

การศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร
ปฏิชีวนะใน *Bacillus* spp.

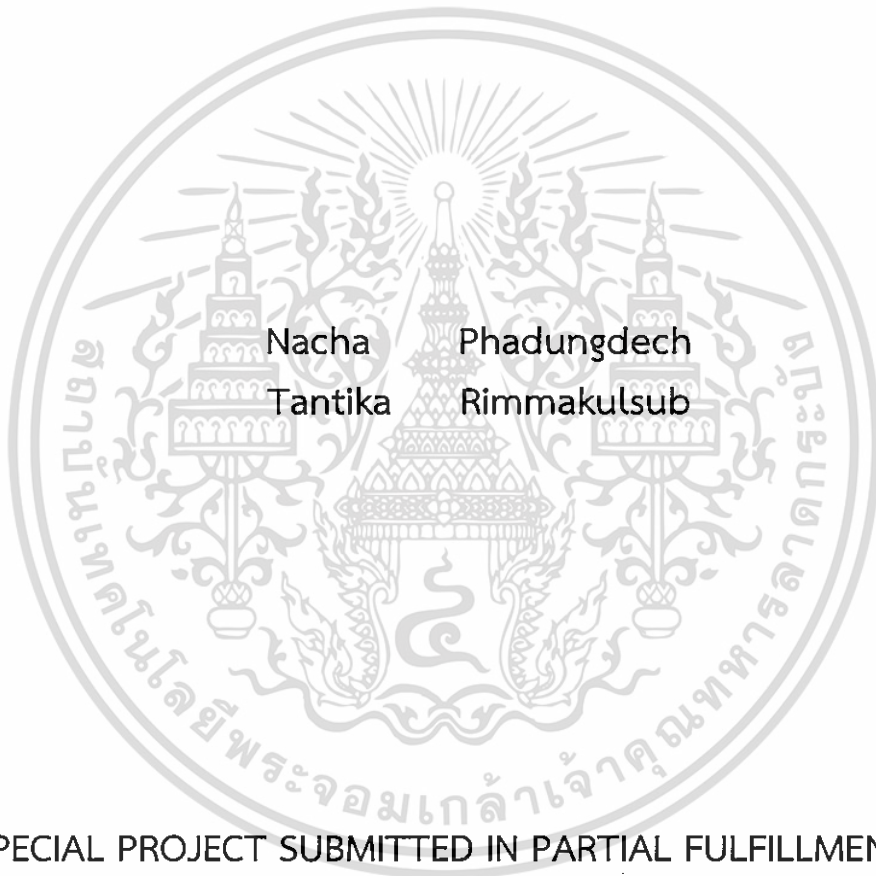
PARTIAL SEQUENCE ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN
THE BIOSYNTHESIS OF ANTIBIOTICS IN *Bacillus* spp.



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PARTIAL SEQUENCE ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN
THE BIOSYNTHESIS OF ANTIBIOTICS IN *Bacillus* spp.



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR
OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร
ปฏิชีวนะใน *Bacillus* spp.

Partial Sequence Analysis Of Genes Involved In The
Biosynthesis Of Antibiotics In *Bacillus* spp.

ชื่อนักศึกษา

นางสาวณษา ผดุงเดช รหัสนักศึกษา 57050822
นางสาวทัศนิกา रिมากุลทรัพย์ รหัสนักศึกษา 57050829

ปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา



ปีการศึกษา

2560

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุล
ชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา ประธานกรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับภาควิชาเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะใน <i>Bacillus</i> spp.
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณษา ผดุงเดช รหัสนักศึกษา 57050822 นางสาวทัศนิกา रिมากุลทรัพย์ รหัสนักศึกษา 57050829
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

บทคัดย่อ

การศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเชื้อราใน *Bacillus* spp. โดยศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นปฏิปักษ์ของ *Bacillus* spp. ต่อ *Pyricularia oryzae* ด้วยวิธี antismash เพื่อศึกษายีนที่มีความสำคัญต่อการเป็นปฏิปักษ์ของ *Bacillus* spp. มี 2 สปีชีส์ได้แก่ *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 และ *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 พบว่ามีสาร lichenysin, bacillysin, surfactin และ fengycin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* หลังจาก blastx เพื่อศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีนที่มีความหลากหลายของ *lchAA*, *bacD*, *srfAA*, *srfAC* และ *fenC* เมื่อสกัดดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์พบว่า *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 มียีน *lchAA* และ *bacD* และ *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 มียีน *srfAA*, *srfAC* และ *fenC* จากการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน *lchAA*, *bacD*, *srfAA*, *srfAC* และ *fenC* ด้วย Blastn และทำแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการพบว่าลำดับเบสบางส่วนของยีนที่นำมาศึกษามีความแตกต่างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงจำนวน 20 ชนิด จากการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของ *Bacillus* spp. และศึกษาลักษณะเส้นใยที่เปลี่ยนแปลงด้วยวิธี dual culture technique พบว่าทั้ง *B. safensis* 1021 และ *B. siamensis* 2211 และ 3210 สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ในขณะที่การศึกษาเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์มีกำลังขยาย 1000 พบว่าเส้นใยของเชื้อรา *P. oryzae* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ไม่มีความแตกต่างจากเส้นใยเชื้อราควบคุม

คำสำคัญ : สารปฏิชีวนะ, *Bacillus safensis*, *Bacillus siamensis*, *Pyricularia oryzae*, biosynthesis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The partial analysis of Genes involve in the biosynthesis of antibiotics in <i>Bacillus</i> spp.
Students	Miss Nacha Phadungdech Student ID 57050822 Miss Tantika Rimmakulsub Student ID 57050829
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department.	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Asst. Prof. Dr. Chokchai Kittiwongwattna

Abstract

Partial sequence analysis of genes involved in the biosynthesis of antibiotics in *Bacillus* spp. Study the interaction between *Bacillus* spp. and *Pyricularia oryzae* by using Antismash program to analysis the genes that important in the biosynthesis of antibiotics in *Bacillus safensis* strain 1021, *Bacillus siamensis* strain 2211 and *Bacillus siamensis* strain 3210 were found they can synthesis lichenysin, bacillysin, surfactin and fengycin that antagonistic to *P. oryzae*. After Blastx search protein databases to analysis partial sequence analysis of genes *lchAA*, *bacD*, *srfAA*, *srfAC* and *fenC*. DNA extraction and DNA purification were occurred that *B. safensis* strain 1021 contained *lchAA* and *bacD*. *B. siamensis* strain 2211 and 3210 contained *srfAA*, *srfAC* and *fenC*. Analyzed partial sequence of *lchAA*, *bacD*, *srfAA*, *srfAC* and *fenC* by using Blastn program and make the Phylogenetic tree were occurred that partial sequence of genes had different form 20 nearly species of bacteria. Inhibition test between *Bacillus* spp. And *P. oryzae* were occurred *B. safensis* 1021, *B. siamensis* 2211 and 3210 can inhibited growth of *P. oryzae* but hyphae of *P. oryzae* observed under compound microscope with 1,000 magnification can not observed that different form control

Keywords : Antibiotics , *Bacillus safensis*, *Bacillus siamensis*, *Pyricularia oryzae*, biosynthesis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเรื่อง การศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะใน *Bacillus* spp. สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจากผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ในการให้ความช่วยเหลือในด้านสารเคมีและอุปกรณ์ในการทดลองต่างๆ รวมถึงให้ข้อเสนอแนะ ให้คำปรึกษา ทั้งยังคอยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนโครงการพิเศษนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้ศึกษารู้สึกได้ถึงความตั้งใจและใส่ใจของอาจารย์ จึงขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณดร.กานต์ วงศาริยะและดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา สำหรับคำแนะนำ ความช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจตลอดการทำโครงการพิเศษครั้งนี้

ขอขอบคุณบิดา มารดา เพื่อนๆ ตลอดจนผู้เกี่ยวข้องที่ไม่ได้กล่าวในที่นี้ ที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนและคอยให้กำลังใจตลอดจนโครงการพิเศษชิ้นนี้เสร็จสิ้น

ผู้ศึกษาหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้ศึกษาต้องขอภัยเป็นอย่างสูง

ณชา
ทัศนิกา

ผดุงเดช
ริมมากุลทรัพย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขต	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
2.1 Nonribosomal peptide	2
2.2 การสังเคราะห์ Nonribosomal peptide	2
2.3 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (Biosurfactant)	4
2.3.1 ไกลโคลิพิด (glycolipid)	4
2.3.2 ไลโปเปปไทด์ (lipopeptide)	4
2.3.3 กรดไขมันและไขมัน (fatty acid and lipid)	4
2.3.4 ฟอสโฟลิพิด (phospholipid)	4
2.3.5 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactant) ..	4
2.3.6 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactant)	5
2.4 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สร้างโดยแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i>	5
2.4.1 Fengycin	5
2.4.2 Surfactin	5
2.4.3 Lichenysin	5
2.4.4 Bacilysin	6
2.5 เชื้อแบคทีเรียในสกุล <i>Bacillus</i>	6
2.6 เชื้อรา <i>Pyricularia oryzae</i>	6
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	8
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	14
4.1 การวิเคราะห์หา Gene Cluster ด้วยโปรแกรม Antismash	14
4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp.	16
4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)	17

4.4 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA Purification)	19
4.5 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส (Gel Extraction)	20
4.6 การวิเคราะห์ลำดับเบสและความสัมพันธ์การวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)	21
4.7 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>P. oryzae</i> โดยเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp.	44
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก	54
ภาคผนวก ก	55
ภาคผนวก ข	56



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสและรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้	11
ตารางที่ 4.1 ค่าการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer	17
ตารางที่ 4.2 ค่าการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer	21
ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>bacD</i> ในแบคทีเรีย <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	22
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>bacD</i> ในแบคทีเรีย <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx	23
ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>lchAA</i> ในแบคทีเรีย <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	24
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>lchAA</i> ในแบคทีเรีย <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx	25
ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>srfAA</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	27
ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>srfAA</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx	28
ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>srfAC</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	30
ตารางที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>srfAC</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx	31
ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>fenC</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	33
ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>fenC</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx	34
ตารางที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>srfAA</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	36
ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>srfAA</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx	37
ตารางที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>srfAC</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	39
ตารางที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>srfAC</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	40
ตารางที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>fenC</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn 42
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน <i>fenC</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx	43



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

ตารางที่	หน้า
รูปที่ 4.1 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ BRM1	14
รูปที่ 4.2 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ KCTC 1279BP	15
รูปที่ 4.3 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ U14-5	15
รูปที่ 4.4 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ U17-1	16
รูปที่ 4.5 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ U41	16
รูปที่ 4.6 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ SCSIO 05746	16
รูปที่ 4.7 ดีเอ็นเอจากการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis แบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 2211 และ <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 3210	17
รูปที่ 4.8 ชิ้นส่วนของยีน <i>lchAA</i> ใน แบคทีเรีย <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ 1021 จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	18
รูปที่ 4.9 ชิ้นส่วนของยีน <i>bacD</i> ใน แบคทีเรีย <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ 1021 จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	18
รูปที่ 4.10 ชิ้นส่วนของยีน <i>srfAA</i> , <i>srfAC</i> และ <i>fenC</i> ในแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 2211 และ 3210 จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	19
รูปที่ 4.11 ดีเอ็นเอจากการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	20
รูปที่ 4.12 ดีเอ็นเอจากการสกัดดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	21
รูปที่ 4.13 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน <i>lchAA</i> ของแบคทีเรีย <i>B. safensis</i> 1021 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล	26
รูปที่ 4.14 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน <i>srfAA</i> ของแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> 2211 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล	29
รูปที่ 4.15 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน <i>srfAC</i> ของแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> 2211 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล	32
รูปที่ 4.16 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน <i>fenC</i> ของแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> 2211 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล	35
รูปที่ 4.17 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน <i>srfAA</i> ของแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> 3210 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
รูปที่ 4.18 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน <i>srfAC</i> ของแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> 3210 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล	41
รูปที่ 4.19 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน <i>fenC</i> ของแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> 3210 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล	44
รูปที่ 4.20 เชื้อรา <i>P. oryzae</i> บนอาหาร PDA นาน 7 วัน และเส้นใยของเชื้อราเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 1000 เท่า	45
รูปที่ 4.21 ผลของแบคทีเรีย <i>B. safensis</i> สายพันธุ์ 1021 ต่อเส้นใยเชื้อราเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในจานเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบกำลังขยาย 1,000 เท่า	46
รูปที่ 4.22 ผลของแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 2211 ต่อเส้นใยเชื้อราเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในจานเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบกำลังขยาย 1,000 เท่า	47
รูปที่ 4.23 ผลของแบคทีเรีย <i>B. siamensis</i> สายพันธุ์ 3210 ต่อเส้นใยเชื้อราเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในจานเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบกำลังขยาย 1,000 เท่า	48



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
μl	ไมโครลิตร
ng	นาโนกรัม
ml	มิลลิลิตร
mg	มิลลิกรัม
TSA	อาหาร Tryptic Soy Agar
TSB	อาหาร Tryptic Soy Broth
TBE	สารละลาย Tris-Borate-EDTA Buffer
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
PCR	ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction
bp	คู่เบส
NRPs	Nonribosomal Peptide



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นอาหารหลักที่คนไทยนิยมบริโภคมากที่สุด และเป็นองค์ประกอบหลักของการประกอบอาหารประเภทต่างๆ ประเทศไทยมีการปลูกข้าวมาเป็นเวลานานทำให้ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศ โดยเป็นกลุ่มสินค้าเกษตรกรรมที่ส่งออกเป็นอันดับ 2 ของประเทศ มีมูลค่าการส่งออกกว่า 175,160.8 ล้านบาท (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์, 2560) แต่ในปัจจุบันก็ยังพบปัญหาของข้าวอยู่หลายประการด้วยกัน ตั้งแต่ปัญหาด้านการตลาด ปัญหาประสิทธิภาพทางการผลิตตกต่ำ รวมถึงปัญหาที่เกิดจากเชื้อโรคในข้าว โดยเชื้อโรคที่พบในข้าวส่วนใหญ่จะเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น โรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae* โรคถอดฝักดาบที่เกิดจากเชื้อ *Gibberella fujikuroi* โรคใบจุดสีน้ำตาลที่เกิดจากเชื้อ *Helminthosporium oryzae* โรคกาบใบแห้งที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* เป็นต้น จึงทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องใช้สารเคมีในการป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ในข้าวมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามได้มีการมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในข้าวได้ ตัวอย่างเช่น การใช้แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

ในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาลำดับเบสของยีน *lchAA*, *bacD*, *srfAA*, *srfAC* และ *fenC* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา รวมถึงเปรียบเทียบลำดับเบสของ *Bacillus* spp. เพื่อดูความหลากหลายของสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา และทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ด้วยเทคนิค Dual Culture Test และตรวจดูลักษณะเส้นใยของเชื้อราที่เปลี่ยนแปลงไปภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาลำดับเบสบางส่วนของ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 1021, 2211 และ 3210
- 2) ศึกษาลักษณะเส้นใยเชื้อรา *P. oryzae* ที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาลำดับเบสและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* และตรวจสอบลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่ถูกยับยั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) เพื่อทราบถึงลำดับเบสบางส่วนของ *Bacillus* spp. ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้
- 2) เพื่อทราบถึงผลของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ 1021, 2211 และ 3210 ต่อโครงสร้างเส้นใยของ *P. oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 Nonribosomal peptide

Nonribosomal peptide (NRPs) เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีความหลากหลายสูงและเป็นสารทุติยภูมิที่สามารถสร้างได้โดยแบคทีเรียและรา NRPs เป็นเปปไทด์สายสั้นประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 2 จนถึง 50 โมเลกุล กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ NRPs แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กรดอะมิโน proteinogenic 20 ชนิดที่พบในโปรตีนทั่วไป และ กรดอะมิโนประเภท non-proteinogenic ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแตกต่างจากกรดอะมิโนกลุ่มแรกตัวอย่างเช่น *para*-aminobenzoic acid (PABA) ที่เป็นปฏิชีวนะต่อเซลล์จุลินทรีย์ (Maddison *et al.*, 2008) นอกจากนี้ในการสังเคราะห์ NRPs ยังมีการดัดแปลงโครงสร้างอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ปฏิกริยาอิมเมโรเซชัน หรือ เมทิลเลชัน การดัดแปลงโมเลกุลนี้จึงส่งผลให้ NRPs มีโครงสร้างที่หลากหลายโครงสร้างปฐมภูมิของ NRPs มีโครงสร้างที่หลากหลายได้แก่โครงสร้างเป็นโซ่ตรงเหมือนกับโปรตีนที่สังเคราะห์โดยไรโบโซม โครงสร้างที่บางส่วนเป็นวง และโครงสร้างแบบ poly cyclic ซึ่งโครงสร้างเป็นวงที่ซับซ้อน ความหลากหลายขององค์ประกอบและโครงสร้าง NRPs ทำให้สารกลุ่มนี้มีกิจกรรมทางชีวภาพและเภสัชวิทยาที่หลากหลาย (Caboche *et al.*, 2008) cyclosporin มีประสิทธิภาพเป็นสารกดภูมิคุ้มกันโดยทำให้ T-cell ทำงานได้ลดลงโดยการจับกับของ cyclophilin (Borel *et al.*, 1996) และ daptomycin เป็นสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกที่ได้หลายชนิด (Baltz *et al.*, 2005) NRPs ส่วนมากสร้างจากจุลินทรีย์ที่อาศัยในดิน เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม Actinomycetes, Bacillus และ ราเส้นสาย (Mootz HD *et al.*, 2012) ในกรณีของยาปฏิชีวนะ Bacitracin ถูกสร้างโดย *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis* (Konz D *et al.*, 1997)

2.2 การสังเคราะห์ Nonribosomal peptide

การสังเคราะห์ nonribosomal peptide (NRPs) เป็นการสังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วย aminoacyl ที่ทำปฏิกิริยาที่อาศัย ATP กลายเป็น aminoacyl AMP (Walsh *et al.*, 2004) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์นั้นมีความสำคัญและมีกิจกรรมที่หลากหลายประกอบไปด้วย สารออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา (bacillomycin), สารออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (daptomycin), สารออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อไวรัส (luzopeptin), สารออกฤทธิ์ต่อต้านเนื้องอก (actinomycin D), siderophore (enterobactin), และสารกดภูมิคุ้มกัน (cyclosporin) (Felnagle *et al.* 2007) nonribosomal peptide synthetase (NRPSs) สามารถใช้ aminoacyl ได้มากกว่า 500 โมโนเมอร์ ซึ่งประกอบไปด้วย proteinogenic และ nonproteinogenic amino acid, กรดไขมัน และ hydroxy acid (Bloudoff, Schmeing, 2017) โดย nonribosomal peptide synthetase (NRPs) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซ้ำๆ โดยมาจากการทำงานร่วมกันของโดเมนหลักสาม

โดเมนคือ adenylation, thiolation และ condensation ทั้งสามโดเมนประกอบโมดูลเล็กหนึ่งของ NRPS คือโมดูลประเภท A เป็นลักษณะเส้นตรง โดเมนสุดท้าย คือ ไทโอเอสเทอร์เรส (thioesterase) มักพบที่บริเวณ C-terminus เป็นส่วนปลายที่มีหมู่คาร์บอกซีของ NRPS และปล่อยเปปไทด์ออกจาก NRPS (Felnagle *et al.*, 2007)

Adenylation (A) domains เป็นโดเมนที่มีการทำปฏิกิริยาสองขั้นตอน ขั้นตอนแรก aminoacyl ทำปฏิกิริยาที่อาศัย ATP บริเวณของหมู่คาร์บอกซิล (หรือสารตั้งต้นบางชนิดเช่น aryl acid) ได้เป็น aminoacyl AMP intermediate ขั้นตอนที่สอง A domain จะขนส่งกรดอะมิโนไปยัง 4'-phosphopantetheinyl (4'-Ppant) cofactor ของโดเมน Thiolation (Gever *et al.*, 1969) A domain ถูกเรียกว่าเป็น "gate keepers" ของ NRPS เนื่องจากโดเมนนี้คัดเลือกกรดอะมิโนที่จะนำมาสังเคราะห์เป็น NRP เหตุผลหนึ่งที่ทำให้โครงสร้างของ NRP มีความหลากหลายมากเนื่องจาก A domain สามารถใช้ได้ทั้งกรดอะมิโนทั่วไป (proteinogenic) 20 ชนิดและกรดอะมิโนอื่นๆ (nonproteinogenic) มากกว่า 300 ชนิดเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ NRPs ได้ (Döhren *et al.*, 1990)

Thiolation (T) domain เชื่อมต่อกับ A domain เมื่อ aminoacyl AMP intermediate เข้ามาใน T domain หลังจากนั้นจะดึง AMP ออกนำหมู่ aminoacyl เข้ามาจับกับ SH ซึ่งหมู่นี้เรียกว่าหมู่ thio ของ T domain เกิดเป็น aminoacylthioester ปลาย thiol เป็นส่วนหนึ่งของ 4'-Ppant จะจับกับหมู่คาร์บอกซิลของ aminoacyl-AMP intermediate กลายเป็น aminoacylthioester T domain มีบทบาทสำคัญในการทำงานในการสร้าง aminoacylthioester ของ NRPSs และเชื่อมต่อกับ A domain

Condensation (C) domain เป็นโดเมนที่มักจะตั้งอยู่ที่ส่วนต้นของแต่ละโมดูลของ NRPS เพื่อทำปฏิกิริยาการสร้างพันธะเปปไทด์ระหว่างสับสเตรทเพื่อเชื่อมโมดูลให้ติดกันเป็นรูปแบบที่ทำให้มีการคงตัวของบริเวณที่จับกันของสับสเตรทที่แตกต่างกันมีสองบริเวณ (Belshaw *et al.*, 1999)

Thioesterase (Te) Domains อยู่บริเวณ C-terminus ของ NRPS ตัวสุดท้าย โดเมนนี้จะทำปฏิกิริยา hydrolysis ของ nonribosomal peptide (NRP) และปล่อย ออกจาก NRPS หรือ intramolecular cyclization คือการจัดเป็นวงภายในโมเลกุลสามารถเกิดขึ้นได้โดยการสร้างพันธะเอไมด์และพันธะเอสเทอร์โดยที่พันธะเอไมด์สร้างจากกรดอะมิโนของแอลฟาคาร์บอนสายเปปไทด์ และปล่อยเปปไทด์ออกจาก NRPS ตัวอย่างเช่น bacitracin หรือ กรดอะมิโนของ β -amino lipid ตัวอย่างเช่น bacillomycin D การเกิดพันธะเอสเทอร์มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดกับออกซิเจนของพันธะเอสเทอร์ที่มาจากสายของกรดอะมิโน ตัวอย่างเช่น daptomycin, hydroxylated lipid ตัวอย่างเช่น surfactin, หรือหมู่ไฮดรอกซิลจาก polyketide ของ hybrid nonribosomal peptide และ polyketide molecules ตัวอย่างเช่น epothilone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (Biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพสร้างได้จากแบคทีเรีย, ยีสต์, ราเส้นสาย สารลดแรงตึงผิวมีโครงสร้างเป็นแอมฟิพาติก (amphipatic structure) ประกอบด้วยส่วนแรกคือส่วนที่มีขั้วซึ่งส่วนมากเป็นโปรตีนหรือน้ำตาล โมเลกุลเหล่านี้มีหมู่ไฮดรอกซิล, คาร์บอนิล, อะมิโน และ ฟอสเฟต เป็นต้น และส่วนที่สองคือส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งเป็นโมเลกุลพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น กรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว มีขนาดและโครงสร้างที่แตกต่างกันทำให้สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันไปด้วย (Fiechter., 1992) การจำแนกชนิดของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพตามโครงสร้างทางเคมีแบ่งได้เป็น 6 ประเภท (Gautum., 2005) ได้แก่

2.3.1 ไกลโคลิพิด (glycolipid)

สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่พบส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่มนี้ ซึ่งมีโครงสร้างประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตพวกน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาล rhamnose, trehalose, sucrose และ glucose เชื่อมต่อกับ aliphatic acids ที่เป็นสายยาว หรือ hydroxyaliphatic acids สารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคลิพิด เช่น rhamnolipids, trehalolipids และ sophorolipids เป็นต้น

2.3.2 ไลโปเปปไทด์ (lipopeptide)

สารในกลุ่มนี้นับว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง โครงสร้างมีไขมันเชื่อมอยู่กับสายเปปไทด์ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น surfactin, fengycin เป็นต้น

2.3.3 กรดไขมันและไขมัน (fatty acid and lipid)

กรดไขมันและไขมันพบได้ในจุลินทรีย์ทุกชนิด โดยจะผลิตและปล่อยออกนอกเซลล์ เช่น โมโนกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ซึ่งสารเหล่านี้จะสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่มีการเจริญบนอาหารที่มีไฮโดรคาร์บอนเป็นส่วนประกอบ

2.3.4 ฟอสโฟลิพิด (phospholipid)

ฟอสโฟลิพิดสามารถพบได้ทั่วไปในจุลินทรีย์แต่มีจำนวนน้อยที่จะถูกปล่อยออกมา นอกเซลล์โดยทั่วไปฟอสโฟลิพิดมีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยกรดไขมัน 2 หมู่เชื่อมต่อกับ กลีเซอรอลและหมู่ฟอสเฟต 1 หมู่

2.3.5 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ (polymeric biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพชนิดพอลิเมอร์ที่รู้จักทั่วไปคือ อิมัลชัน, โลโฟแซน, แมนโนโปรตีน และสารประกอบเชิงซ้อนพอลิแซคคาไรด์กับโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพชนิดอนุภาค (particulate biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพชนิดอนุภาคเป็น extracellular membrane vesicle ที่รวมตัวกลายเป็นไมโครอิมัลชันกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำหน้าที่นำอัลเคลเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งสารนี้ประกอบไปด้วยโปรตีนและฟอสโฟลิปิด

2.4 สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สร้างโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

2.4.1 Fengycin

Fengycin สร้างโดย *Bacillus subtilis* F-29-3 เป็นไลโปเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเชื้อรา fengycin ยับยั้งการเจริญราเส้นสายแต่ไม่ยับยั้งยีสต์และแบคทีเรีย กรดอะมิโนของ fengycin A ประกอบไปด้วย Glu-Orn-Tyr-Thr-Gln-Ala-Pro-Glu-Tyr-Ile ส่วนของ fengycin B มี Val แทนที่ Ala ในตำแหน่งที่ 6 และ fengycin C มี Thr แทนที่ Tyr ในตำแหน่งที่ 9 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ fengycin ได้แก่ *fenC*, *fenD*, *fenE*, *fenA* และ *fenB* (Pin lin *et al.*, 1999)

2.4.2 Surfactin

Surfactin สร้างโดย *Bacillus subtilis* และเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง surfactin มีความสามารถในการลดความตึงผิวของน้ำจาก 72 เป็น 27 mN m⁻¹ แม้แต่ในความเข้มข้นต่ำกว่า 0.05% และมีกิจกรรมการต้านเชื้อราและแบคทีเรีย โครงสร้างของ surfactin ประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ตัวเชื่อมกับหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 14 ของกรดไขมัน surfactin synthetase complex ประกอบด้วยสี่หน่วยย่อยของเอนไซม์คือ SrfA, SrfB, SrfC, SrfD ซึ่งมีบทบาทสำคัญในตอนต้นปฏิกิริยา (Steller *et al.*, 2004) surfactin synthetase complex มีการกำหนดการสร้างโดย operon ชื่อว่า *srfA* ที่ประกอบด้วย *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD* (Hamoen *et al.*, 2003)

