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน นำ QIAquick spin column ใส่ลงใน collection tube ปิดฝาและปล่อยให้ดีเอ็นเอลงใน QIAquick spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เดิมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้าย QIAquick spin column ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ เดิมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลิตภัณฑ์ PCR ที่แยกได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5.4.2.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer แล้วเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

### 3.5.4.3 การทดสอบการเจริญบน Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar)

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอโมเซอร์รินแลคโตนลงบนอาหารแข็งสูตร TCBS (ภาคผนวก ก4) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

### 3.5.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin salt agar (GS)

เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอสซีไอโมเซอร์รินแลคโตนลงบนอาหารแข็งสูตร GS (ภาคผนวก ก5) มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 30, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง

### 3.5.6 การผลิตโม่เลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนระหว่างการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตโม่เลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้สูงสุดตามวิธีในข้อที่ 3.5.2.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใส (supernatant) ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ดังในข้อที่ 3.5.3.2

### 3.5.7 ผลของกัลโคสต่อการเจริญและการผลิตโม่เลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตน

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตโม่เลกุลสัณญาณเอซิดโฮโมเซอรินแลคโตนได้สูงสุดมาเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เติมน้ำตาลละลายกัลโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ของการเพาะเลี้ยง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทุก 1 ชั่วโมง และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสดังในข้อที่ 3.5.3.2

## บทที่ 4

### ผลลัพธ์และอภิปรายผล

จากการศึกษาโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอรินแลคโตนของแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากน้ำทะเล โดยทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณแหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี เป็นระยะเวลา 6 วัน และใช้ฟองน้ำชนิดเซลลูโลสเป็นตัวกักจับและอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เป็นอาหารคัดเลือก ทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นจึงนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้นต้นด้วยเทคนิค cross streak assay โดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ A136 เป็น reporter strain คัดเลือกเชื้อที่แสดงผลบวก (positive) มาทดสอบการผลิตและปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอรินแลคโตนในรูปแบบของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอรินแลคโตนได้แล้ว จึงทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกร่วมด้วยเทคนิคทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จากนั้นศึกษารูปแบบของการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอรินแลคโตน เปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล

จากการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณบ้านแหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี (รูปที่ 4.1 ก) เป็นระยะเวลา 6 วัน โดยใช้ฟองน้ำชนิดเซลลูโลสเป็นตัวกักจับ (รูปที่ 4.1 ข) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เป็นอาหารคัดเลือก โดยใช้เชือกผูกตัวกักจับให้ลอยอยู่ระดับผิวน้ำทะเลตลอดระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง (รูปที่ 4.1 ค) ทำการคัดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ ดังวิธีในข้อที่ 3.5.1 พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ได้ จึงคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันได้ทั้งสิ้น 82 ไอโซเลท ตั้งชื่อและศึกษาลักษณะภายนอกของโคโลนีในแต่ละไอโซเลท ลักษณะของโคโลนีแสดงในภาคผนวก ข จากการศึกษาลักษณะโคโลนีพบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 82 ไอโซเลท มีลักษณะภายนอกของโคโลนีที่แตกต่างกันเมื่อมองด้วยตาเปล่า และเมื่อวิเคราะห์จากรูปร่างของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ โคโลนีกกลม รูปร่างไม่แน่นอน และโคโลนีแผ่กระจาย นอกจากรูปร่างของโคโลนีที่แตกต่างกันแล้ว สีของโคโลนียังมีความแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่จะพบโคโลนีสีขาว สีครีม และสีเหลืองนวล มีเพียงบางไอโซเลทเท่านั้นที่มีสีของโคโลนีแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด เช่น สีแดง หรือสี



ก

ข

ค

รูปที่ 4.1 สถานที่เก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล บ้านแหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี (ก), ตัวล้าจุนฟองน้ำชนิดเซลลูโลส (ข) และลักษณะการผูกตัวล้าจุนขณะทำการเก็บตัวอย่าง (ค)

ชมพู จากผลข้างต้นบ่งชี้ว่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ในปี ค.ศ. 1989 Fuhrman และคณะรายงานว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลมีปริมาณมากถึง  $10^9$  ถึง  $10^{10}$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรของน้ำทะเล แบคทีเรียที่พบในน้ำทะเลนั้นมีหลายชนิด เช่น *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Sarcina* sp., *Spirillum* sp. และ *Vibrio* sp. ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่อาศัยในน้ำทะเล ได้แก่ ความเค็ม ความลึก ความเป็นกรดด่าง และสารอาหาร ในน้ำทะเล เป็นต้น (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534)

ในการศึกษานี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ในการเก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเล ซึ่งพบว่า เชื้อราที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเลสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ได้ แต่ไม่พบแพลงก์ตอนสัตว์ เนื่องจากแพลงก์ตอนสัตว์ไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA ได้ ไม่พบแพลงก์ตอนพืชและไซยาโนแบคทีเรีย เนื่องจากแพลงก์ตอนพืชและไซยาโนแบคทีเรียต้องการธาตุอาหารนอกเหนือจากที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เช่น แมงกานีส สังกะสี โคบอลต์ ฯลฯ ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA จึงอาจจะไม่เหมาะสมต่อการคัดแยกแพลงก์ตอนพืชและไซยาโนแบคทีเรีย นอกจากนี้ ระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในทะเลได้ โดยในการเก็บตัวอย่าง ทำในเดือนสิงหาคมซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน มีฝนตกประปราย มีเมฆมากและแสงแดดน้อย ทำให้แพลงก์ตอนพืชและไซยาโนแบคทีเรียได้รับแสงที่มีความเข้มต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมเพื่อใช้ในขบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) จึงทำให้มีการเจริญเติบโตช้าและมีปริมาณน้อย สำหรับสถานที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างนั้นเป็นบริเวณที่มีสาหร่ายเกาะ ทำให้สะดวกต่อการผูกตัวล้าจุนเพื่อเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลได้ง่าย และเป็นบริเวณที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับน้ำไม่ตื้นหรือลึกจนเกินไป จึงน่าจะเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในทะเล รวมทั้งแบคทีเรียที่อาศัยในน้ำทะเล

การเก็บตัวอย่างและคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลในการศึกษานี้ สามารถคัดแยกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลและทำให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จำนวน 82 ไอโซเลท จากนั้นจึงนำตัวอย่างแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ทั้ง 82 ไอโซเลท ไปทำการทดสอบความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนต่อไป

#### 4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน สามารถทำได้โดยการทดสอบกับแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ A136 ที่เป็น reporter strain ซึ่งมี 2 วิธีคือ cross streak assay และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

วิธี cross streak assay เป็นวิธีที่ใช้คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยดูจากการเกิดสีฟ้าในแบคทีเรียที่เป็น reporter strain *A. tumefaciens* A136 ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 มียีน *luxR* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีน LuxR ทำหน้าที่เป็นรีเซพเตอร์ ยีน *luxR* จะอยู่ติดกับโปรโมเตอร์ (promotor) ของ *lacZ* แต่ภายในเซลล์ขาดยีน *luxI* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์โมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน จึงไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ (Fuqua and Winans, 1996) เมื่อรีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ได้รับโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจากภายนอกเซลล์ หรือจากตัวอย่างแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ จะมีกลไกไปกระตุ้นการทำงานของ *lacZ* ให้ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ออกมาย่อยสาร X-gal ที่อยู่ในอาหารที่ใช้ทดสอบ ส่งผลให้เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 เป็นสีฟ้า

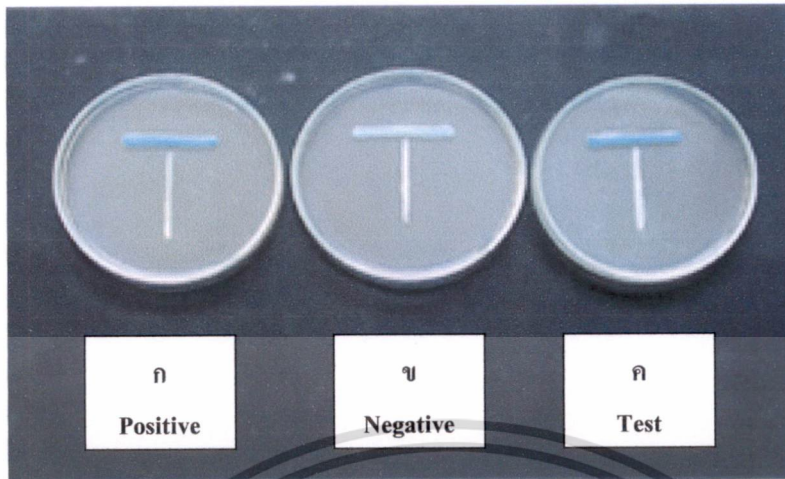
เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้เป็น reporter enzyme ในการติดตามและศึกษาการแสดงออกของยีน และใช้ศึกษาคุณสมบัติของโปรโมเตอร์ โดยการรวมโปรโมเตอร์ที่สนใจเข้ากับยีนของเบต้ากาแลคโตซิเดส วิธีการหากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ทำได้โดยวัดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารสีเหลืองของ Nitrophenol จากการย่อยสารตั้งต้น ONPG (Ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีด้วยเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุคมวรภณท์, 2536) ปฏิกริยาเกิดขึ้นดังสมการ



วิธีการวัดโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในรูปแบบของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเป็นการวัดโมเลกุลสัญญาณในเชิงปริมาณ และสามารถบอกได้ว่าการผลิตโมเลกุลสัญญาณมากหรือน้อย แตกต่างจากวิธี cross streak assay ซึ่งเป็นการวัดโมเลกุลสัญญาณในเชิงคุณภาพ จึงสามารถบ่งบอกได้เพียงว่ามีหรือไม่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนเท่านั้น วิธี cross streak assay จึงเหมาะที่จะใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในเบื้องต้น

#### 4.2.1 การคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยวิธี cross streak assay

จากการนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่บริสุทธิ์ทั้ง 82 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay โดยนำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาลากตั้งฉากกับ *A. tumefaciens* A136 บนอาหาร MA ที่มี X-gal และสังเกตการเกิดสีฟ้าของเชื้อ *A. tumefaciens* A136 ผลที่ได้แสดงเครื่องหมายดังนี้ เมื่อไม่เกิดสีฟ้าแสดงผลเป็น - เมื่อเกิดสีฟ้าน้อยมากแสดงผลเป็น + เมื่อเกิดสีฟ้าน้อยแสดงผลเป็น ++ เมื่อเกิดสีฟ้าปานกลางแสดงผลเป็น +++ เมื่อเกิดสีฟ้ามากแสดงผลเป็น ++++ และเมื่อเกิดสีฟ้าเข้มแสดงผลเป็น +++++ พบว่า ตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 82 ไอโซเลท มีลักษณะการเกิดสีฟ้าของ *A. tumefaciens* A136 ที่แตกต่างกัน โดยสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้า จำนวน 28 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้าน้อยมากถึงปานกลาง จำนวน 39 ไอโซเลท และกลุ่มที่ 3 ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้ามากถึงสีฟ้าเข้ม จำนวน 15 ไอโซเลท (ภาคผนวก ข) จากการทดสอบกับแบคทีเรียที่เป็น positive control *Escherichia coli* IFO3310 พบว่า *E. coli* IFO3310 ทำให้เกิดสีฟ้าเข้มที่ *A. tumefaciens* A136 (รูปที่ 4.2 ก) ในขณะที่แบคทีเรียที่เป็น negative control *A. tumefaciens* KYC6 ไม่ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้า (รูปที่ 4.2 ข) และเมื่อทดสอบกับไอโซเลท C-011 พบว่า ไอโซเลท C-011 ทำให้เกิดสีฟ้าเข้มที่ *A. tumefaciens* A136 เช่นเดียวกับ positive control (รูปที่ 4.2 ค)



**รูปที่ 4.2** การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay และลักษณะการเกิดสีฟ้าของ *A. tumefaciens* A136 เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียที่เป็น positive control *E. coli* IFO3310 (ก), แบคทีเรียที่เป็น negative control *A. tumefaciens* KYC6 (ข) และตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-011 (ค)

ตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลกลุ่มที่ 1 จำนวน 28 ไอโซเลท ไม่ทำให้เกิดสีฟ้าที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 แสดงว่ารีเซพเตอร์ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ไม่ได้รับโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตน จึงไม่มีการกระตุ้นการทำงานของ *lacZ* และไม่มีการผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสออกมาย่อยสาร X-gal ดังนั้นตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มนี้จึงจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนได้

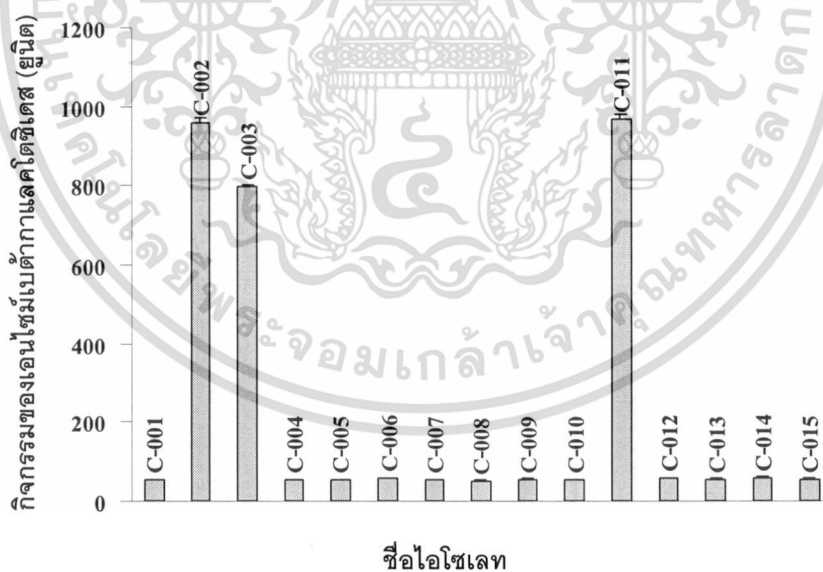
ตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มที่ 2 จำนวน 39 ไอโซเลท ทำให้เกิดสีฟ้าอ่อนที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ส่วนตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มที่ 3 จำนวน 15 ไอโซเลท ทำให้เกิดสีฟ้าเข้มที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 เนื่องจากใช้เวลาในการบ่มเชื้อเท่ากัน สีฟ้าที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ที่มีความเข้มของสีแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนในแบคทีเรียกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 น่าจะเกิดจากปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนที่ผลิตจากตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 มากกว่าจากตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มที่ 2 อย่างไรก็ตาม ผลการคัดเลือกด้วยวิธี cross streak assay เป็นเพียงการทดสอบขั้นพื้นฐานเชิงคุณภาพ ไม่สามารถให้ผลในเชิงปริมาณได้ และอาจจะเกิดความผิดพลาดได้จากการที่ *A. tumefaciens* A136 อาจมีความว่องไวต่อ X-gal ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดสีฟ้าที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ได้ โดยที่ไม่ได้รับโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอร์รินแลคโตนจากภายนอกเซลล์ ดังนั้นจึงทำการเลือกตัวอย่างแบคทีเรียใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 ทั้ง 15 ไอโซเลท ซึ่งคาดว่าสามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ ไปทำการทดสอบความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยทดสอบกับ reporter strain *A. tumefaciens* A136 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่ผลิตขึ้นต่อไป

#### 4.2.2 การคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส

จากการนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลกลุ่มที่ 3 จำนวน 15 ไอโซเลท ที่ได้จากการคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเล ที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน ด้วยวิธี cross streak assay มาทดสอบความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่า มีตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลเพียง 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 เท่านั้น ที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ โดยมีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส 955, 797 และ 967 ยูนิต ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) ไอโซเลท C-002 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสใกล้เคียงกับ ไอโซเลท C-011 ในขณะที่ไอโซเลท C-003 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสต่ำกว่าไอโซเลททั้งสอง



รูปที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลในกลุ่มที่ 3 จากการคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay

กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่พบในไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 สูงกว่าตัวอย่างแบคทีเรีย 12 ไอโซเลทที่เหลือ ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในระดับต่ำ ผลการคัดเลือกด้วยวิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่ได้นี้ แตกต่างจากผลที่ได้จากการคัดเลือกด้วยวิธี cross streak assay ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 ทั้ง 15 ไอโซเลท เกิดสีฟ้าเข้มที่ *A. tumefaciens* A136 แต่เมื่อทดสอบด้วยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสกลับพบว่า มีเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้นที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจเกิดจาก *A. tumefaciens* A136 มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับสาร X-gal บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการทดสอบด้วยวิธี cross streak assay

สาเหตุที่คัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้เพียง 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 82 ไอโซเลท อาจเนื่องมาจากตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างนั้น มีทั้งที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 แบบนี้จะให้โมเลกุลสัญญาณที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมลบอาศัยสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในการสื่อสารระหว่างเซลล์ (Fuqua *et al.*, 1994) แต่แบคทีเรียแกรมบวกอาศัยสัญญาณเปปไทด์ขนาดเล็ก (Dunny and Leonard, 1997) ดังนั้นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวนหนึ่งจะไม่ส่งผลให้เกิดสีฟ้าที่เซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 และไม่สามารถวัดปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งคือ *A. tumefaciens* A136 อาจมีความจำเพาะกับบางโครงสร้างของสายโซ่เอซิลเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจไม่สามารถตรวจสอบโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนบางโครงสร้างที่ผลิตจากบางไอโซเลทได้ นอกจากนี้การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆหลายประการ ได้แก่ ชนิดของแบคทีเรียชนิดของอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ดังนั้นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้เพียง 3 ไอโซเลท อาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการเก็บส่วนไลเพื่อวิเคราะห์ไม่เหมาะสม ทำให้มีปริมาณโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนปริมาณน้อย รีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์ของ *A. tumefaciens* A136 ไม่สามารถตรวจวัดได้หรือตรวจวัดได้เพียงเล็กน้อย

การคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในการศึกษานี้ด้วยวิธี cross streak assay และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโต-

ซีเดส สามารถคัดเลือกตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในปริมาณสูงได้ทั้งสิ้น 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 จากนั้นจึงนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลทไปศึกษาลักษณะรูปร่างและชนิดของแบคทีเรียต่อไป

#### 4.3 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

##### 4.3.1 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียและการติดสีแกรม

จากการนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 มาย้อมแกรม ดังวิธีในข้อที่ 3.5.4.1 พบว่าตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท มีผนังเซลล์ติดสีแดงของ safranin แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ รูปร่างโค้งงอ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานที่ว่าแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้นที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนได้ (Fuqua *et al.*, 1994; Bassler, 1999; De Kievit and Iglewski, 2000; Parsek and Greenberg, 2000)

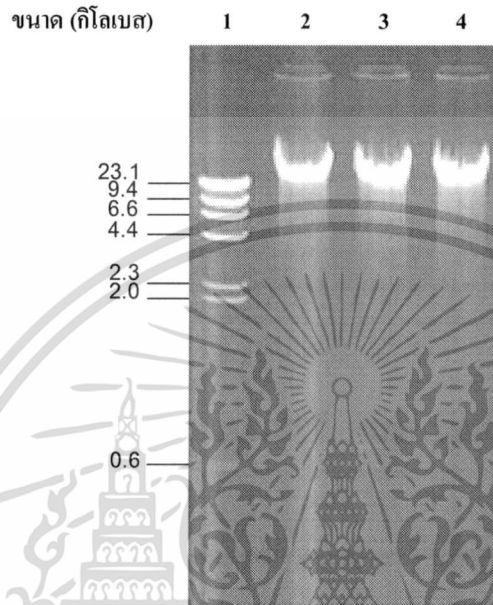
##### 4.3.2 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เพื่อจัดจำแนกชนิดของตัวอย่างแบคทีเรียทำได้โดยสกัดจีโนมดีเอ็นเอของตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 แล้ววิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำการออกแบบไพรเมอร์ของยีน 16S rDNA จากนั้นเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 600 คู่เบส ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>R</sup> 3700 DNA Analyzer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นด้วยโปรแกรม Blast server

##### 4.3.2.1 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011

จากการเพาะเลี้ยงไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน ทำการสกัดจีโนมดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ครั้งที่ 8

โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง คำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่า แแถบจีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 ที่สกัดได้มีเพียงแถบเดียวโดยอยู่เหนือระดับของแถบดีเอ็นเอขนาด 23.1 กิโลเบส จีโนมิกดีเอ็นเอของทั้งสามไอโซเลทมีปริมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณสูง



รูปที่ 4.4 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 จากการแยกด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา ( $\lambda$ ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III เลน 2-4 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 ตามลำดับ

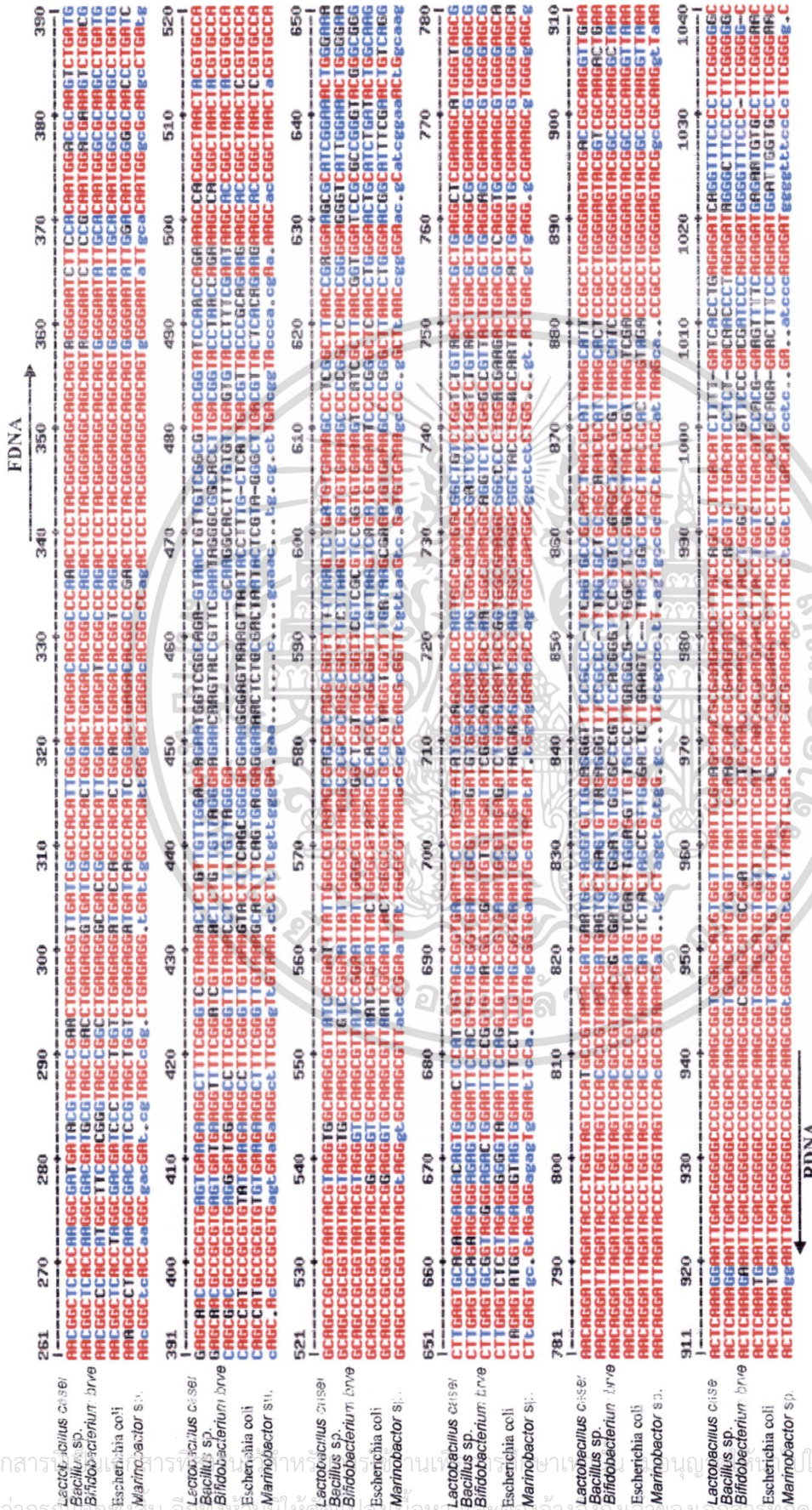
#### 4.3.2.2 การออกแบบไพรเมอร์ของยีน 16S rDNA

การออกแบบไพรเมอร์ของยีน 16S rDNA เริ่มจากทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอตชนิดต่างๆ ที่มีรายงานฐานข้อมูลของธนาคารยีน โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Lactobacillus casei*, *Bacillus* sp. และ *Bifidobacterium brve* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Marinobactor* sp. คัดเลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 2 บริเวณ (ช่วงต้นและช่วงท้าย) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงต้นมาออกแบบไพรเมอร์ด้านปลาย 5' ระหว่างตำแหน่งที่ 339 ถึง 356 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAG-3' ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า FDNA (รูปที่ 4.5) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงท้ายมาออกแบบไพรเมอร์ด้านปลาย 3' ระหว่าง

ตำแหน่งที่ 921 ถึง 940 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-TTGTGCGGGCCCCGTC AAT-3' ให้ชื่อไพรเมอร์ว่า RDNA (รูปที่ 4.5) ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบทั้ง FDNA และ RDNA เป็นไพรเมอร์ที่คัดเลือกจากทั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวกและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันสูง จึงน่าจะเป็นไพรเมอร์ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้ง 2 ด้าน ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011

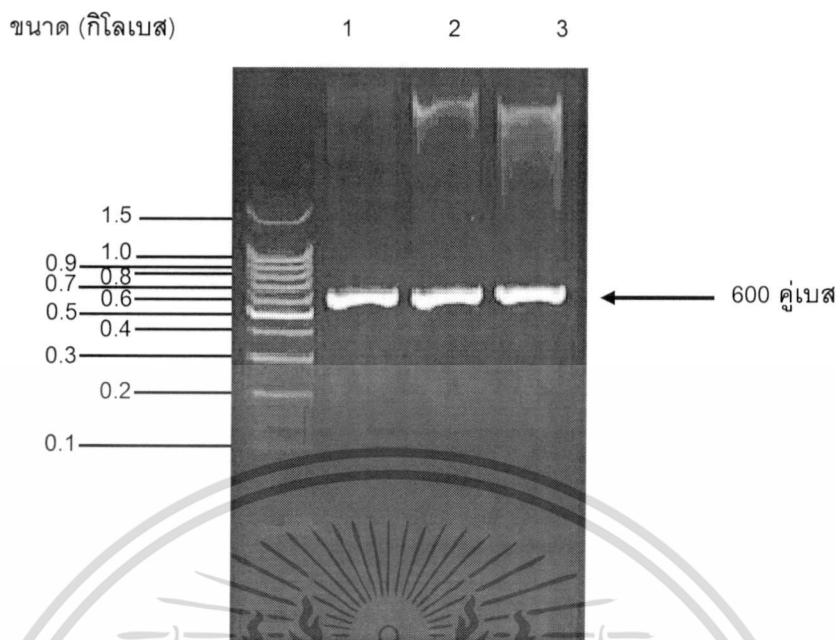
#### 4.3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา PCR รวมทั้งไพรเมอร์ FDNA และ RDNA แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) โดยใช้อุณหภูมิของการจับตัว (annealing) ที่ 55 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้ง 3 ไอโซเลท 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (รูปที่ 4.6) ซึ่งตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับ 600 คู่เบส จึงได้ทำการแยกแถบผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (Qiagen, Germany) แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไทป์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้งสามไอโซเลทจาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 DNA Analyzer เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน โดยใช้โปรแกรม Blast server



**รูปที่ 4.5** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ *Lactobacillus casei*, *Bacillus* sp., *Bifidobacterium breve*, *Escherichia coli* และ *Marinobacter* sp.

ตัวอักษรสีแดง, สีน้ำเงิน และสีดำแสดงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน, คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกัน ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA

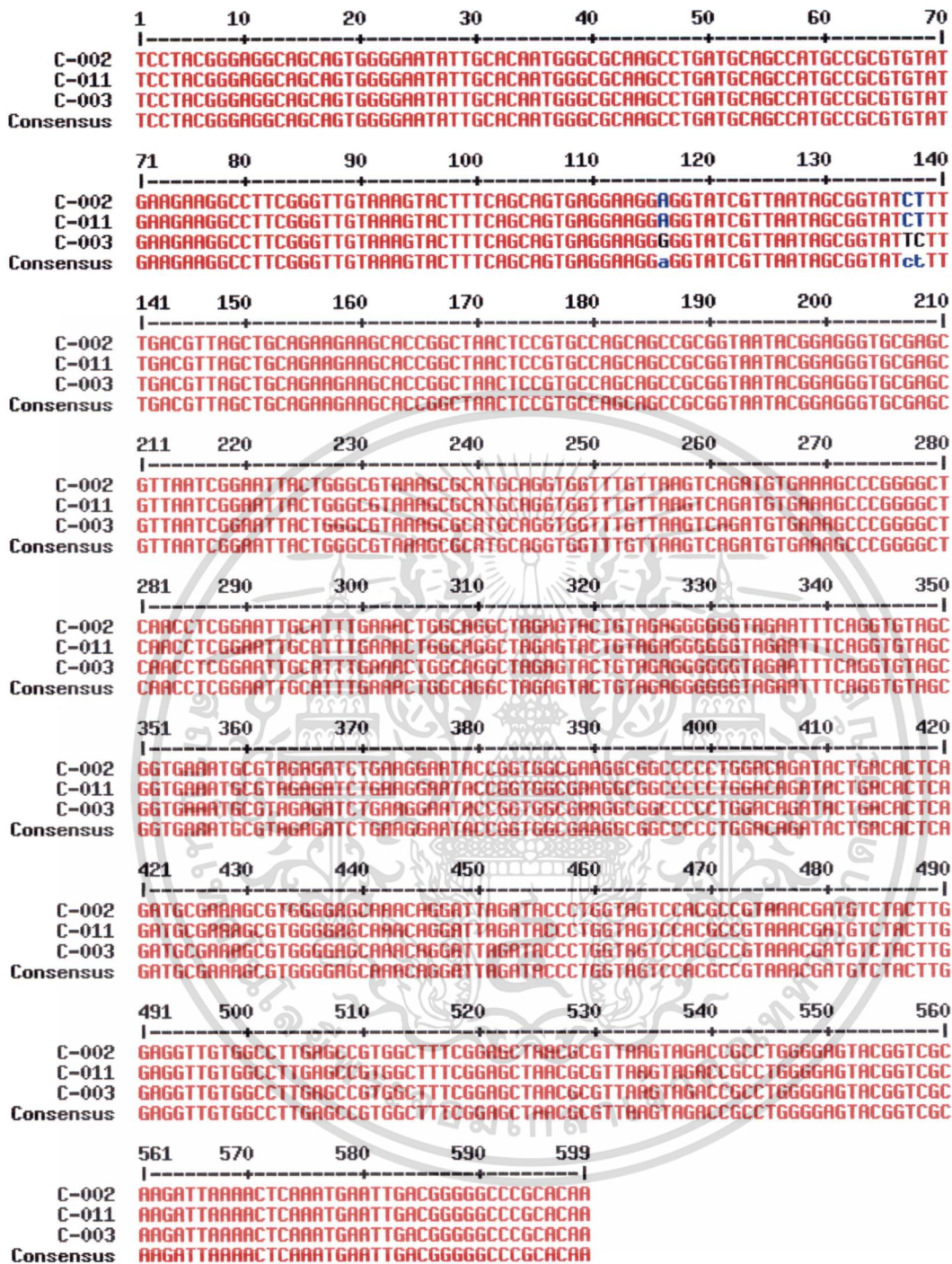
เลน 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

เลน 2 คือ ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-002

เลน 3 คือ ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-003

เลน 4 คือ ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-011

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท C-002 และไอโซเลท C-011 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เหมือนกันทั้งหมด และมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากไอโซเลท C-003 เพียง 3 เบส จึงอาจเป็นไปได้ว่าทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียในสกุลเดียวกัน โดยไอโซเลท C-002 และ C-011 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 599 คู่เบสของแต่ละไอโซเลทกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 599 คู่เบส ของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

ไอโซเลท	สายพันธุ์แบคทีเรีย	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
C-002 และ C-011	<i>Vibrio fluvialis</i> (NCTC 11327T)	100
	<i>Vibrio fluvialis</i> (ATCC 33809T)	99
	<i>Vibrio furnissii</i> (ATCC 35016T)	99
	<i>Vibrio corallilyticus</i>	98
C-003	<i>Vibrio furnissii</i> (ATCC 35016T)	99
	<i>Vibrio fluvialis</i> (NCTC 11327T)	99
	<i>Vibrio metschnikovii</i> (NCTC 11170)	98
	<i>Vibrio tubiashi</i> (ATCC 19109T)	98

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* sp. โดยไอโซเลท C-002 และไอโซเลท C-011 จัดเป็นแบคทีเรีย *Vibrio fluvialis* สำหรับไอโซเลท C-003 จัดเป็นแบคทีเรีย *Vibrio furnissii* หรือ *Vibrio fluvialis* เนื่องจากมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เท่ากัน (99 เปอร์เซ็นต์) เป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน หรือสามารถส่งสัญญาณควอรัมเซนซิงได้เมื่อประชากรแบคทีเรียมีความหนาแน่นสูง ระบบควอรัมเซนซิงค้นพบครั้งแรกว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการเรืองแสงของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเล *V. fischeri* (Eberhard *et al.*, 1981; Engebrecht *et al.*, 1983) และเป็นแบบอย่างในการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงในปัจจุบัน *V. fischeri* เป็นแบคทีเรียแกรมลบอาศัยแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) ร่วมกับปลาและปลาหมึก หรืออยู่แบบอิสระในน้ำทะเล เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นสูงจะเกิดการเรืองแสงโดยขึ้นอยู่กับการสะสมโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน (Eberhard *et al.*, 1981) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียสกุล *Vibrio* สายพันธุ์อื่น ได้แก่ *V. harveyi* (Bassler *et al.*, 1993) *V. anguillarum* (Milton *et al.*, 1997) และ *V. cholerae* (Zhu *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอหิวาตกโรคในปัจจุบันนี้นอกจาก *Vibrio* ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่กล่าวมาแล้ว ยังไม่พบรายงานการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจาก *Vibrio* สายพันธุ์อื่นๆ

เพื่อเป็นการยืนยันว่าแบคทีเรียจากน้ำทะเลที่คัดเลือกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Vibrio* จึงนำตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar) ต่อไป