2.4.3 Lichenysin

เป็นสารที่ทำปฏิกิริยาบนพื้นผิว สร้างจาก *Bacillus licheniformis* เอนไซม์ที่สังเคราะห์ lichenysin ประกอบด้วย LchAA, LchAB, LchAC และ thioesterase LchA-TE เอนไซม์เหล่านี้ทำหน้าที่แตกต่างกัน โดย LchAA ทำหน้าที่เป็นยูนิตเริ่มต้นของการสังเคราะห์ lichenysin หลังจากนั้นกรดอะมิโนจำเพาะจะถูกนำมาเพื่อเชื่อมสายเปปไทด์ให้ยาวขึ้นโดย LchAB หลังจากนั้น LchAC จะสร้างวงและปล่อยเปปไทด์ออกมาโดย putative thioesterase ที่บริเวณปลาย C-terminal ของ LchAC ในขณะที่ LchA-TE จะกระตุ้นการเริ่มสังเคราะห์ของ lichenysin (Qiu *et al.*, 2014) lichenysin synthetase มีการกำหนดโครงสร้างโดย operon ชื่อว่า *lch* ประกอบด้วย *lchAA*, *lchAB*, *lchAC* และ *lchATE* (Nerurkar, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 Bacilysin

bacilysin สร้างโดย *Bacillus subtilis* และเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราบางชนิด เอนไซม์ที่สังเคราะห์ Bacilysin ประกอบด้วย BacA, BacB, BacC, BacD และ BacE. bacilysin synthetase มีการกำหนดโครงสร้างโดย operon ชื่อว่า *bac* ประกอบด้วย *bacA*, *bacB*, *bacC*, *bacD* และ *bacE* (Rajavel et al., 2009)

2.5 เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีรูปร่างท่อน มีการสร้างเอนโดสปอร์ เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในบางสปีชีส์สามารถเปลี่ยนเป็นแกรมลบเมื่อมีอายุมากขึ้น (Turnbull, 1996) มีการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าสารต้านจุลชีพต่างๆที่สังเคราะห์โดยสปีชีส์ของ *Bacillus* มีทั้งการสังเคราะห์ ribosomal และ NRPS (Arnison PG et al. 2013) นอกจากนี้ไลโปเปปไทด์เป็นสารกลุ่มหนึ่งจาก *Bacillus* ที่ได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากมีกิจกรรมต้านจุลชีพที่หลากหลาย เช่น กิจกรรมต้านไวรัส และ กิจกรรมต้านเนื้องอก เป็นต้น และยังมีคุณสมบัติที่ดี เช่น มีความเป็นพิษต่ำ, มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูง เป็นต้น (Meena KR, 2015) เมื่อพิจารณาการควบคุมโรคพืชแล้วพบว่าไลโปเปปไทด์ที่ศึกษาส่วนใหญ่คือกลุ่ม iturin, fengycin และ surfactin ที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราต่างๆ เช่น *Rhizoctonia solani* (Guo Q et al., 2014) *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea* เป็นต้น (Ongena M et al., 2005) *Bacillus safensis* มีรูปร่างท่อน, สร้างสปอร์, เป็นแบคทีเรียแกรมบวก, เจริญในสภาวะที่มีอากาศ, chemoheterotrophic เป็นการอาศัยพลังงานจากการออกซิเดชันของสารอินทรีย์ พบครั้งแรกบริเวณขึ้นส่วนของยานอวกาศที่ National Aeronautics and Space Administration (NASA) ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Satomi et al., 2006) *B.safensis* VK มีความทนเค็มสูงสามารถเจริญได้เมื่อมีโซเดียมคลอไรด์ 14 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4-8 (Kothari et al., 2013) ลักษณะโคโลนี่เป็นทรงกลม, ผิวขรุขระ, สีขาวทึบ บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Satomi, 2006) *B. safensis* มีการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น bacilysin, lichenysin และ bacillibactin (Gan et al., 2015)

Bacillus siamensis มีรูปร่างท่อน, สร้างสปอร์, เป็นแบคทีเรียแกรมบวก, เจริญได้ในทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ พบครั้งแรกในปูเค็ม ที่พบในประเทศไทย ลักษณะโคโลนี่เป็นสีขาว, ชุ่ม, โปร่งแสง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตรหลังจากที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสบนอาหาร TSA เป็นเวลา 2 วัน ในอาหารเหล่านี้จะเกิดการสร้างแผ่นฟิล์มบางๆ (Sumpavapol et al., 2010) *B.siamensis* มีการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น fengycin, bacillaene, difficidin, และ iturin (Jeong et al., 2012)

2.6 เชื้อรา *Pyricularia oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารนี้เป็นเอกสารของ *P. oryzae* เป็นเชื้อในกลุ่ม imperfect fungi มีระยะ teleomorph คือ *Magnaporthe grisea* (Hebert, 1971) เชื้อ *P. oryzae* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าวและหญ้าบางชนิดซึ่งโรค

ดังกล่าวแพร่กระจายไปทั่วโลก เนื่องจากเชื้อโรคมัยสามารถแพร่กระจายได้ง่ายโดยลม, น้ำ, ดิน, ชิ้นส่วนของพืช มีความเหมาะสมต่อการเจริญและแพร่พันธุ์ของเชื้อราชนิดนี้ทั้งความชื้นและอุณหภูมิ (Agrios, 1988) โรคมัยสามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์อ่อนแอได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง เชื้อสามารถเข้าทำลายทุกส่วนของต้นข้าวที่อยู่เหนือดินในระยะกล้าและระยะแตกกอ การทำลายใบข้าวทำให้เกิดเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆในระยะแรก ต่อมาจุดน้ำตาลจะใหญ่ขึ้น แผลจะมีรูปร่างเรียวยาว ลักษณะเป็นรูปกระสวยตรงกลางแผลมีสีเทา (วัชระ, 2534) ระยะ anamorph ของ *P. oryzae* จะสร้างสปอร์สีเทาลักษณะคล้ายผลแพร่เรียกว่าโคนิเดีย (conidia) คอร์นินดิโอพอร์ (conidiophore) มีสีน้ำตาลเล็กน้อย, มีผนัง, มีกึ่งแต่ไม่พบบ่อย

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Romero *et al.* (2006) ศึกษา iturin และ fengycin ว่าเป็นปัจจัยหลักของการเป็นปฏิปักษ์ของ *Bacillus subtilis* ต่อเชื้อรา *Podosphaera fusca* โดยใช้ *B. subtilis* 4 สายพันธุ์ได้แก่ UMAF6614, UMAF6619, UMAF6639 และ UMAF8561 ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคในใบและเมล็ดของเมลอนได้ โดยวิเคราะห์การทำงานที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมชีวภาพของสายพันธุ์เหล่านี้ จากสารละลายของเซลล์แสดงให้เห็นถึงกิจกรรมของการต้านเชื้อราที่ใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้า จากการจำแนกไลโปเปปไทด์ทั้งสี่ชนิดที่เป็นสารปฏิชีวนะคือ surfactin, fengycin และ iturin.A หรือ bacillomycin ใน butanolic extracts เป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีจากสารละลายที่กรองจาก *B. subtilis* ที่มีสารปฏิชีวนะเป็นปัจจัยหลัก bacillomycin, fengycin และ iturinA มีส่วนที่ยับยั้งเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยยับยั้งบริเวณโคนิเดียของ *P. fusca*

ตลอดจนการตรวจหาแหล่งของไลโปเปปไทด์ surfactin, fengycin และ iturinA เหล่านี้ในใบที่มีแบคทีเรียได้รับการพิสูจน์ว่ามีส่วนเกี่ยวข้องในกิจกรรมที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. fusca* ผลการทดลองได้รับการสนับสนุนโดยการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่มีการกำหนดเป้าหมายที่จะยับยั้งการสังเคราะห์ไลโปเปปไทด์ surfactin, fengycin และ iturinA สรุปได้ว่า iturin และ fengycin มีบทบาทสำคัญในการเป็นปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* ต่อเชื้อรา *P. fusca*

จักรพงษ์ และคณะ (2554) ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยใช้ *Bacillus* spp. 4 สายพันธุ์ได้แก่ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 และ *Pseudomonas* spp. สายพันธุ์ ECO 008 และ SSWC 110 โดยนำส่วนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยมาศึกษาได้แก่ ส่วนของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell culture) และเซลล์แบคทีเรียบริสุทธิ์ (purified cells) โดยศึกษาความผิดปกติของเส้นใยของ *P. myriotylum* ด้วยวิธี dual culture technique บนแผ่นกระจกสไลด์พบว่า *pseudomonas* sp. สายพันธุ์ ECO 008 ทำให้เส้นใยของ *P. myriotylum* มีรูปร่างบิดเบี้ยวผิดปกติจากเดิม และ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ EWC 065, RCO 010, RWC 021 และ SSMIX 023 ทำให้เส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* มีการแตกแขนงผิดปกติ การเคลื่อนที่ของ cytoplasm ที่ผิดปกติไปจากเดิมทำให้บริเวณส่วนปลายเส้นใยแตก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1.1 *Bacillus safensis* strain 1021
- 3.1.2 *Bacillus siamensis* strain 2211
- 3.1.3 *Bacillus siamensis* strain 3210
- 3.1.4 *Pyricularia oryzae*

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์

- 1) จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Plate)
- 2) ท่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3) เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
- 4) มีดผ่าตัด (Surgical Blade)
- 5) Centrifuge tube ขนาด 50 ml
- 6) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker)
- 7) Micropipette ขนาด 0.1-2.5 μ l, 0.5-10 μ l, 5-50 μ l, 20-200 μ l และ 100-1000 μ l
- 8) ทิป (Tip) สีฟ้า, สีเหลือง และสีขาว
- 9) Microtube ขนาด 200 μ l
- 10) Microtube ขนาด 1.5 ml
- 11) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
- 12) เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Micro Centrifuge)
- 13) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler)
- 14) เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis)
- 15) เครื่องวิเคราะห์เจล (Gel Documentation)
- 16) เครื่องวัดการดูดกลืนแสงปริมาณน้อย (Nanodrop Spectrophotometer)
- 17) เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Centrifuge)
- 18) ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
- 19) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave)
- 20) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow Cabinet)
- 21) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- 22) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
- 23) ไมโครเวฟ (Microwave)
- 24) สไลด์แก้ว (Glass Slide)
- 25) กระจกปิดสไลด์ (Cover Slip)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อสาธารณะโดยไม่ได้รับอนุญาตอย่างชัดแจ้งจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 26) กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ (Compound Microscope)
- 27) เครื่อง BlueView Transilluminator

3.2.2 สารเคมี

- 1) อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA)
- 2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)
- 3) อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
- 4) ชุดสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย (DNA Extraction Kit)
- 5) ชุดทำความสะอาดดีเอ็นเอ (Gel/PCR Purification Kit)
- 6) Sterile Distilled Water
- 7) 10X *Taq* buffer
- 8) 2mM dNTP
- 9) 25mM MgCl₂
- 10) *Taq* Polymerase
- 11) 5X Buffer A
- 12) 1% (w/w) Agarose Gel
- 13) Neo Green
- 14) 6X Loading Dye
- 15) 1Kb DNA Marker Ladder
- 16) 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer
- 17) สีย้อม Lactophenol Cotton Blue

3.3 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *lchAA* และ *bacD* ใน *Bacillus safensis* และ *srfAA*, *srfAC* และ *fenC* ใน *Bacillus siamensis* ค้นหาลำดับเบส complete genome ของแบคทีเรีย *B. safensis* และ *B. siamensis* ในฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำ Accession Number ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Antismash 4.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คัดเลือกยีนที่เป็น Biosynthesis Core ของ Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank คัดเลือกลำดับเบสจากแบคทีเรีย *B. siamensis*, *B. safensis* และแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใกล้เคียงมาวิเคราะห์ Multiple Alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk>) นำผลการวิเคราะห์มาคัดเลือกบริเวณที่เหมาะสมเป็นไพรเมอร์ ตรวจสอบคุณสมบัติของไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu>) โดยไพรเมอร์ควรมีความยาวอยู่ที่ 20-22 คู่เบส ปลายสายควรจบลงที่เบส C หรือ G ค่า G+C Content มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ และค่า Melting Temperature (T_m) มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 60°C ทำไพรเมอร์จำนวน 2 ไพรเมอร์ต่อยีน คือ ไพรเมอร์ F และไพรเมอร์ R โดยไพรเมอร์ R มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสของดีเอ็นเอในฐานข้อมูล

3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

เชื้อเชื้อแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021, *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จาก Stock Culture ที่อุณหภูมิ -80°C Streak ลงบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำ Restreak ซ้ำอีกครั้ง จากนั้นใช้ห้วงเชื้อเชื้อเชื้อโคโลนีเดียวที่ได้ลงอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 5 ml บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเชื้อจากหลอดแรก 1 ml ลงในอาหาร TSB ปริมาตร 5 ml หลอดใหม่ บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงอีกครั้ง

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid, Taiwan) ดูดเชื้อจากอาหาร TSB 600 μl ใส่ลงในหลอด Microtube ขนาด 1.5 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติมน้ำละลายทิ้ง ชั่ง Lysozyme 0.8 mg/ตัวอย่าง ใส่หลอด Microtube ขนาด 1.5 ml เติมน้ำ Gram+ Buffer 200 μl /ตัวอย่าง เขย่าให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำละลายที่ได้ลงในหลอดตัวอย่าง ปริมาตร 200 μl บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที กลับหลอดทุกๆ 10 นาที เมื่อครบ 30 นาที เติมน้ำ Proteinase K ปริมาตร 20 μl เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 60°C เวลา 10 นาที กลับหลอดทุกๆ 3 นาที เติมน้ำ GB Buffer ปริมาตร 200 μl เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 70°C เวลา 10 นาที กลับหลอดทุกๆ 3 นาที ในขั้นตอนนี้น้ำ Elution Buffer ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70°C เติมน้ำ Absolute Ethanol ปริมาตร 200 μl เขย่าให้เข้ากัน ประกอบ GD Column ลงใน Collecting Tube ดูดตัวอย่างทั้งหมดลงใน GD Column ระวังอย่าให้ปลายทิปโดนเมมเบรน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้าย GD Column ใส่ลงใน Collecting Tube ใหม่ เติมน้ำ W1 Buffer ปริมาตร 400 μl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เติมน้ำ Wash Buffer ปริมาตร 600 μl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เติมน้ำละลายทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เพื่อให้เมมเบรนแห้ง ย้าย GD Column ใส่ลงใน Microtube ขนาด 1.5 ml เติมน้ำ Elution Buffer ปริมาตร 50 μl ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer หยดน้ำกลั่น ปริมาตร 1 μl ลงแท่นวัดเพื่อเช็ค Blank จากนั้นดูดดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดได้ ปริมาตร 1 μl หยดลงบนแท่นวัดเพื่อตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพดีเอ็นเอโดยพิจารณาจากอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm (A_{260}/A_{280}) และที่ความยาวคลื่น 260 และ 230 nm (A_{260}/A_{230})

ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอเพิ่มเติมด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ชั่งผง Agarose Gel ปริมาณ 0.1 g ใส่ลงใน 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer ปริมาตร 15 ml นำไปละลายในไมโครเวฟจนสารละลายเข้ากันดี ทิ้งให้เย็นลง เติมน้ำ Neo Green ปริมาตร 0.5 μl ค่อยๆ เติมน้ำละลายลงในถาด (Tray) ที่ประกอบหวี (Comb) ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ประมาณ 30 นาที จึงดึงหวีออก นำถาดเจลใส่ลงใน Chamber ของเครื่อง Gel Electrophoresis โดยให้ด้านที่มีหลุมอยู่ที่ฝั่งซ้ายลบ เท 1X TBE Buffer จนท่วมถาดเจล Load 1Kb DNA Marker Ladder ปริมาตร 2 μl ลงในหลุมแรกของเจล ผสมดีเอ็นเอที่สกัด ปริมาตร 1 μl กับ 1X TBE Buffer ปริมาตร 4 μl และ Loading Dye ปริมาตร 1 μl ให้เข้ากันแล้วใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลุมถัดไป เปิดเครื่อง Gel Electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 130 Volt นาน 20 นาที นำถาดเจลไปอ่านผลที่เครื่องวิเคราะห์เจล (Gel Documentation)

3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 μ l ประกอบด้วย น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 7.92 μ l, ไพรเมอร์ F ความเข้มข้น 5mM ปริมาตร 2 μ l, ไพรเมอร์ R ความเข้มข้น 5mM ปริมาตร 2 μ l, 5X Buffer A ปริมาตร 4 μ l, 2mM dNTP ปริมาตร 2 μ l และ ใส่ *Taq* Polymerase ปริมาตร 0.08 μ l ใส่ลงใน Microtube ขนาด 200 μ l ที่มีดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 2 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงให้สารละลายเข้ากัน นำหลอด Microtube เข้าไปป้อนในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal Cycler) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 Initial Denature ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 3 นาที 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 Denature ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 15 วินาที 1 รอบ ขั้นตอนที่ 3 Annealing ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 3 นาที 1 รอบ ขั้นตอนที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 15 วินาที 1 รอบ ทำขั้นตอน Denature ถึง Extension ซ้ำ 40 รอบ ขั้นตอนที่ 5 Final Extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที 1 รอบ และขั้นตอนที่ 6 Cool Down ที่อุณหภูมิ 16°C ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 5 คู่ ลำดับเบสและรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 1 ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ดังอธิบายในข้อ 3.4

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสและรายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ยีน	แบคทีเรีย	ขนาดดีเอ็นเอที่คาดหวัง (คู่เบส;bp)
BacD F	TGCTGACTTAGGAGGATGCC	<i>bacD</i>	<i>B. safensis</i>	1350
BacD R	TGTAAGTTGCGGATGGATGC	<i>bacD</i>	<i>B. safensis</i>	1350
LchAA F	AGGTATCTCACGTGATGTGCC	<i>lchAA</i>	<i>B. siamensis</i>	1123
LchAA R	CAATCTCGCCTGTTTCTATCCG	<i>lchAA</i>	<i>B. siamensis</i>	1123
SrfAA F	CCGATCTGACCGTGTATTGCG	<i>srfAA</i>	<i>B. siamensis</i>	1049
SrfAA R	CGCGGACTTTCACCTTGATCGTC	<i>srfAA</i>	<i>B. siamensis</i>	1049
SrfAC F	GTTGTACACGAAGCGCTCGC	<i>srfAC</i>	<i>B. siamensis</i>	980
SrfAC R	AATCCCCTGTGCGGTAAAGC	<i>srfAC</i>	<i>B. siamensis</i>	980
FenC F	CTGAACGAACGGGCTAACAG	<i>fenC</i>	<i>B. siamensis</i>	1112
FenC R	CCGATAACCGCGGATTTTCAC	<i>fenC</i>	<i>B. siamensis</i>	1112

3.6 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA Purification)

ใช้ชุดสกัด GeVPCR Purification (Favorgen, Taiwan) โดยเตรียม Microtube ที่มีดีเอ็นเอหลอดละ 19 μ l จากการทำ PCR ในขั้นตอนที่ 3.5 เติม FADF Buffer ปริมาตรเป็น 5 เท่าของตัวอย่าง เท่ากับ 95 μ l ลงในหลอด ใช้ Micropipette ผสมสารให้เข้ากันโดยการดูดสารละลายขึ้นลง ประกอบ FADF Column เข้ากับ Collecting Tube ดูดสารละลายทั้ง 3 หลอดของแต่ละตัวอย่างลงใน FADF Column ระวังอย่าให้ปลายทิวปิเปตเมมเบรน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายใน Collecting Tube ที่เติม Wash Buffer ปริมาตร 750 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เพื่อให้เมมเบรนแห้ง ย้าย FADF Column ใส่ลงใน Microtube ขนาด 1.5 ml เติม Elution Buffer ปริมาตร 27 μ l ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis และวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer

3.7 การสกัดดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส (Gel Extraction)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาทำ Agarose Gel Electrophoresis ตัดเจลบริเวณที่มี แลบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ลงใน Microtube นำไปชั่งน้ำหนัก น้ำหนักของเจลไม่ควรเกิน 300 mg เติม FADF Buffer ปริมาตร 500 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C นาน 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด ดูดสารละลายทั้งหมดลงใน FADF Column ระวังอย่าให้ปลายทิวโดนเมมเบรน นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายใน Collecting Tube ทิ้ง เติม Wash Buffer ปริมาตร 750 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เพื่อให้ เมมเบรนแห้ง ย้าย FADF Column ใส่ลงใน Microtube ขนาด 1.5 ml เติม Elution Buffer ปริมาตร 27 μ l ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis และวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer

3.8 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเชื้อรา *P. oryzae* บริสุทธิ์ เลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่ม ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7 วัน ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดแบ่งเชื้อรา *P. oryzae* ที่เจริญบน อาหาร PDA เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเท่าๆกัน วางแผ่นวุ้นบริเวณกึ่งกลางบนอาหาร PDA ใหม่ ใช้ห้วง เขี่ยเชื้อเชื้อแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 ลากลงบนอาหาร PDA เป็นเส้นตรง ห่างจากแผ่น วุ้นที่มีเชื้อรา 0.5 cm ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยทุกขั้นตอนต้องทำภายในตู้ปลอดเชื้อ และทำเช่นเดียวกัน ในเชื้อ *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7 วัน เขี่ยเชื้อรา *P. oryzae* บริสุทธิ์และที่ได้จากการทำ Dual Culture มาส่องดูการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ โดยหยด Lactophenol Cotton Blue ลงบนสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเผาไฟจนร้อนแดง ทิ้งให้เย็น เขี่ยเส้นใยของราวางใน Lactophenol Cotton Blue ปิดด้วย Cover Slip ใช้กระดาษซับ สีส่วนเกินออก ส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 400 เท่า และ 1000 เท่า

3.9 การสร้างแผนภูมิต้นกำเนิดเชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำสารละลายที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.6 และ 3.7 ไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยไพรเมอร์ F และ ไพรเมอร์ R ของแต่ละยีน เมื่อได้ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้ว นำลำดับเบสจากไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้นมาประกอบเป็น Contig ด้วยโปรแกรม CAP Contig Assembly ในโปรแกรม BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) ปรับแก้ไขข้อมูลลำดับเบสที่ไม่ถูกต้อง แล้ว นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastx (ถ้ามี) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) คัดเลือกลำดับเบสในฐานข้อมูลที่ใกล้เคียงกับลำดับเบสของเชื้อ

แบบที่เรียก 20 ลำดับแรกมาวิเคราะห์ Multiple Alignment โดยโปรแกรม Clustal W ปรับแก้ข้อมูล โดยตัดบริเวณที่เป็นช่องว่าง (gap) ออกจากนั้นนำผลที่ได้ไปสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 (https://www.megasoftware.net/active_download) โดยวิธี Neighbor-Joining และกำหนดการทำ Bootstrap Analysis ให้ทำซ้ำทั้งหมด 1,000 ครั้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การวิเคราะห์หา Gene Cluster ด้วยโปรแกรม Antismash

วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash คัดเลือกยีนที่เป็น Biosynthesis Core ของ Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank โดยคัดเลือกลำดับเบสจากแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ BRM1, KCTC 1279BP, U14-5, U17-1 มี Gene Cluster เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรา 2 Cluster ได้แก่ Cluster NRps ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Bacilysin มีค่าความเหมือน 85% ค่าเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์ที่สูงแสดงถึงความคล้ายคลึงของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (Kai Blin *et al.*, 2017) และ Cluster Cf_saccharide ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Lichenisin โดยใน *B. safensis* สายพันธุ์ BRM1 มีค่าความเหมือนสูงถึง 92% ในขณะที่อีก 3 สายพันธุ์มีค่าความเหมือนอยู่ที่ 85% ดังรูปที่ 4.1, 4.2, 4.3 และ 4.4 และ U41 มี Cluster T3pks Terpene Siderphore Bacteriocin Nrps ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Surfactin มีค่าความเหมือน 75% ดังรูปที่ 4.5 และ *B. siamensis* จำนวน 1 สายพันธุ์ พบว่า มี Gene Cluster เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรา 3 Cluster ได้แก่ Cluster Cf_saccharide ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Bacilysin โดยมีค่าความเหมือนอยู่ที่ 100%, Cluster Transatpks Nrps ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Fengycin โดยมีค่าความเหมือนอยู่ที่ 100% และ Cluster Nrps ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Surfactin มีค่าความเหมือนอยู่ที่ 82% ดังรูปที่ 4.6

Identified secondary metabolite clusters					
Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBIG BGC-ID
The following clusters are from record CP018100.1:					
Cluster 1	Cf_fatty_acid	205031	226263	-	-
Cluster 2	Cf_putative	255876	271504	-	-
Cluster 3	Nrps	347231	430946	Lichenysin_biosynthetic_gene_cluster (92% of genes show similarity)	BGC0000381_c1
Cluster 4	Cf_putative	474930	484970	-	-
Cluster 5	Cf_putative	547841	557416	-	-
Cluster 6	Cf_saccharide	695960	728228	-	-
Cluster 7	Cf_putative	809358	830483	-	-
Cluster 8	Terpene-Siderophore	1086779	1120151	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)	BGC0000645_c1
Cluster 9	Cf_fatty_acid	1131957	1152895	-	-
Cluster 10	Cf_putative	1177243	1184171	-	-
Cluster 11	Cf_putative	1654720	1673165	-	-
Cluster 12	Cf_putative	1869007	1878474	Mycosubtilin_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)	BGC0001103_c1
Cluster 13	Terpene	1947686	1969560	-	-
Cluster 14	Cf_putative	1988396	1995169	-	-
Cluster 15	T3pks	2007559	2048659	-	-
Cluster 16	Cf_putative	2167154	2185513	-	-
Cluster 17	Cf_putative	2372267	2400201	Surfactin_biosynthetic_gene_cluster (8% of genes show similarity)	BGC0000433_c1
Cluster 18	Cf_putative	2719743	2732230	-	-
Cluster 19	Cf_putative	2869395	2882970	-	-
Cluster 20	Cf_putative	2982285	2992995	-	-
Cluster 21	Cf_saccharide	3101939	3125237	-	-
Cluster 22	Cf_saccharide	3215921	3261066	Teichuronic_acid_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0000868_c1
Cluster 23	Cf_putative	3374679	3379362	-	-
Cluster 24	Cf_saccharide	3402925	3464165	Bacilysin_biosynthetic_gene_cluster (85% of genes show similarity)	BGC0001184_c1
Cluster 25	Cf_putative	3585039	3594557	-	-
Cluster 26	Nrps	3674454	3724164	Bacillibactin_biosynthetic_gene_cluster (53% of genes show similarity)	BGC0000309_c1

รูปที่ 4.1 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม

Antismash ของ *B. safensis* สายพันธุ์ BRM1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBIG BGC-ID
The following clusters are from record CP018197.1:					
Cluster 1	Cf_fatty_acid-Sactipeptide-Head_to_tail	184686	222821	Sporulation_killing_factor_skaA_biosynthetic_gene_cluster (85% of genes show similarity)	BGC0000601_c1
Cluster 2	Cf_putative	251398	267191	-	-
Cluster 3	Nrps	338658	422375	Lichenysin_biosynthetic_gene_cluster (85% of genes show similarity)	BGC0000381_c1
Cluster 4	Cf_putative	466347	476403	-	-
Cluster 5	Cf_putative	543956	551876	-	-
Cluster 6	T1pks-Nrps	641834	722739	Zwittermycin_A_biosynthetic_gene_cluster (11% of genes show similarity)	BGC0001059_c1
Cluster 7	Cf_saccharide	728875	760704	-	-
Cluster 8	Cf_putative	852646	872489	-	-
Cluster 9	Cf_putative	1047720	1056370	-	-
Cluster 10	Terpene-Siderophore	1077241	1110887	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)	BGC0000645_c1
Cluster 11	Cf_fatty_acid	1123628	1144566	-	-
Cluster 12	Cf_putative	1169598	1175043	-	-
Cluster 13	Cf_putative	1853499	1856650	-	-
Cluster 14	Cf_putative	1964582	1974048	Mycosubtilin_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)	BGC0001103_c1
Cluster 15	Terpene	2049688	2071562	-	-
Cluster 16	Cf_putative	2090403	2097378	-	-
Cluster 17	T3pks	2109957	2151057	-	-
Cluster 18	Cf_putative	2270684	2285975	-	-
Cluster 19	Cf_putative	2475417	2496709	Surfactin_biosynthetic_gene_cluster (8% of genes show similarity)	BGC0000433_c1