#### 4.3.3 การศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar)

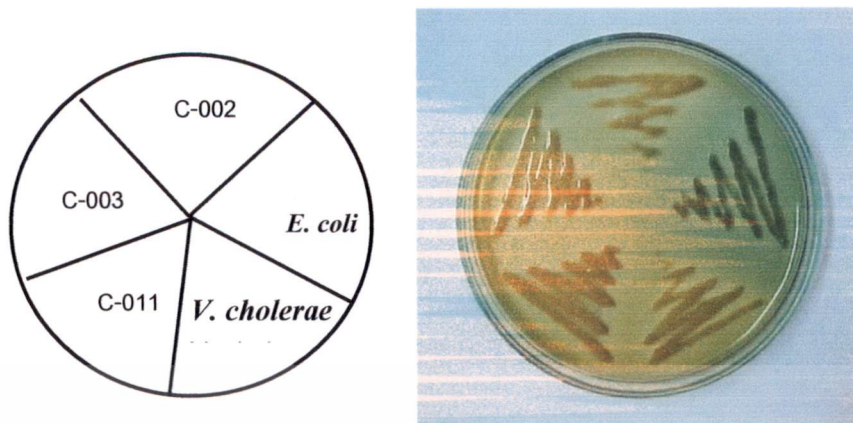
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TCBS เป็นอาหารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการแยกเชื้อกลุ่ม *Vibrio* sp. ซึ่งมีหลักการคือ ในอาหารสูตร TCBS ประกอบด้วยสารไทโอซัลเฟต (thiosulfate), ซิเตรท (citrate) ที่มีความเข้มข้นสูงและมีความเป็นกรดสูงซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะไปมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อส่วนใหญ่ที่อยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ประกอบด้วยเชื้อ coliform และ proteus นอกจากนี้สารออกซ์ไบล (oxbile) และคลอเลท (cholate) ยังยับยั้งการเจริญระยะแรกของ Enterococci แบคทีเรียในกลุ่ม coliform บางชนิดสามารถเจริญได้แต่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้ แต่แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ทั้งหมด สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ ทำให้เกิดการกรดและเปลี่ยนสีของไทมอลบลู (thymol blue) และโบรโมไทมอลบลู (bromothymol blue) เป็นสีเหลือง (Kobayashi *et al.*, 1963)

จากการเขี่ยตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยมี *V. cholerae* เป็น positive control และ *E. coli* เป็น negative control พบว่าโคโลนีของไอโซเลท C-002, C-003 C-011 และ *V. cholerae* มีสีเหลือง ในขณะที่โคโลนีของ *E. coli* มีสีเขียว (รูปที่ 4.8) ผลการทดลองที่ได้สามารถสนับสนุนผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 ว่าทั้งสามไอโซเลทเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุล *Vibrio* และสามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ ทำให้เกิดการกรด และเกิดการเปลี่ยนสีของไทมอลบลูและโบรโมไทมอลบลูเป็นสีเหลืองเหมือนกับ *V. cholerae* สำหรับ *E. coli* ซึ่งเป็น negative control โคโลนีเกิดสีเขียวเนื่องจากไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ จึงไม่เกิดการกรดและไม่เกิดการเปลี่ยนสีไทมอลบลูและโบรโมไทมอลบลู ทำให้โคโลนีมีสีเขียว

#### 4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของไอโซเลท

##### C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin Salt Agar (GS)

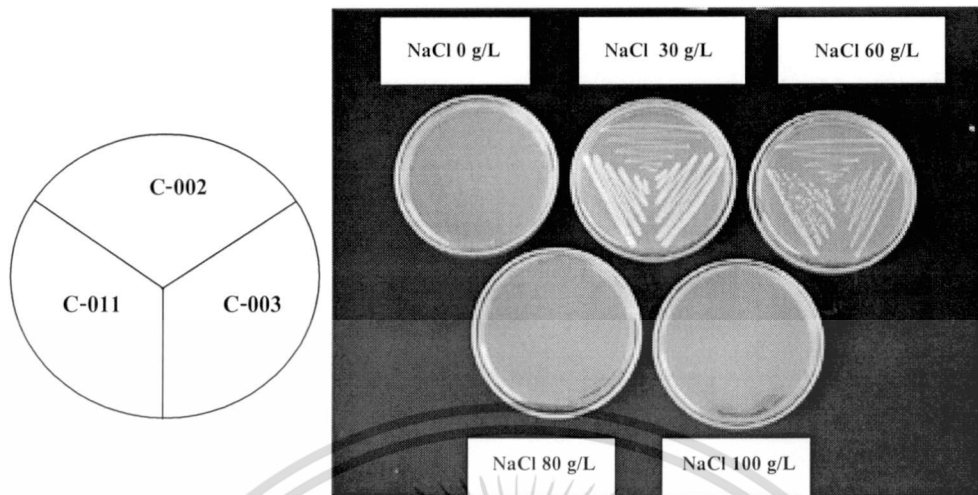
อาหารเลี้ยงเชื้อ GS เป็นอาหารที่ใช้ในการศึกษาคูณลักษณะของแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม โดยดูจากความสามารถในการเจริญบนอาหาร GS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (Simpson *et al.*, 1987) จากการเขี่ยเชื้อตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ C-002, C-003 และ C-011 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 30, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3



รูปที่ 4.8 การเจริญของไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar)

ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 30 และ 60 กรัมต่อลิตร โดยจะเจริญดีที่สุดบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 30 และ 60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ได้ (รูปที่ 4.9)

ตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 ไม่สามารถเจริญบนอาหาร GS ที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ แสดงว่าทั้ง 3 ไอโซเลทต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญเติบโต จากการตรวจสอบเอกสาร พบว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเล (Marine bacteria) ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำกว่า 1.5 กรัมต่อลิตร แต่จะเจริญได้ดีบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 30 กรัมต่อลิตร (Guan and Kamino, 2001) เนื่องจากไอโซเลททั้งสามไม่สามารถเจริญบนอาหาร GS ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ จึงจัดไอโซเลททั้งสามเป็น Marine bacteria นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 30 และ 60 กรัมต่อลิตร จึงจัดเป็น Halophilic vibrio แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหาร GS มากกว่า 60 กรัมต่อลิตร จะมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และตายในที่สุด



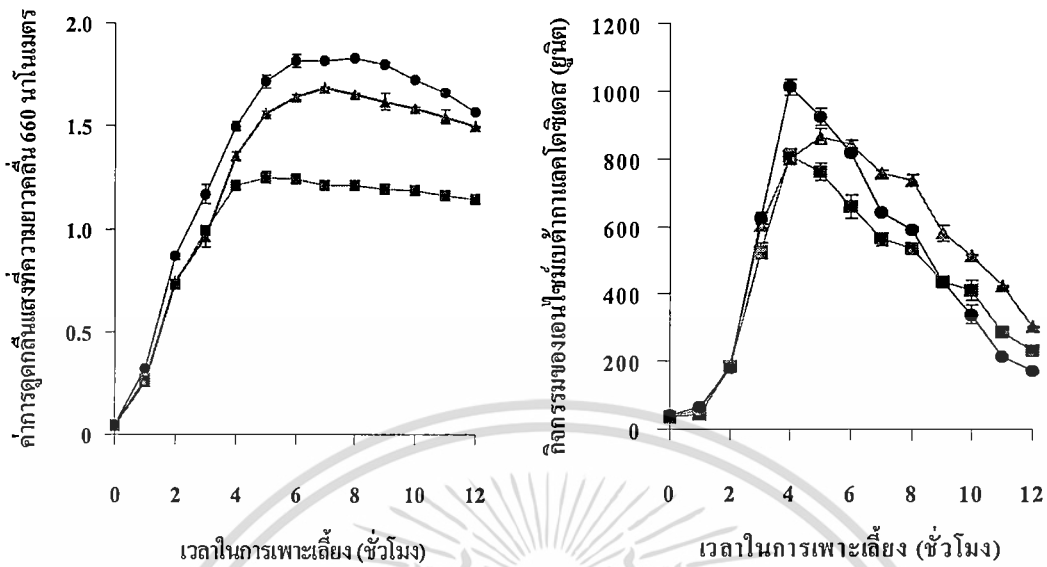
รูปที่ 4.9 การเจริญของตัวอย่างแบคทีเรียไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 30, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร

#### 4.5 การศึกษาการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน

##### 4.5.1 การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนระหว่างการเจริญเติบโต

จากการเพาะเลี้ยงตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท C-002, C-003 และ C-011 ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตร MB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ในทุกชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลทั้ง 3 ไอโซเลท มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นไอโซเลท C-003 จะเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ไอโซเลท C-002 และ C-011 มีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันและสูงกว่าไอโซเลท C-003 อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4.10 ก) จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทมีรูปแบบของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่คล้ายคลึงกัน โดยในชั่วโมงแรกของการเจริญ ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในไอโซเลททั้งสาม หลังจากชั่วโมงที่ 2 ของการเจริญ กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมีปริมาณสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในไอโซเลท C-003 และ C-011 และในชั่วโมงที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงในไอโซเลท C-002 หลังจากนั้น กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสจะลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.10 ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-002 (▲), C-003 (■) และ C-011 (●)