รูปที่ 4.2 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ *B. safensis* สายพันธุ์ KCTC 1279BP

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBIG BGC-ID
Select Gene Cluster: Overview 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28					
Identified secondary metabolite clusters					
The following clusters are from record CP015607.1:					
Cluster 1	Cf_putative	319565	333579	Micrococin_P1_biosynthetic_gene_cluster (8% of genes show similarity)	BGC0000607_c1
Cluster 2	Cf_saccharide	454226	517004	Bacilysin_biosynthetic_gene_cluster (85% of genes show similarity)	BGC0001184_c1
Cluster 3	Cf_putative	537081	543981	-	-
Cluster 4	Cf_saccharide	655812	702436	Teichuronic_acid_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0000868_c1
Cluster 5	Cf_saccharide	830652	855923	-	-
Cluster 6	Cf_putative	960635	969894	-	-
Cluster 7	Cf_putative	1080489	1094054	-	-
Cluster 8	Cf_putative	1239177	1256289	Micrococin_P1_biosynthetic_gene_cluster (8% of genes show similarity)	BGC0000607_c1
Cluster 9	Cf_putative	1722812	1740878	-	-
Cluster 10	Cf_putative	1747415	1765017	-	-
Cluster 11	Nrps	1827609	1903114	Lichenysin_biosynthetic_gene_cluster (85% of genes show similarity)	BGC0000381_c1
Cluster 12	Cf_putative	1955615	1965672	-	-
Cluster 13	Cf_putative	2028584	2035870	-	-
Cluster 14	Cf_putative	2184836	2191729	-	-
Cluster 15	Cf_putative	2310176	2329440	-	-
Cluster 16	Terpene-Siderophore	2588417	2621788	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)	BGC0000645_c1
Cluster 17	Cf_fatty_acid	2636108	2657046	-	-
Cluster 18	Cf_putative	2686262	2692541	-	-
Cluster 19	Cf_putative	2855848	2862223	-	-
Cluster 20	Cf_putative	3180652	3200517	-	-
Cluster 21	Bacteriocin	3450445	3460843	-	-

รูปที่ 4.3 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ *B. safensis* สายพันธุ์ U14-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBIG BGC-ID
The following clusters are from record CP015611.1:					
Cluster 1	Nrps	117442	167152	Bacillibactin_biosynthetic_gene_cluster (53% of genes show similarity)	BGC0000309_c1
Cluster 2	Cf_putative	250902	264232	-	-
Cluster 3	Cf_saccharide	377947	439197	Bacilysin_biosynthetic_gene_cluster (85% of genes show similarity)	BGC0001184_c1
Cluster 4	Bacteriocin	465217	478511	-	-
Cluster 5	Cf_saccharide	611944	639732	Teichuronic_acid_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0000868_c1
Cluster 6	Cf_saccharide	744999	770270	-	-
Cluster 7	Cf_putative	873855	882936	-	-
Cluster 8	Cf_putative	1098132	1113257	-	-
Cluster 9	Ladderane	1431307	1473763	Lipopolysaccharide_biosynthetic_gene_cluster (11% of genes show similarity)	BGC0000774_c1
Cluster 10	Bacteriocin	1483263	1493589	-	-
Cluster 11	Cf_putative	1665283	1677913	-	-
Cluster 12	T3pks	1798121	1839221	-	-
Cluster 13	Cf_putative	1851617	1856869	-	-
Cluster 14	Terpene	1877215	1899089	-	-
Cluster 15	Cf_putative	1938869	1948671	-	-
Cluster 16	Cf_putative	1974184	1982007	Mycosubtilin_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)	BGC0001103_c1
Cluster 17	Cf_putative	2625824	2641805	-	-
Cluster 18	Cf_putative	2646958	2655176	-	-
Cluster 19	Cf_fatty_acid	2679671	2705977	Citrulline_biosynthetic_gene_cluster (27% of genes show similarity)	BGC0000895_c1
Cluster 20	Terpene-Siderophore	2714590	2748233	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)	BGC0000645_c1
Cluster 21	Cf_putative	2844459	2850560	-	-
Cluster 22	Cf_fatty_acid	3021343	3042353	-	-
Cluster 23	Cf_saccharide	3114778	3146407	-	-
Cluster 24	Cf_putative	3282022	3291141	-	-
Cluster 25	Cf_putative	3356840	3365878	-	-
Cluster 26	Nrps	3414193	3498293	Lichenysin_biosynthetic_gene_cluster (85% of genes show similarity)	BGC0000381_c1
Cluster 27	Cf_putative	3573957	3589513	-	-

รูปที่ 4.4 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ *B. safensis* สายพันธุ์ U17-1

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBIG BGC-ID
Identified secondary metabolite clusters					
The following clusters are from record CP015610.1:					
Cluster 1	T3pks-Terpene-Siderophore-Bacteriocin-Nrps-Cf_fatty_acid-Ladderane	1	3735181	Surfactin_biosynthetic_gene_cluster (73% of genes show similarity)	BGC0000433_c1

รูปที่ 4.5 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ *B. safensis* สายพันธุ์ U41

Cluster 1	Cf_saccharide	66621	91493	-	-
Cluster 2	Cf_saccharide	278327	345893	Bacilysin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0001184_c1
Cluster 3	Cf_putative	443395	457317	-	-
Cluster 4	Cf_saccharide	479720	534540	Teichuronic_acid_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0000868_c1
Cluster 5	Cf_saccharide	621196	648578	-	-
Cluster 6	Cf_putative	816629	822733	-	-
Cluster 7	Bacteriocin-Nrps	875044	941820	Bacillibactin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0000309_c1
Cluster 8	Cf_putative	968301	978264	-	-
Cluster 9	Cf_putative	1637246	1646152	-	-
Cluster 10	Transatpks	1803329	1903761	Difficidin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0000176_c1
Cluster 11	T3pks	2019770	2060870	-	-
Cluster 12	Cf_putative	2082896	2088269	-	-
Cluster 13	Terpene	2128688	2150571	-	-
Cluster 14	Transatpks-Nrps	2175940	2313789	Fengycin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0001095_c1
Cluster 15	Transatpks-Nrps	2402440	2505052	Bacillaene_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0001089_c1
Cluster 16	Transatpks	2739291	2825184	Macrolactin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)	BGC0000181_c1
Cluster 17	Cf_putative	3031309	3039790	Molybdenum_cofactor_biosynthetic_gene_cluster (17% of genes show similarity)	BGC0000916_c1
Cluster 18	Cf_putative	3113091	3121293	-	-
Cluster 19	Cf_fatty_acid	3142238	3163176	-	-
Cluster 20	Terpene	3174338	3195081	-	-
Cluster 21	Cf_putative	3218017	3225150	-	-
Cluster 22	Cf_fatty_acid	3227688	3248665	-	-
Cluster 23	Others	3276717	3317961	Butirosin_biosynthetic_gene_cluster (7% of genes show similarity)	BGC0000693_c1
Cluster 24	Cf_putative	3455416	3479552	-	-
Cluster 25	Cf_saccharide	3547287	3576876	-	-
Cluster 26	Cf_fatty_acid	3704132	3725367	-	-
Cluster 27	Cf_putative	3801521	3807899	-	-
Cluster 28	Cf_putative	3865857	3881444	-	-
Cluster 29	Nrps	3892311	3957721	Surfactin_biosynthetic_gene_cluster (82% of genes show similarity)	BGC0000433_c1

รูปที่ 4.6 วิเคราะห์หา Gene Cluster ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรม Antismash ของ *B. siamensis* สายพันธุ์ SCSIO 05746

4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของการสกัดเชื้อแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021, *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 โดยวิธี Agarose Gel

Electrophoresis ผลแสดงให้เห็นว่าปรากฏแถบแบนของดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังรูปที่ 4.7 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอโดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer แสดงดังตารางที่ 4.1 แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 82.3-354.1 ng/ μ l ค่าความบริสุทธิ์ A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.97-2.09 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ที่ยอมรับได้ว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ (Desjardins and Conklin, 2010) ค่าความบริสุทธิ์ A_{260}/A_{230} อยู่ในช่วง 1.91-2.18 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 2.0-2.2 (Desjardins and Conklin, 2010)



รูปที่ 4.7 ดีเอ็นเอจากการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยเลน (M) คือ 1Kb Marker Ladder (1) และ (2) คือ แบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 (3) และ (4) คือ แบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ (5) และ (6) คือ แบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210

ตารางที่ 4.1 ค่าการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer

Bacteria	ความเข้มข้น (ng/ μ l)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
<i>B. safensis</i> 1021	103.6	1.98	2.01
<i>B. safensis</i> 1021	97.2	2.02	1.93
<i>B. siamensis</i> 2211	90.5	2.06	1.91
<i>B. siamensis</i> 2211	82.3	2.09	1.92
<i>B. siamensis</i> 3210	354.1	2.05	2.18
<i>B. siamensis</i> 3210	124.7	1.97	2.05

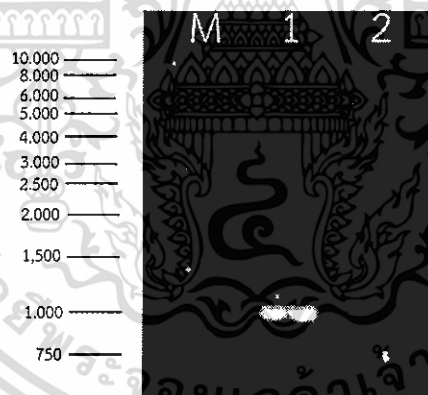
4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ของเชื้อแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021, *B. siamensis* สายพันธุ์ ไม่ว่าจะกรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ผลและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มาไปใช้

2211 และ *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ผลแสดงให้เห็นว่าปรากฏแถบแบนของ ยีน *lchAA* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 ที่บริเวณ 10,000 bp อาจเกิดจากการปนเปื้อนในขั้นตอนการทำ PCR (Juergen Loeffler et al., 1999) ดังรูปที่ 4.8 ยีน *bacD* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 ที่บริเวณ 750 bp ดังรูปที่ 4.9 ยีน *srfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 ที่บริเวณ 1,000 bp ยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 ที่บริเวณ 1,000 bp และยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 ที่บริเวณ 1,000 bp ดังรูปที่ 4.10

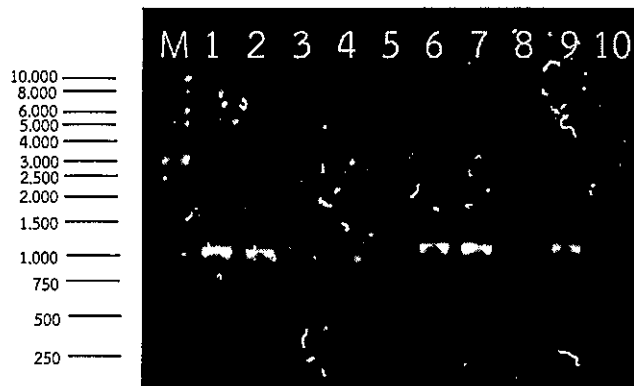


รูปที่ 4.8 ชิ้นส่วนของยีน *lchAA* ใน แบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยเลน (M) คือ 1Kb Marker Ladder (1), (2) และ (3) คือ ยีน *lchAA* ใน แบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021



รูปที่ 4.9 ชิ้นส่วนของยีน *bacD* ใน แบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยเลน (M) คือ 1Kb Marker Ladder (1), (2) และ (3) คือ ยีน *bacD* ใน แบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ชิ้นส่วนของยีน *sfAA*, *sfAC* และ *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยเลน (M) คือ 1Kb Marker Ladder (1) คือ ยีน *sfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 (2) คือ ยีน *sfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 (3) คือ ยีน *sfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 (4) คือ ยีน *sfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 (5), (6) และ (7) คือ ยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 (8), (9) และ (10) คือ ยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210

4.4 การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (DNA Purification)

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของลำดับเบสบางส่วนของยีน *sfAA*, *sfAC* และ *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ผลแสดงให้เห็นว่า ยีน *sfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 มีขนาดประมาณ 1,000 bp ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดดีเอ็นเอที่คาดหวัง คือ 1,049 bp ยีน *sfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 มีขนาดประมาณ 1,000 bp ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดดีเอ็นเอที่คาดหวัง คือ 980 bp และยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 มีขนาดประมาณ 1,000 bp ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดดีเอ็นเอที่คาดหวัง คือ 1,112 bp ดังรูปที่ 4.11

และการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของลำดับเบสบางส่วนของยีน *sfAA*, *sfAC* และ *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 โดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer แสดงดังตารางที่ 4.2 แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 196.6-304.4 ng/ μ l ค่าความบริสุทธิ์ A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.88-19.1 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ที่ยอมรับได้ว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ (Desjardins and Conklin, 2010) และค่าความบริสุทธิ์ A_{260}/A_{230} อยู่ในช่วง 1.69-2.16 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 2.0-2.2 (Desjardins and Conklin, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส (Gel Extraction)

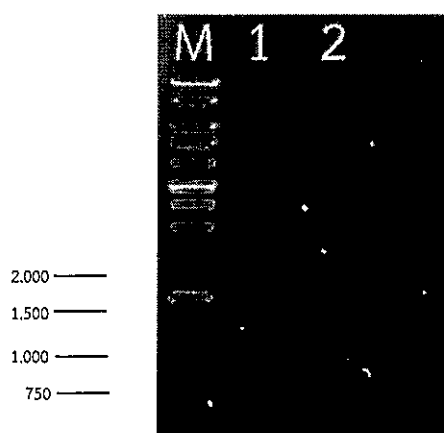
การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของลำดับเบสบางส่วนของยีน *lchAA*, และ *bacD* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 โดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ผลแสดงให้เห็นว่ายีน *LchAA* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 มีขนาดประมาณ 1,000 bp ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดดีเอ็นเอที่คาดหวัง คือ 1,123 bp และ ยีน *BacD* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 มีขนาดประมาณ 1,000 bp ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดดีเอ็นเอที่คาดหวัง คือ 1350 bp ดังรูปที่ 4.12

และการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของลำดับเบสบางส่วนของยีน *lchAA* และ *bacD* โดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer แสดงดังตารางที่ 4.2 แบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 12.2-31.5 ng/ μ l ค่าความบริสุทธิ์ A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.96-2.05 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ที่ยอมรับได้ว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ (Desjardins and Conklin, 2010) และค่าความบริสุทธิ์ A_{260}/A_{230} อยู่ในช่วง 1.05-1.52 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าในช่วงที่ยอมรับได้ว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ คือ 2.0-2.2 อาจเกิดจากการปนเปื้อนในขั้นตอนการสกัด (Desjardins and Conklin, 2010)



รูปที่ 4.11 ดีเอ็นเอจากการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยเลน (M) 1Kb Marker Ladder (1) คือ ยีน *srfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 (2) คือ ยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 (3) คือ ยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 (4) คือ ยีน *srfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 (5) คือ ยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 และ (6) คือ ยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ดีเอ็นเอจากการสกัดดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส และตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยเลน (M) คือ 1Kb Marker Ladder (1) คือ ยีน *lchAA* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 และ (2) คือ ยีน *bacD* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021

ตารางที่ 4.2 ค่าการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer

Bacteria	Gene	ความเข้มข้น (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
<i>B. safensis</i> 1021	<i>lchAA</i>	31.5	1.96	1.52
<i>B. safensis</i> 1021	<i>bacD</i>	12.2	2.05	1.05
<i>B. siamensis</i> 2211	<i>sfAA</i>	200.7	1.91	2.05
<i>B. siamensis</i> 2211	<i>sfAC</i>	198.2	1.89	1.69
<i>B. siamensis</i> 2211	<i>fenC</i>	196.3	1.88	1.76
<i>B. siamensis</i> 3210	<i>sfAA</i>	304.4	1.89	2.16
<i>B. siamensis</i> 3210	<i>sfAC</i>	178.6	1.89	2.08
<i>B. siamensis</i> 3210	<i>fenC</i>	231.0	1.90	2.20

4.6 การวิเคราะห์ลำดับเบสและความสัมพันธ์การวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของยีน *lchaa* และ *bacD* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021, ยีน *sfAA*, *sfAC* และ *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และยีน *sfAA*, *sfAC* และ *fenC* ในแบคทีเรีย *B. Siamensis* สายพันธุ์ 3210 นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastx กับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงจำนวน 20 เชื้อ และนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 ได้ผลดังนี้

ลำดับเบสบางส่วนของยีน *bacD* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus siamensis* SCSIO.05746 โดยมีค่า E value ซึ่งจะบอกถึงความแตกต่างของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบของแบคทีเรียทั้ง 2 ตัว โดยค่ายิ่งต่ำยิ่งมีความเหมือนสูง มีค่าเท่ากับ 0.0 และมีค่า

Identity ซึ่งค่านี้ออกค่าความเหมือนของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ (Nadim, 2007) มีค่าถึง 97% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความเหมือนกันสูง ดังตารางที่ 4.3

จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx มีความคล้ายคลึงกับ adenine deaminase [*Bacillus siamensis*] โดยมีค่า E value ซึ่งจะบอกถึงความแตกต่างของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่าเท่ากับ 2^{e-157} และมีค่า Identity ซึ่งค่านี้ออกค่าความเหมือนของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่า 86% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความคล้ายคลึงกันต่ำ ดังตารางที่ 4.4

ไม่มีการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 เนื่องจาก *bacD* สร้างเอนไซม์ Adenine Deaminase ที่เกี่ยวข้องกับ adenine metabolism ในการเจริญของเซลล์ (Nygaard, 1996) ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ Nonribosomal Peptide

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *bacD* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

Description	E value	Identity
<i>Bacillus siamensis</i> SCSIO 05746	0.0	97%
<i>Bacillus</i> sp. SDL11	0.0	97%
<i>Bacillus velezensis</i> G341	0.0	96%
<i>Bacillus subtilis</i> Bs-916	0.0	96%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5113	0.0	96%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5033	0.0	96%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ALB69	0.0	96%
<i>Bacillus velezensis</i> SB1216	0.0	96%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> UMAF6614	0.0	96%
<i>Bacillus velezensis</i> CGMCC 11640	0.0	96%
<i>Bacillus</i> sp. Lzh-5	0.0	96%
<i>Bacillus velezensis</i> SCGB 574	0.0	96%
<i>Bacillus velezensis</i> 157	0.0	96%
<i>Bacillus velezensis</i> CC09	0.0	96%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B15	0.0	96%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i> KHG19	0.0	96%
<i>Bacillus</i> sp. Pc3	0.0	96%
<i>Bacillus velezensis</i> JS25R	0.0	96%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> NAU-B3	0.0	96%
<i>Bacillus velezensis</i> LM23DO2	0.0	96%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *bacD* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx

Description	E value	Identity
adenine deaminase [<i>Bacillus siamensis</i>]	2e-157	86%
adenine deaminase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	2e-157	86%
adenine deaminase [<i>Bacillus siamensis</i>]	2e-157	86%
adenine deaminase [<i>Bacillus sp. JFL15</i>]	2e-157	86%
adenine deaminase [<i>Bacillus siamensis</i>]	3e-157	86%
adenosine deaminase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-156	85%
adenine deaminase [<i>Bacillus velezensis</i>]	1e-155	85%
adenine deaminase [<i>Bacillus velezensis</i>]	1e-155	85%
adenine deaminase [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-155	85%
MULTISPECIES: adenine deaminase [<i>Bacillus subtilis</i> group]	2e-155	85%
adenine deaminase [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-155	85%
MULTISPECIES: adenine deaminase [<i>Bacillus</i>]	2e-155	85%
adenine deaminase [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-155	85%
adenine deaminase [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-155	85%
adenine deaminase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	2e-155	85%
MULTISPECIES: adenine deaminase [<i>Bacillus subtilis</i> group]	2e-155	85%
MULTISPECIES: adenine deaminase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> group]	2e-155	85%
MULTISPECIES: adenine deaminase [<i>Bacillus</i>]	2e-155	85%
MULTISPECIES: adenine deaminase [<i>Bacillus</i>]	2e-155	85%
adenine deaminase [<i>Bacillus sp. 916</i>]	2e-155	85%

ลำดับเบสบางส่วนของยีน *lchAA* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus velezensis* LM23DO2 โดยมีค่า E value เท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity 99% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความเหมือนกันสูง ดังตารางที่ 4.5

จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx มีความคล้ายคลึงกับ non-ribosomal peptide synthetase [*Bacillus siamensis*] โดยมีค่า E value ซึ่งจะบอกถึงความแตกต่างของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่าเท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity ซึ่งค่านี้บอกค่าความเหมือนของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่า 100% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความคล้ายคลึงกันสูง ดังตารางที่ 4.6

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 พบว่า แผนภูมิวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก ได้แก่ *Bacillus vallismortis* NBIF-001, *Bacillus velezensis* JTYP2, *Bacillus methylotrophicus* CBMB205, *Bacillus velezensis* GQJK49, ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus velezensis DR-08, *Bacillus velezensis* LM23DO2, *Bacillus velezensis* sx01604, *Bacillus amyloliquefaciens* WS-8, *Bacillus velezensis* LS69, *Bacillus velezensis* S3-1 และ *Bacillus velezensis* CBMB205 และกลุ่มที่สอง ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* S499, *Bacillus amyloliquefaciens* IT-45, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946, *Bacillus velezensis* Hx05, *Bacillus velezensis* 8-2, *Bacillus velezensis* 131-4, *Bacillus velezensis* J7-1, *Bacillus velezensis* NJAU-Z9 และ *Bacillus velezensis* T20E-257 ซึ่งลำดับเบสบางส่วนของยีน *lchAA* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 มีความใกล้เคียงกับกลุ่มแรก เมื่อทำ Bootstrap 1,000 ครั้ง ไม่ปรากฏค่า Bootstrap อาจเกิดได้จากข้อมูลของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลมีไม่มากพอ (Pamela S. Soltis and Douglas E. Soltis, 2003) จึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ ดังรูปที่ 4.13

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *lchAA* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

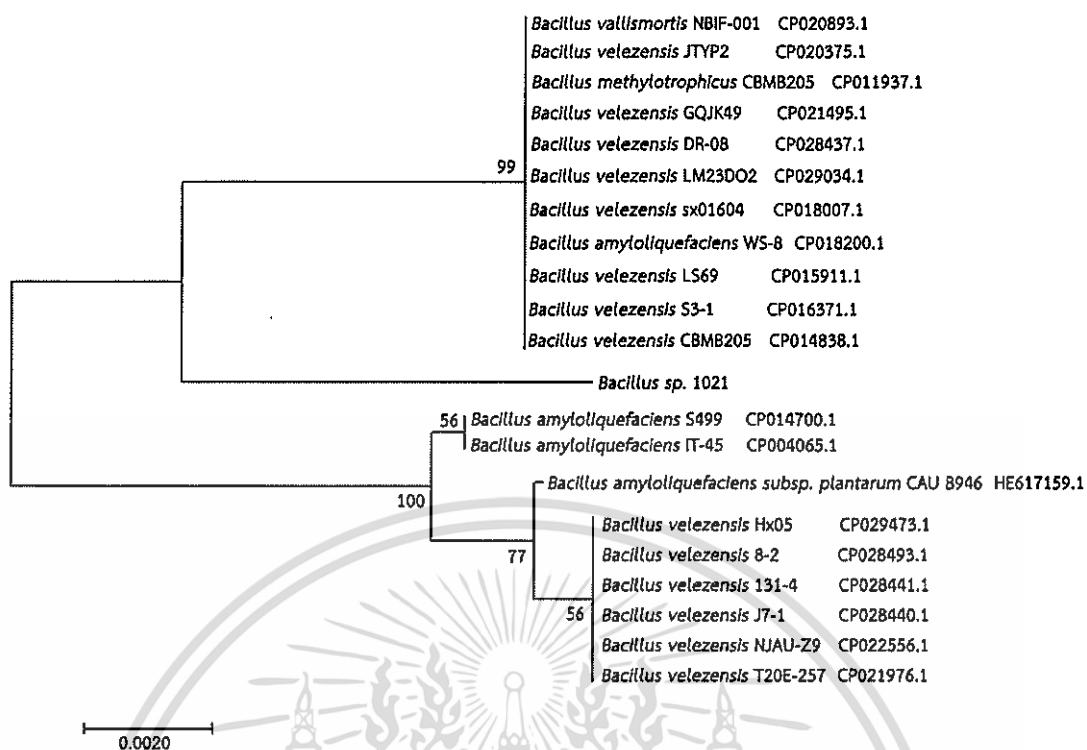
Description	E value	Identity
<i>Bacillus velezensis</i> LM23DO2	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> DR-08	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> GQJK49	0.0	99%
<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205	0.0	99%
<i>Bacillus vallismortis</i> NBIF-001	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> JTYP2	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> sx01604	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> WS-8	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> LS69	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> S3-1	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S499	0.0	98%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT-45	0.0	98%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CAU B946	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> Hx05	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> 8-2	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> 131-4	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> J7-1	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> NJAU-Z9	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> T20E-257	0.0	98%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *lchAA* ในแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx

Description	E value	Identity
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus siamensis</i>]	0.0	100%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus siamensis</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus</i> sp. JFL15]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus subtilis</i> group]	0.0	99%
peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus siamensis</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus siamensis</i>]	0.0	98%
MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus</i>]	0.0	98%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	98%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	98%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	98%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	98%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	98%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	98%
MULTISPECIES: non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> group]	0.0	98%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	98%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	98%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	98%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน *lchAA* ของแบคทีเรีย *B. safensis* 1021 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล

ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus velezensis* 8-2 โดยมีค่า E value เท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity 99% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความเหมือนกันสูง ดังตารางที่ 4.7

จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx มีความคล้ายคลึงกับ non-ribosomal peptide synthetase [*Bacillus siamensis*] โดยมีค่า E value ซึ่งจะบอกถึงความแตกต่างของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่าเท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity ซึ่งค่านี้บอกค่าความเหมือนของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่า 100% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความคล้ายคลึงกันสูง ดังตารางที่ 4.8

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 พบว่า แผนภูมิวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก ได้แก่ *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC 55079, *Bacillus amyloliquefaciens* Y14, *Bacillus velezensis* CMT-6, *Bacillus* sp. ZY-1-1 และ *Bacillus velezensis* Hx05 และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* LM2303, *Bacillus subtilis* B-1, *Bacillus velezensis* J01 และ *Bacillus velezensis* J01 ซึ่งลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 มีความใกล้เคียงกับกลุ่มแรกมากกว่า ผลการวิเคราะห์ Bootstrap Analysis 1,000 ครั้ง พบว่ามีค่า Bootstrap เท่ากับ 43% ซึ่งถือว่ามีค่าต่ำ อาจเกิดจากข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลมีไม่มากพอ (Pamela S. Soltis and Douglas E. Soltis, 2003) ดังรูปที่ 4.14

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

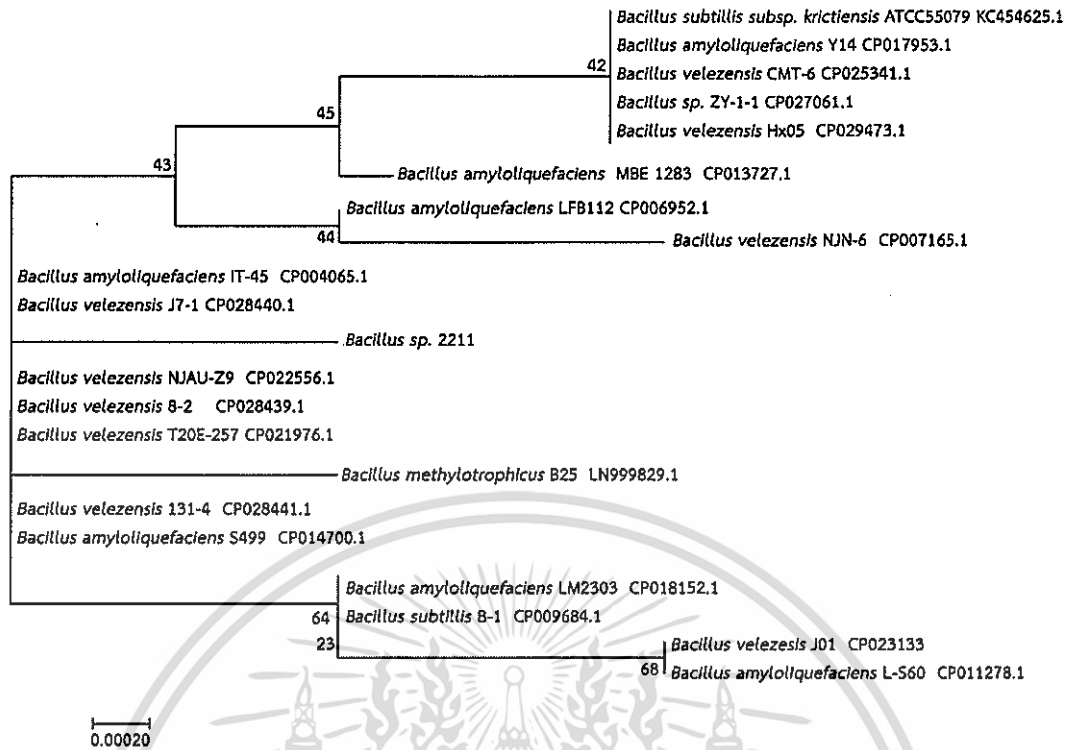
Description	E value	Identity
<i>Bacillus velezensis</i> 8-2	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> 131-4	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> J7-1	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> NJAU-Z9	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> T20E-257	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S499	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT-45	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LM2303	0.0	99%
<i>Bacillus methylotrophicus</i> B25	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBE1283	0.0	99%
<i>Bacillus subtilis</i> B-1	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LFB112	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> Hx05	0.0	99%
<i>Bacillus</i> sp. ZY-1-1	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> CMT-6	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> J01	0.0	99%
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> ATCC 55079	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y14	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> NJN-6	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> L-S60	0.0	99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx

Description	E value	Identity
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus</i> sp. Co1-6]	0.0	100%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus subtilis</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
surfactin synthetase A [<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>kriectiensis</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus</i> sp. ZY-1-1]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน *srfAA* ของแบคทีเรีย *B. siamensis* 2211 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานะข้อมูล

ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus velezensis* M75 โดยมีค่า E value เท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity 99% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความเหมือนกันสูง ดังตารางที่ 4.9

จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx มีความคล้ายคลึงกับ surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [*Bacillus* sp. ZY-1-1] โดยมีค่า E value ซึ่งจะบอถึงความแตกต่างของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่าเท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity ซึ่งค่านี้บอค่าความเหมือนของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่า 99% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความคล้ายคลึงกันสูง ดังตารางที่ 4.10

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 พบว่า แผนภูมิวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60, *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15 และ *Bacillus velezensis* M75 และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Bacillus velezensis* GH1-13, *Bacillus amyloliquefaciens* ALB65, *Bacillus subtilis* subsp. *krichtiensis* ATCC 55079, *Bacillus* sp. ZY-1-1 และ *Bacillus velezensis* Hx05 ซึ่งลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 มีความใกล้เคียงกับกลุ่มแรกมากกว่า ผลการวิเคราะห์ Bootstrap Analysis 1,000 ครั้ง พบว่ามีค่า Bootstrap เท่ากับ 64% มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 และ *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15 M75 ซึ่งถือว่ามีค่าต่ำ อาจเกิดจากข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลมีไม่มากพอ (Pamela S. Soltis and Douglas E. Soltis, 2003) ดังรูปที่ 4.15

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

Description	E value	Identity
<i>Bacillus velezensis</i> M75	0.0	99%
<i>Bacillus methylotrophicus</i> B25	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> J01	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S499	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> L-S60	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> L-H15	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT-45	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CAU B946	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> ZL918	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> JJ-D34	0.0	99%
<i>Bacillus subtilis</i> B-1	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LM2303	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> NJN-6	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LFB112	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ALB65	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> NJAU-Z9	0.0	99%
<i>Bacillus</i> sp. ZY-1-1	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> Hx05	0.0	99%
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>krietiensis</i> ATCC 55079	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> GH1-13	0.0	99%

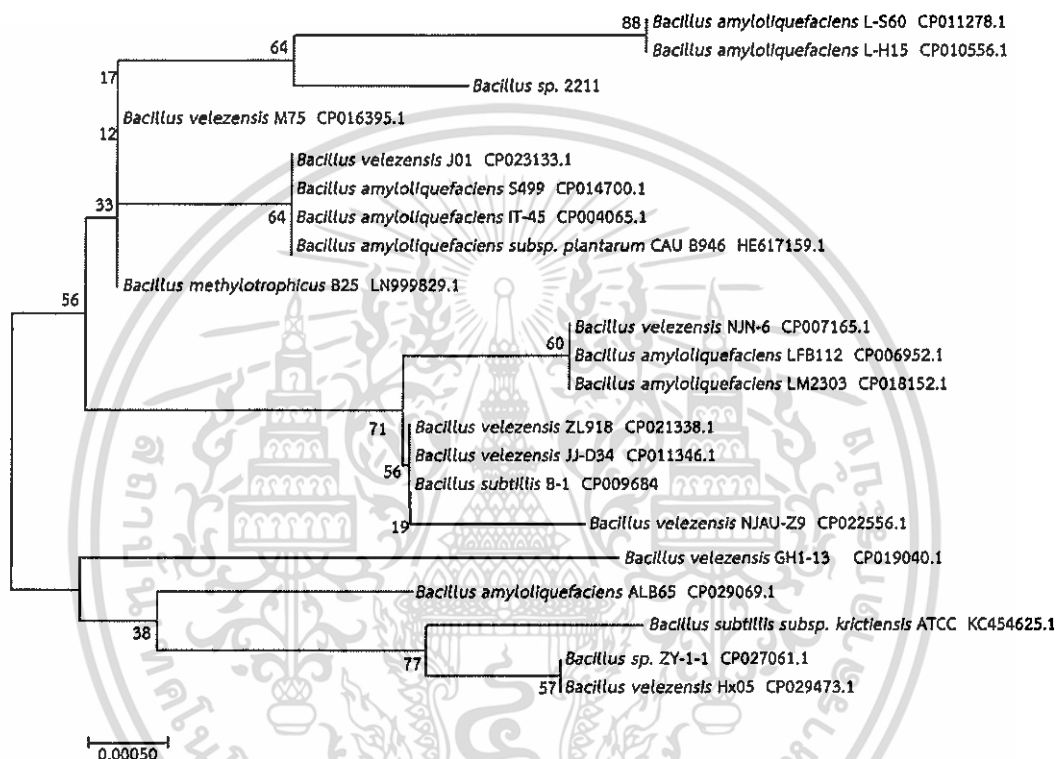
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx

Description	E value	Identity
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus sp. ZY-1-1]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus velezensis]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus velezensis]	0.0	99%
surfactin synthetase C [Bacillus subtilis subsp. krichtiensis]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus amyloliquefaciens]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus velezensis]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus velezensis]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus amyloliquefaciens]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus sp. VMFN-A1]	0.0	99%
MULTISPECIES: surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus amyloliquefaciens group]	0.0	99%
MULTISPECIES: surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus]	0.0	99%
MULTISPECIES: surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus subtilis group]	0.0	99%
MULTISPECIES: surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus amyloliquefaciens]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus velezensis]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus velezensis]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [Bacillus amyloliquefaciens]	0.0	99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Description	E value	Identity
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	99%



รูปที่ 4.15 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน *srfAC* ของแบคทีเรีย *B. siamensis* 2211 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานะข้อมูล

ลำดับเบสบางส่วนของยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* MBE1283 โดยมีค่า E value เท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity 99% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความเหมือนกันสูง ดังตารางที่ 4.11

จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx มีความคล้ายคลึงกับ FenC [*Bacillus* sp. 916] โดยมีค่า E value ซึ่งจะบอกถึงความแตกต่างของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่าเท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity ซึ่งค่านี้บอกค่าความเหมือนของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่า 4^{e-168} แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความคล้ายคลึงกันสูง ดังตารางที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 พบว่า แผนภูมิวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก ได้แก่ *Bacillus velezensis* NJAU-Z9, *Bacillus*

velezensis T20E-257, *Bacillus velezensis* J7-1, *Bacillus velezensis* 8-2, *Bacillus velezensis* 131-4, *Bacillus velezensis* J01, *Bacillus velezensis* ZL918, *Bacillus amyloliquefaciens* LM2303, *Bacillus subtilis* B-1, *Bacillus amyloliquefaciens* MBE1283, *Bacillus amyloliquefaciens* Y14, *Bacillus* sp. ZY-1-1, *Bacillus amyloliquefaciens* S499, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946, *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15, *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60, *Bacillus methylotrophicus* B25 และ *Bacillus velezensis* M75 และในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* IT-45 และ *Bacillus velezensis* Hx05 ซึ่งลำดับเบสบางส่วนของยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* MBE1283 และ *Bacillus amyloliquefaciens* Y14 ผลการวิเคราะห์ Bootstrap Analysis 1,000 ครั้ง พบว่ามีค่า Bootstrap เท่ากับ 36% ซึ่งถือว่ามีความต่ำ อาจเกิดจากข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลมีไม่มากพอ (Pamela S. Soltis and Douglas E. Soltis, 2003) ดังรูปที่ 4.16

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

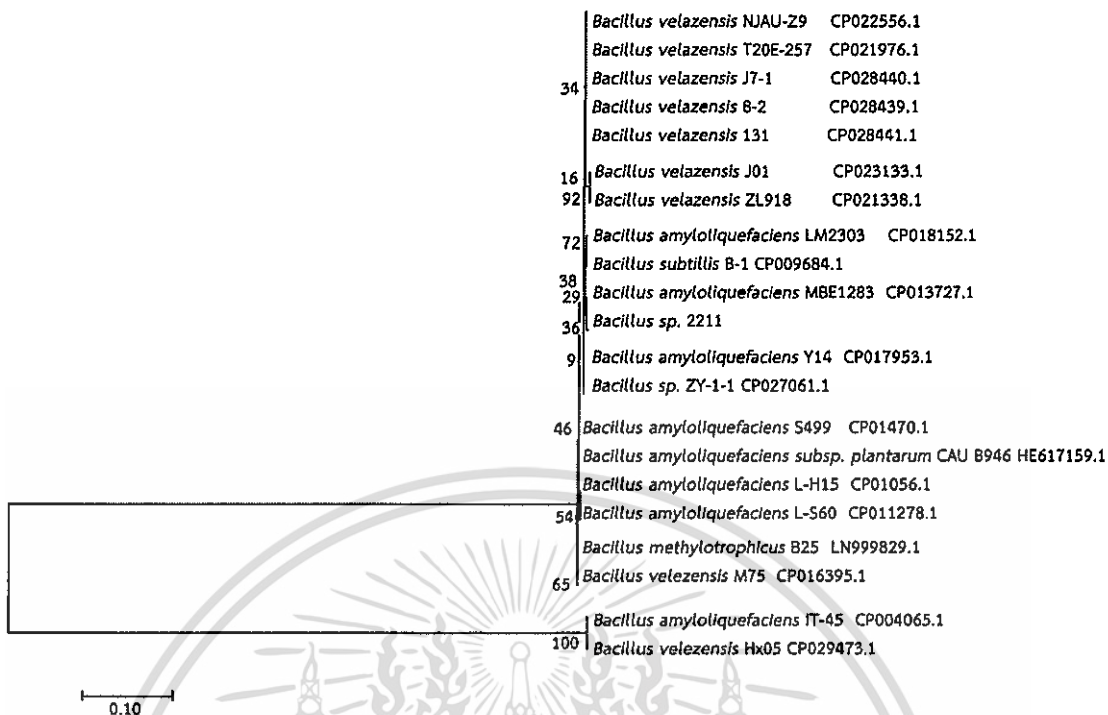
Description	E value	Identity
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MBE1283	0.0	99%
<i>Bacillus</i> sp. ZY-1-1	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> M75	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S499	0.0	99%
<i>Bacillus methylotrophicus</i> B25	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT-45	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CAU B946	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> Hx05	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> 8-2	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> 131-4	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> J7-1	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> NJAU-Z9	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> T20E-257	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LM2303	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y14	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> L-S60	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> L-H15	0.0	99%
<i>Bacillus subtilis</i> B-1	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> J01	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> ZL918	0.0	99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx

Description	E value	Identity
FenC [<i>Bacillus</i> sp. 916]	4e-168	88%
peptide synthetase [<i>Bacillus</i> sp. LK7]	4e-167	95%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	1e-165	90%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	1e-165	90%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	1e-165	90%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-165	89%
Fengycin non-ribosomal peptide synthetase FenC, partial [<i>Bacillus velezensis</i> M27]	2e-165	90%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-165	90%
Plipastatin synthase subunit C [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	2e-165	90%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-165	89%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	4e-165	90%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	4e-165	90%
peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	6e-165	89%
peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	6e-165	89%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	1e-164	90%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus subtilis</i>]	1e-164	89%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	1e-164	89%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus</i> sp. LYL4]	3e-164	89%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-164	89%
putative non-ribosomal peptide synthetase [<i>Streptococcus pneumoniae</i>]	4e-164	89%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน *fenC* ของแบคทีเรีย *B. siamensis* 2211 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานะข้อมูล