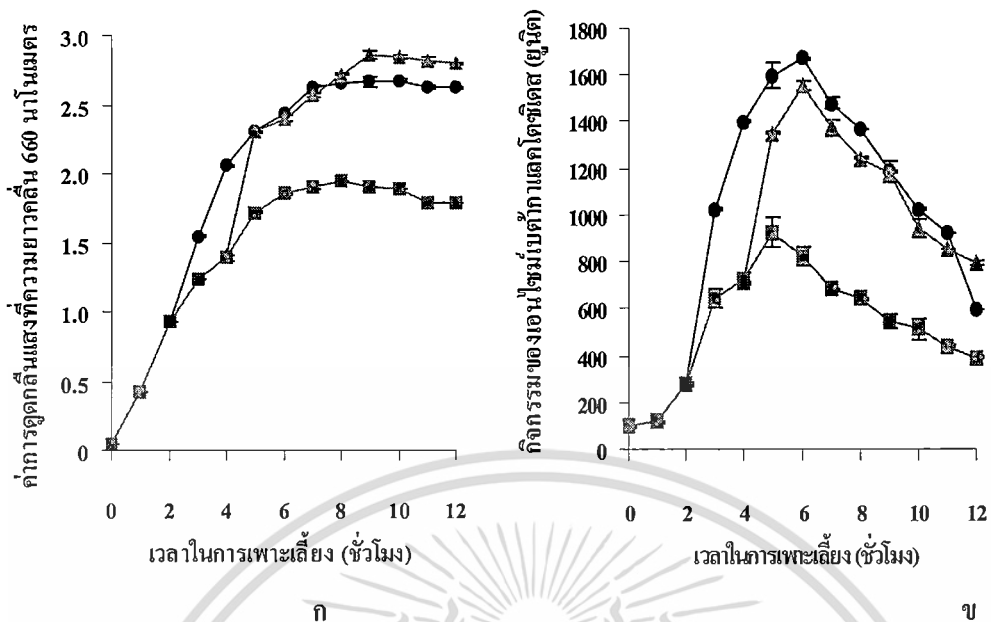
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน โดยในช่วงการเจริญระยะ lag phase และช่วงต้นของ log phase แบคทีเรียที่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนในปริมาณน้อย เมื่อแบคทีเรียเจริญจนถึงระยะ log phase การผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยโมเลกุลสัญญาณที่ผลิตขึ้นเมื่อเข้าจับกับรีเซพเตอร์ที่อยู่ภายในเซลล์แล้วจะมีกลไกไปเหนี่ยวนำให้มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนและรีเซพเตอร์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากไปชักนำให้เกิดการสร้างโมเลกุลสัญญาณด้วยสัญญาณจากตัวเอง ดังนั้นจึงจัดโมเลกุลสัญญาณนี้ว่าเป็น autoinducer เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase จะมีกลไกไปยับยั้งการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนทำให้มีปริมาณลดลงจนกระทั่งถึงระดับต่ำสุด ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Fuqua และคณะ (1994) และ Winan และ Bassler (2002) ที่รายงานว่า เมื่อแบคทีเรียแกรมลบเจริญเติบโตจะมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตน แล้วสะสมจนถึงระดับหนึ่ง (threshold level) แล้วจะมีกลไกในการกระตุ้นการทำงานยีนเป้าหมายเพื่อตอบสนองต่อความหนาแน่นของจำนวนประชากรแบคทีเรีย จากผลการทดลอง ตัวอย่างแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอรินแลคโตนที่คล้ายคลึงกันโดยพบว่าไอโซเลท C-011 มีการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกับไอโซเลท C-002 แต่มีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิล

ไฮโมเชอรินแลคโตนสูงกว่า จึงคัดเลือกไอโซเลท C-011 มาทำการศึกษาการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตนต่อไป

#### 4.5.2 ผลของการเติมกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเชอรินแลคโตน

จากการศึกษาผลของการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียจากการเติมสารละลายกลูโคสลงไปในการเพาะเลี้ยงไฮโมเชอรินแลคโตน โดยเฉพาะเลี้ยงไอโซเลท C-011 ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว MB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง วัดการเจริญเติบโตโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเก็บส่วนใสเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในทุกชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าเมื่อไม่มีการเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหาร MB เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จึงเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากการเติมสารละลายกลูโคสลงในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 2 เท่า และเข้าสู่ระยะ stationary phase ซ้ำกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ (รูปที่ 4.11 ก) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่าในสภาวะปกติพบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงสุดประมาณ 800 ยูนิต เมื่อเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติถึง 2 เท่า โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงสุด 1,667 ยูนิต และ 1,560 ยูนิต เมื่อเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (รูปที่ 4.11 ข)

เมื่อเปรียบเทียบการเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงกับสภาวะปกติ พบว่าการเติมสารละลายกลูโคสทั้ง 2 ช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง ต่างก็ส่งผลให้อัตราการเจริญของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นกว่าสภาวะปกติ การเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 5 จากนั้นอัตราการเจริญของเชื้อลดลงและเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับการเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 5 จากนั้นอัตราการเจริญลดลงและเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าการเติมสารละลายกลูโคสทั้งในชั่วโมงที่ 2 และ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้การเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase มีการเจริญเติบโตแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว การเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอนซึ่ง



**รูปที่ 4.11** การเจริญ (ก) และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ข) ของตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลไอโซเลท C-011 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MB (■) และเมื่อเติมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 2 (●) และชั่วโมงที่ 4 (▲) ของการเพาะเลี้ยง

เชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและส่งผลให้มีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นจากสภาวะปกติอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตาม การเติมสารละลายกลูโคสในชั่วโมงที่ 2 หรือ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้มีการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกัน

การเติมสารละลายกลูโคสทั้งในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงส่งผลให้มีการกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงขึ้นกว่าสภาวะปกติถึง 2 เท่า และมีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสูงสุดใกล้เคียงกัน จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตนเพิ่มสูงขึ้นตามความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียที่เพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับรายงานการศึกษาระบบควอรัมเซนซิงในแบคทีเรียแกรมลบว่า ความเข้มข้นของโมเลกุลสัญญาณเอซิดไฮโมเซอรินแลคโตนจะเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นของประชากรแบคทีเรียสูงขึ้น (Nealson and Hastings, 1979; Miller and Blassler, 2001)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาควอรัมเซนซิงของแบคทีเรียในทะเล โดยเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณบ้านแหลมแท่น ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี ทำการคัดแยกเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ทดสอบความสามารถในการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนกับ reporter strain *A. tumefaciens* A136 แล้วนำแบคทีเรียที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณดังกล่าวมาจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16 S rDNA จากนั้นศึกษารูปแบบของการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนเปรียบเทียบกับการเจริญเติบโต สามารถสรุปได้ว่า

1. จากการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทะเลบริเวณแหลมแท่น และคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนโดยการทำปฏิกิริยากับ reporter strain *A. tumefaciens* A136 พบว่าเมื่อคัดเลือกโดยเทคนิค cross streak assay สามารถจัดกลุ่มได้แบคทีเรีย 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้า จำนวน 28 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้าน้อยมากถึงปานกลาง จำนวน 39 ไอโซเลท และกลุ่มที่ 3 ทำให้ *A. tumefaciens* A136 เกิดสีฟ้ามากถึงสีฟ้าเข้ม จำนวน 15 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียในกลุ่มที่ 3 ทั้ง 15 ไอโซเลท วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลท คือ C-002, C-003 และ C-011 ที่ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนได้

2. จากการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนโค้งงอ เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน (GenBank) พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท จัดเป็นแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* โดย ไอโซเลท C-002 และ C-011 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน 16S rDNA ของ *Vibrio fluvialis* ทั้งหมด ไอโซเลท C-003 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน 16S rDNA ของ *Vibrio furnissii* และ *Vibrio fluvialis* 99 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร TCBS ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และ ไอโซเลททั้ง 3 จัดเป็น Marine bacteria เนื่องจากไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์

3. แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตน ตามการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อโมเลกุลสัญญาณเอซิลโฮโมเซอร์รินแลคโตนมีปริมาณสูงมากพอที่จะควบคุมจำนวน

ประชากรของเชื้อได้แล้ว โมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอรินแลคโตนจะลดลงอย่างรวดเร็ว การเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโต และมีการผลิตโมเลกุลสัญญาณเอซิทโฮโมเซอรินแลคโตนเพิ่มสูงขึ้นจากสภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่าสัญญาณควอรัมเซนซิงถูกกระตุ้นผ่านความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- วัฒนาวัลย์ ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. เล่มที่ 2. นครปฐม : โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซียน.
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E and Silverman, M.R. 1993. "Intercellular signalling in *Vibrio harveyi* sequence and function of genes regulating expression of luminescence." Mol. Microbiol. 9 : 773-786.
- Bassler, B.L. 1999. "How bacteria talk to each other : regulation of gene expression by quorum sensing." Curr. Opin. Microbiol. 2 : 582-587.
- Beck von Bodman, S. and Farrand, S. 1995. "Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-Acylhomoserine lactone autoinducer." J. Bacteriol. 177(17) : 5000-5008.
- Camara, M., Hardman, A., Williams, P. and Milton, D. 2002 "Quorum sensing in *Vibrio cholerae*." Nature Genetics. 32 : 217-218.
- Cao, J. and Meighen, E.A. 1989. "Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*." J. Biol Chem. 264 : 21670-21676.
- Choi, S.H. and Greenberg, E.P. 1991. "The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent *lux* gene activating domain." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 : 11115-11119.
- Crespi, B.J. 2001. "The evolution of social behavior in microorganisms." Trends in Ecology and Evolution. 16(4) : 178-183.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costeton, J.W. and Greenberg, E.P. 1998. "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." Science. 280 : 295-298.
- De Kievit, T.R. and Iglewski, B.H. 2000. "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship." Infect. Immun. 68 : 4839-4849.
- Dunny, G.M. and Leonard, B.A. 1997. "Cell-cell communication in gram positive bacteria." Annu. Rev. Microbiol. 51 : 527-564.

- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Neelson, K.H. and Oppenheimer, N.J. 1981. "Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase." *Biochemistry*. 20 : 2444-2449.
- Engelbrecht, J., Neelson, K. and Silverman, M. 1983. "Bacterial bioluminescence : isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*." *Cell*. 32 : 773-781.
- Engelbrecht, J. and Silverman, M. 1984. "Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81 : 4154-4158
- Engelbrecht, J. and Silverman, M. 1987. "Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence." *Nucleic Acids Res.* 15 : 10455-10467.
- Fuhrman, J.A., Sleeter, T.D., Carlson, C.A. and Proctor L.M. 1989. "Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological significance." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57 : 207-217.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. 1994. "Quorum sensing in bacteria : the LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators." *J. Bacteriol.* 176 : 269-275.
- Fuqua, W.C. and Winans, S.C. 1996. "Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the *traR* gene of Ti plasmid pTiR10." *Mol. Microbiol.* 20 : 1199-1210.
- Fuqua, C. and Eberhard A. 1999. **Cell-Cell Signaling in Bacteria**. Washington, D.C. American Society for Microbiology.
- Greenberg, E.P. 2000. "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria." *J. Microbiol.* 38(3) : 117-121.
- Guan, L.L. and Kamino, K. 2001. "Bacterial response to siderophore and quorum sensing chemical signals in the seawater microbial community." *BMC Microbiol.* 1(27) : 1471-1481.
- Kaplan, H.P and Greenberg, E.P. 1985. "Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system." *J. Bacteriol.* 163 : 1210-1214.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. 1997. "Quorum sensing by peptide pheromones and two component signal-transduction system in gram-positive bacteria." *Mol. Microbiol.* 24 : 895-904.

- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R. and Kuwahara, S. 1963. "A new selective isolation medium for the *Vibrio* group ; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium)." Jpn. J. Bacteriol. 18 : 387-392.
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., wisniewski-Dye, F., Williams, P. and Downie, J.A. 2000. "The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* control a network of quorum sensing loci." Mol. Microbiol. 37 : 81-97.
- McCrain, M. and Hemscheidt, T. 2000. Isolation of an antibiotic found in the marine bacterium *Alteromonas rubra*. [Online]. Available :[https://www.marbec.org/education/msurf\\_2000.asp](https://www.marbec.org/education/msurf_2000.asp)
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. 2001. "Quorum sensing in bacteria." Annu. Rev. Microbiol. 55 : 165-199.
- Milton, D.L., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P. 1997. "Quorum sensing in *Vibrio anguillarum* : characterization of the *vanI/vanR* locus and identification of the autoinducer *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone." J. Bacteriol. 179(9) : 3004-3012.
- Moré, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A. and Winans, S.C. 1996. "Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of a defined substrates." Science. 272 : 1655-1658.
- Nealson, K.H. and Hastings, J.W. 1979. "Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance." Microbiol. Rev. 43 : 496-498.
- Novick, R.P. and Muir, T.W. 1999. "Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other gram positive bacteria." Curr. Opin. Microbiol. 2 : 40-45.
- Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. 2000. "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria : a signaling mechanism involved in associations with higher organisms." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(16) : 8789-8793.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. and Iglewski, B.H. 1993. "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene requires cell-to-cell communication." Science. 260(21) : 1127-1130.
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D. and Eberhard, A., Iglewski, B.H. and Greenberg, E.P. 1994. "Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 : 197-201.

- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R. and Palva, E.T. 1993. "A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*." EMBO Journal. 12: 2467-2476.
- Puskas, A., Greenberg, E.P., Kaplan, S. and Schaefer, A.L. 1997. "A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*." J. Bacteriol. 179 : 7530-7537.
- Rashid, M.H., Rumhaugh, K., Passador, L., Davies, D.G., Hamood, A.N., Iglewski, B.H. and Kornberg, A. 2000. "Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(17) : 9636-9641.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning : a laboratory manual I-III.** Second edition, Cold spring harbor laboratory press.
- Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan JR, J.E. and Greenberg, E.P. 1996. "Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing : Acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 : 9505-9509.
- Simpson, L.M., White, V.K., Zane, S.F. and Oliver, J.D. 1987. "Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*." Infect. Immun. 55 : 269-272.
- Slock, J.D., VanRiet, D., Kolibachuk, D. and Greenberg, E.P. 1990. "Critical regions of the *Vibrio fischeri* LuxR proteins defined by mutational analysis." J. Bacteriol. 172 : 3974-3979.
- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S. and Stewart, G.S.A.B. 1997. "Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* : identification of the LuxRI homologues AhyRI and AsaRI and their cognate signals molecules." J. Bacteriol. 179 : 5271-5281.
- Winan, S.C. and Bassler, B.L. 2002. "Mob psychology." J. Bacteriol. 184 : 873-883.
- Zhang, L., Murphy, P.J., Kerr, A. and Tate, ME. 1993. "*Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones." Nature. 362:446-448.
- Zhu, J., Miller, M.B., Vance, R.E., Dziejman, M., Bassler, B.L. and Mekalanos, J.J. 2002. "Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(5) : 3129-3134.

## ภาคผนวก ก

### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Marine Broth (MB) และ Marine agar (MA)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
1. เปปโตน	5
2. ยีสต์สกัด	1
3. เฟอร์ริกซิเตรท	0.1
4. โซเดียมคลอไรด์	19.45
5. แมกนีเซียมคลอไรด์	5.9
6. แคลเซียมคลอไรด์	1.8
7. โบรอนเนียมคลอไรด์	0.55
8. โซเดียมไบคาร์บอเนต	0.16
9. โบรอนเนียมโบรไมด์	0.08
10. โซเดียมซัลเฟต	3.24
11. สตรอนเตียมคลอไรด์	0.034
12. กรดบอริก	0.022
13. โซเดียมซลิเกต	0.004
14. โซเดียมฟลูออไรด์	0.0024
15. แอมโมเนียมไนเตรท	0.0016
16. ไดโซเดียมฟอสเฟต	0.008

ปรับพีเอชให้เท่ากับ  $7.6 \pm 0.2$  ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MA เติมน้ำ 15 กรัมต่อลิตร)

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
1. แบคโตทริปโตน	10
2. ยีสต์สกัด	5
3. โซเดียมคลอไรด์	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.4 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร AT Medium

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ต่อลิตร)
1. แอมโมเนียซัลเฟต	2 กรัม
2. กลูโคส	2 กรัม
3. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	10.7 กรัม
4. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.16 กรัม
5. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.010 มิลลิกรัม
6. เฟอร์ริกซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.005 มิลลิกรัม
7. แมงกานีสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.75 มิลลิกรัม

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล นำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
1. ยีสต์สกัด	5
2. มีทเปปโตน	5
3. โซเดียมไทโอซัลเฟต	10
4. โซเดียมคลอไรด์	3
5. โซเดียมคลอไรด์	10
6. ไทมอลบลู	0.040
7. เคซีนเปปโตน	5
8. โซเดียมซิเตรท	10
9. เกลื่อน้ำดี	5
10. ซูโครส	20
11. เฟอร์ริกซิเตรท	1
12. บรอมไทมอลบลู	0.040
13. ฐึน	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับพีเอชให้เท่ากับ  $8.6 \pm 0.2$  ให้ความร้อนและปล่อยให้เดือดเป็นเวลา 1 นาที ปรับอุณหภูมิให้ได้ประมาณ 45 ถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อโดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

### 5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Gelatin Salt Agar (GS)

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
1. ยีสต์สกัด	1
2. เปปโตน	4
3. เจลลาติน	15
4. โซเดียมคลอไรด์	30
5. ู้น	15

ปรับพีเอชให้เท่ากับ  $7.2 \pm 0.2$  ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเล และผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารเอซิติลโฮโมเซอร์รินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay

ลำดับที่	ไอโซเลท	ผลการเกิดสีของ <i>A. tumefaciens</i>	ลักษณะโคโลนี
<b>กลุ่มที่ 1</b>			
1.	A-001	-	โคโลนีกลม สีส้มซีด ทึบแสง ผิวมันวาว ขอบใส
2.	A-002	-	โคโลนีกลม สีเหลือง โปร่งแสง ผิวมันวาว
3.	A-003	-	โคโลนีกลม ขนาดเล็กมาก สีขาว โปร่งแสง
4.	A-004	-	โคโลนีกลม สีไข่มุก บริเวณกลางโคโลนีทึบแสง
5.	A-005	-	โคโลนีกลม สีขาว โปร่งแสง
6.	A-006	-	โคโลนีกลม สีขาว ขอบใส กลางโคโลนีมีวงสีเข้มที่ทึบแสง
7.	A-007	-	โคโลนีกลม สีครีม โปร่งแสง มีจุดบริเวณกลางโคโลนี
8.	A-008	-	โคโลนีกลม สีขาวครีม โปร่งแสง
9.	A-009	-	โคโลนีแผ่กระจาย โปร่งแสง ผิวด้าน
10.	A-010	-	รูปร่างไม่แน่นอน สีครีม โปร่งแสง
11.	A-011	-	โคโลนีกลม สีไข่มุก ขอบใส มีวงทึบแสงบริเวณกลางโคโลนี
12.	A-012	-	โคโลนีกลม สีเหลืองนวล โปร่งแสง
13.	A-013	-	โคโลนีกลม สีขาว โปร่งแสง
14.	A-014	-	โคโลนีกลม สีครีม ทึบแสง
15.	A-015	-	ไม่เป็นโคโลนี กระจายปกคลุมทั่วจานเพาะเชื้อ สีครีม
16.	A-016	-	ไม่เป็นโคโลนี กระจายปกคลุมทั่วจานเพาะเชื้อ สีครีม
17.	A-017	-	โคโลนีกลม ใส โปร่งแสง ผิวมันเยิ้ม
18.	A-018	-	โคโลนีกลม ใส โปร่งแสง ผิวมันวาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเล และผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารเอซิดไฮโมเซอร์อินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ผลการเกิดสีของ <i>A. tumefaciens</i>	ลักษณะโคโลนี
19.	A-019	-	โคโลนีกลม สีขาว ทึบแสง ขอบใส ผิวมันวาว
20.	A-020	-	โคโลนีกลม สีไข่มุก โปร่งแสง
21.	A-021	-	โคโลนีกลม สีครีม ผิวมันวาว
22.	A-022	-	โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาวไข่มุก โปร่งแสง
23.	A-023	-	ไม่เป็นโคโลนี โปร่งแสง
24.	A-024	-	โคโลนีกลม สีไข่มุก โปร่งแสง
25.	A-025	-	โคโลนีกลม สีขาวครีม ทึบแสง ขอบใส บางโคโลนีไม่มีรูปร่าง
26.	A-026	-	โคโลนีกลม สีขาว โปร่งแสง
27.	A-027	-	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น ทึบแสง
28.	A-028	-	โคโลนีกลม สีส้ม ขอบใส ผิวมันวาว
<b>กลุ่มที่ 2</b>			
1.	B-001	++	โคโลนีกลม สีขาว มีจุดบริเวณกลางโคโลนี
2.	B-002	+++	ไม่มีรูปร่าง ใส โปร่งแสง
3.	B-003	+	โคโลนีกลม สีส้มอ่อน ทึบแสง ขอบขาว ผิวมันวาว
4.	B-004	+	โคโลนีกลม สีครีม ทึบแสง มีขอบ
5.	B-005	+++	โคโลนีกลม สีครีม โปร่งแสง เมื่อโตเต็มที่โคโลนี ใส ทึบแสง มีวงบริเวณกลางโคโลนี
6.	B-006	+++	โคโลนีกลม สีครีม ทึบแสง ผิวมันเข้ม
7.	B-007	++	โคโลนีกลมเล็ก สีครีม โปร่งแสง ผิวมันวาว
8.	B-008	+++	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ผิวมันวาว
9.	B-009	+++	ไม่มีรูปร่าง สีขาวใส โปร่งแสง
10.	B-010	++	โคโลนีกลม สีเหลืองนวล โปร่งแสง ผิวมันวาว
11.	B-011	+++	โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว โปร่งแสง
12.	B-012	+++	โคโลนีกลม สีขาวครีม ทึบแสง ขอบใส
13.	B-013	+++	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น
14.	B-014	++	โคโลนีกลม สีขาวครีม โปร่งแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเล และผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารเฮซิลโซโมเซอรินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ผลการเกิดสีของ <i>A. tumefaciens</i>	ลักษณะโคโลนี
15.	B-015	++	ไม่เป็นโคโลนี ใส โปร่งแสง ผิวด้าน
16.	B-016	++	ไม่เป็นโคโลนี สีครีม มีรอยหยักที่ขอบ ผิวมันเยิ้ม
17.	B-017	++	ไม่เป็นโคโลนี สีเหลืองนวล ขอบหยัก
18.	B-018	+	โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว โปร่งแสง
19.	B-019	+	โคโลนีกลม สีเหลืองไข่ไก่ โปร่งแสง ผิวมันวาว
20.	B-020	++	โคโลนีกลม สีครีม ทึบแสง
21.	B-021	+	โคโลนีกลมใส ขนาดเล็กมาก มีจุดบริเวณกลางโคโลนี
22.	B-022	+++	โคโลนีกลม สีขาวครีม ผิวมันวาว
23.	B-023	+++	โคโลนีกลม ใส โปร่งแสง มีวงบริเวณกลางโคโลนี
24.	B-024	+++	โคโลนีกลม สีขาว มีจุดบริเวณกลางโคโลนี โปร่งแสง ขอบไม่เรียบ
25.	B-025	++	โคโลนีกลม สีขาวครีม โปร่งแสง
26.	B-026	+	โคโลนีกลม สีพิช ผิวมันวาว
27.	B-027	+	โคโลนีกลมใหญ่ สีไข่ไก่ ขอบใส ผิวมันเยิ้ม
28.	B-028	+++	โคโลนีกลมใหญ่ สีขาว ขอบใส มีจุดบริเวณกลางโคโลนี ผิวมันเยิ้ม
29.	B-029	++	โคโลนีกลม สีขาว ขอบใส มีจุดที่บริเวณกลางโคโลนี มีเส้นแบ่งโคโลนี ผิวมันเยิ้ม
30.	B-030	+++	โคโลนีกลม สีชมพู ขอบขาว ผิวมันวาว
31.	B-031	+++	โคโลนีกลม สีขาวครีม
32.	B-032	+++	โคโลนีกลม สีขาว โปร่งแสง มีจุดบริเวณกลางโคโลนี
33.	B-033	+	โคโลนีกลม สีครีม ทึบแสง ขอบใส
34.	B-034	+++	โคโลนีกลม ขนาดเล็กมาก สีขาวไข่ไก่ โปร่งแสง
35.	B-035	++	โคโลนีกลม สีขาว มีจุดบริเวณกลางโคโลนี โปร่งแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากน้ำทะเล และผลการทดสอบความ  
สามารถในการผลิตสารเอซิดโซโมเซอรินแลคโตนด้วยวิธี cross streak assay (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ผลการเกิดสีของ <i>A. tumefaciens</i>	ลักษณะโคโลนี
36.	B-036	+	โคโลนีกลม สีขาวครีม ทึบแสง ผิวมันวาว
37.	B-037	+++	โคโลนีกลม สีขาว ทึบแสง ขอบใส
38.	B-038	++	โคโลนีกลม สีเหลืองอ่อน ขอบขาว ผิวมันวาว
39.	B-039	+	โคโลนีกลม สีเหลืองอ่อน ทึบแสง
<b>กลุ่มที่ 3</b>			
1.	C-001	++++	โคโลนีกลม สีเหลืองนวล ทึบแสง
2.	C-002	++++	โคโลนีกลม สีไข่ไก่ ทึบแสง
3.	C-003	++++	โคโลนีกลม สีครีม ขอบขาว
4.	C-004	++++	โคโลนีกลม ทึบแสง ขอบใส
5.	C-005	++++	โคโลนีมี 2 แบบ คือ 1. กลม 2. ไม่มีรูปร่าง สีครีม โปร่งแสง
6.	C-006	++++	โคโลนีกลม สีขาว โปร่งแสง ขอบใส ผิวมันวาว
7.	C-007	++++	โคโลนีกลม สีไข่ไก่ ผิวมันวาว
8.	C-008	++++	โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาวครีม โปร่งแสง
9.	C-009	++++	โคโลนีกลม สีแดง ขอบขาว ผิวมันวาว
10.	C-010	++++	โคโลนีกลม สีเหลืองเข้ม ผิวมันวาว
11.	C-011	++++	โคโลนีกลม สีครีมใส มีจุดบริเวณกลางโคโลนี
12.	C-012	++++	โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาวไข่ไก่ โปร่งแสง
13.	C-013	++++	โคโลนีมี 2 แบบ คือ 1. กลม 2. ไม่มีรูปร่าง มีแฉก ที่ขอบโคโลนี สีใส ผิวมันเยิ้ม
14.	C-014	++++	โคโลนีมี 2 แบบ คือ 1. กลม สีครีม มีจุดบริเวณ กลางโคโลนี 2. ไม่มีรูปร่าง ซ้อนกันหลายชั้น ด้านนอกใส
15.	C-015	++++	โคโลนีกลม สีครีม ขอบใส โปร่งแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้