ลำดับเบสบางส่วนของยีน *sfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* ALB65 โดยมีค่า E value เท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity 99% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความเหมือนกันสูง ดังตารางที่ 4.13

จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx มีความคล้ายคลึงกับ non-ribosomal peptide synthetase [*Bacillus amyloliquefaciens*] โดยมีค่า E value ซึ่งจะบอกถึงความแตกต่างของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่าเท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity ซึ่งค่านี้บอกค่าความเหมือนของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่า $7e^{-156}$ แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความคล้ายคลึงกันสูง ดังตารางที่ 4.14

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 พบว่า แผนภูมิวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก ได้แก่ *Bacillus velezensis* CGMCC 11640, *Bacillus amyloliquefaciens* B15, *Bacillus velezensis* SGAir0473, *Bacillus velezensis* G341, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113, *Bacillus* sp. Lzh-5, *Bacillus velezensis* SCGB 574, *Bacillus velezensis* 157, *Bacillus velezensis* SRCM100072, *Bacillus velezensis* DKU_NT_04 และ *Bacillus velezensis* SRCM101413 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* ALB65, *Bacillus velezensis* 10075, *Bacillus subtilis* ATR2, *Bacillus* sp. SJ-10, *Bacillus* sp. BH072, *Bacillus amyloliquefaciens* Y2 และ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2 ซึ่งลำดับเบสบางส่วนของยีน *sfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 มีความใกล้เคียงกับกลุ่มที่สองมากกว่า ผลการวิเคราะห์

Bootstrap Analysis 1,000 ครั้ง พบว่ามีค่า Bootstrap เท่ากับ 67% มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus amyloliquefaciens* ALB65 ซึ่งถือว่ามีค่าต่ำ อาจเกิดจากข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลมีไม่มากพอ (Pamela S. Soltis and Douglas E. Soltis, 2003) ดังรูปที่ 4.17

ตารางที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

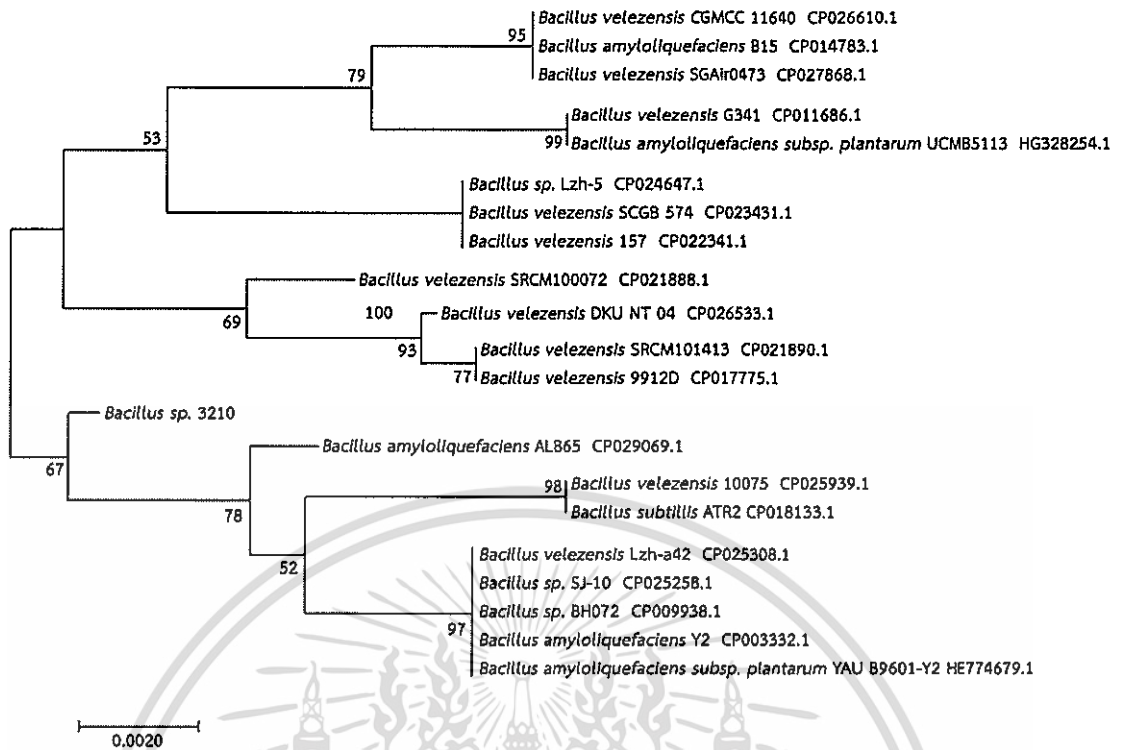
Description	E value	Identity
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ALB65	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM100072	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> Lzh-a42	0.0	99%
<i>Bacillus</i> sp. SJ-10	0.0	99%
<i>Bacillus</i> sp. BH072	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YAU B9601-Y2	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> DKU_NT_04	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> 10075	0.0	99%
<i>Bacillus subtilis</i> ATR2	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM101413	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> 9912D	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> G341	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> UCMB5113	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> SGAir0473	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> CGMCC 11640	0.0	99%
<i>Bacillus</i> sp. Lzh-5	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> SCGB 574	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> 157	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B15	0.0	99%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAA* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx

Description	E value	Identity
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	7e-156	100%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	8e-156	100%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-155	100%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	2e-155	100%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-155	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-155	100%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-155	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-155	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-155	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	3e-155	100%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-155	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-155	100%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus</i> sp. 916]	7e-155	99%
peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	7e-155	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus velezensis</i>]	8e-155	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus velezensis</i>]	8e-155	100%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus</i> sp. UNC69MF]	8e-155	99%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	9e-155	100%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	9e-155	99%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAA [<i>Bacillus</i> sp. 275]	9e-155	100%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน *srfAA* ของแบคทีเรีย *B. siamensis* 3210 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานะข้อมูล

ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus velezensis* DKU_NT_04 โดยมีค่า E value เท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity 99% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความเหมือนกันสูง ดังตารางที่ 4.15

จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx มีความคล้ายคลึงกับ non-ribosomal peptide synthetase, partial [*Bacillus velezensis*] โดยมีค่า E value ซึ่งจะบอกถึงความแตกต่างของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่าเท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity ซึ่งค่านี้บอกค่าความเหมือนของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่า $1e^{-104}$ แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความคล้ายคลึงกันสูง ดังตารางที่ 4.16

การสร้างแผนภูมิตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 พบว่า แผนภูมิวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก ได้แก่ *Bacillus velezensis* SRCM100072, *Bacillus velezensis* 9912D, *Bacillus velezensis* SRCM10141, *Bacillus velezensis* DKU_NT_04, *Bacillus velezensis* CN026, *Bacillus velezensis* AP183, *Bacillus velezensis* S141, *Bacillus velezensis* Lzh-a42, *Bacillus sp.* BH072, *Bacillus amyloliquefaciens* Y2 และ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* YAU B9601-Y2 และ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* ALB69, *Bacillus amyloliquefaciens* UMAF6614, *Bacillus velezensis* VCC-2003, *Bacillus velezensis* LM23DO2, *Bacillus velezensis* DR-08, *Bacillus velezensis* GQJK49, *Bacillus methylotrophicus* CBMB205, *Bacillus vallismortis* NBIF-001 และ *Bacillus velezensis* JTYP2 ซึ่งลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สาย

พันธุ์ 3210 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus velezensis* SRCM100072, *Bacillus velezensis* 9912D, *Bacillus velezensis* SRCM10141, *Bacillus velezensis* DKU_NT_04 และ *Bacillus velezensis* CN026 ผลการวิเคราะห์ Bootstrap Analysis 1,000 ครั้ง พบว่ามีค่า Bootstrap เท่ากับ 27% ซึ่งถือว่ามีค่าต่ำ อาจเกิดจากข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลมีไม่มากพอ (Pamela S. Soltis and Douglas E. Soltis, 2003) ดังรูปที่ 4.18

ตารางที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

Description	E value	Identity
<i>Bacillus velezensis</i> DKU_NT_04	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> CN026	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM101413	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> SRCM100072	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> 9912D	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ALB69	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> VCC-2003	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> Lzh-a42	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> UMAF6614	0.0	99%
<i>Bacillus</i> sp. BH072	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	0.0	99%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> YAU B9601-Y2	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> AP183	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> LM23DO2	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> DR-08	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> S141	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> GQJK49	0.0	99%
<i>Bacillus methylotrophicus</i> CBMB205	0.0	99%
<i>Bacillus vallismortis</i> NBIF-001	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> JTYP2	0.0	99%

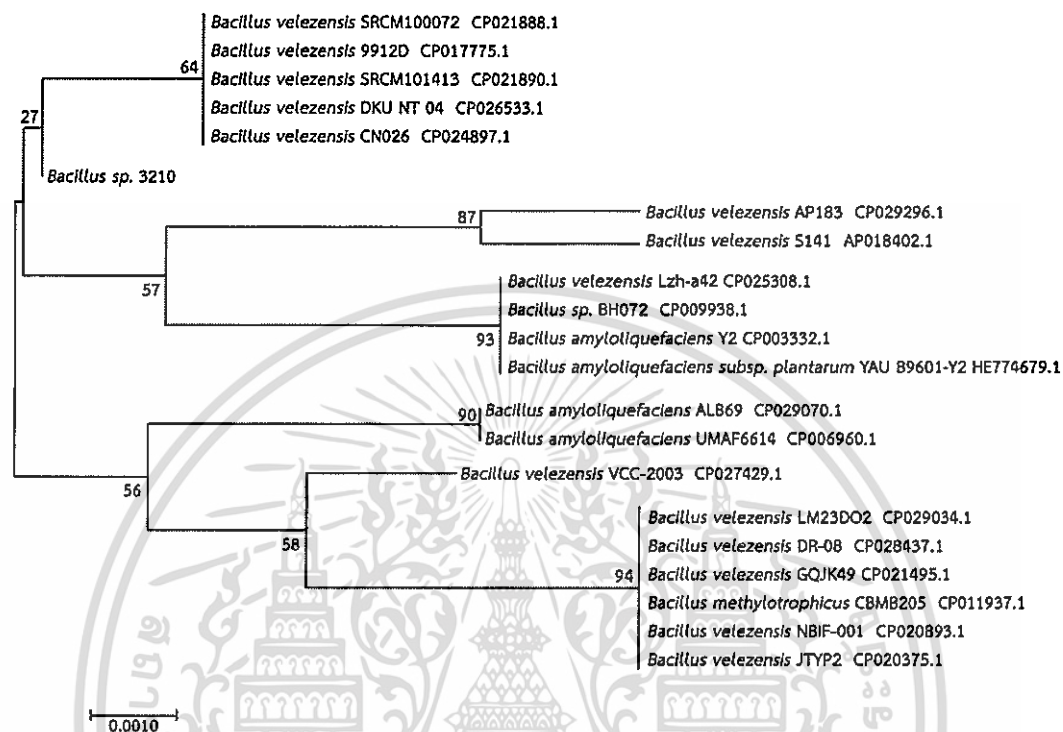
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *srfAC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

Description	E value	Identity
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	1e-104	99%
peptide synthetase	2e-99	92%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	2e-98	100%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	2e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	2e-98	100%
peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	3e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus</i> sp. RUPDJ]	3e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus subtilis</i>]	3e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-98	100%
MULTISPECIES: surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> group]	3e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus velezensis</i>]	3e-98	100%
surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus</i> sp. LYLB4]	3e-98	100%
MULTISPECIES: surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus</i>]	3e-98	100%

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือใช้เพื่อการค้าโดยไม่ได้รับอนุญาตจากมหาวิทยาลัยฯ หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อฝ่ายบริการลูกค้าสัมพันธ์ โทร. 02-2599-9999 หรือ e-mail: service@kmutt.ac.th

Description	E value	Identity
MULTISPECIES: surfactin non-ribosomal peptide synthetase SrfAC [<i>Bacillus</i>]	3e-98	100%



รูปที่ 4.18 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน *srfAC* ของแบคทีเรีย *B. siamensis* 3210 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานะข้อมูล

ลำดับเบสบางส่วนของยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus velezensis* SGAir04734 โดยมีค่า E value เท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity 99% แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความเหมือนกันสูง ดังตารางที่ 4.17

จากการเปรียบเทียบในฐานะข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx มีความคล้ายคลึงกับ non-ribosomal peptide synthetase [*Bacillus amyloliquefaciens*] โดยมีค่า E value ซึ่งจะบอกถึงความแตกต่างของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่าเท่ากับ 0.0 และมีค่า Identity ซึ่งค่านี้บอกค่าความเหมือนของลำดับเบสที่นำมาเปรียบเทียบ มีค่า 7^{e-156} แสดงว่าลำดับเบสของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบมีความคล้ายคลึงกันสูง ดังตารางที่ 4.18

การสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA Ver.7.0 พบว่า แผนภูมิวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* NAU-B3, *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426, *Bacillus velezensis* JS25R, *Bacillus velezensis* 157, *Bacillus velezensis* SCGB 574, *Bacillus subtilis* ATR2, *Bacillus* sp. Lzh-5, *Bacillus velezensis* 10075, *Bacillus amyloliquefaciens* ALB65, *Bacillus* 10075, *Bacillus amyloliquefaciens* ALB69 และ *Bacillus velezensis* Lzh-a42

และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Bacillus velezensis* BS-37, *Bacillus velezensis* LABIM40, *Bacillus subtilis* J-5, *Bacillus velezensis* TrigoCor1448, *Bacillus velezensis* TJ02, *Bacillus velezensis* L-1 และ *Bacillus velezensis* TB1501 ซึ่งลำดับเบสบางส่วนของยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 มีความใกล้เคียงกับกลุ่มแรก ผลการวิเคราะห์ Bootstrap Analysis 1,000 ครั้ง พบว่ามีค่า Bootstrap เท่ากับ 43% ซึ่งถือว่ามีค่าต่ำ อาจเกิดจากข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลมีไม่มากพอ (Pamela S. Soltis and Douglas E. Soltis, 2003) ดังรูปที่ 4.19

ตารางที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

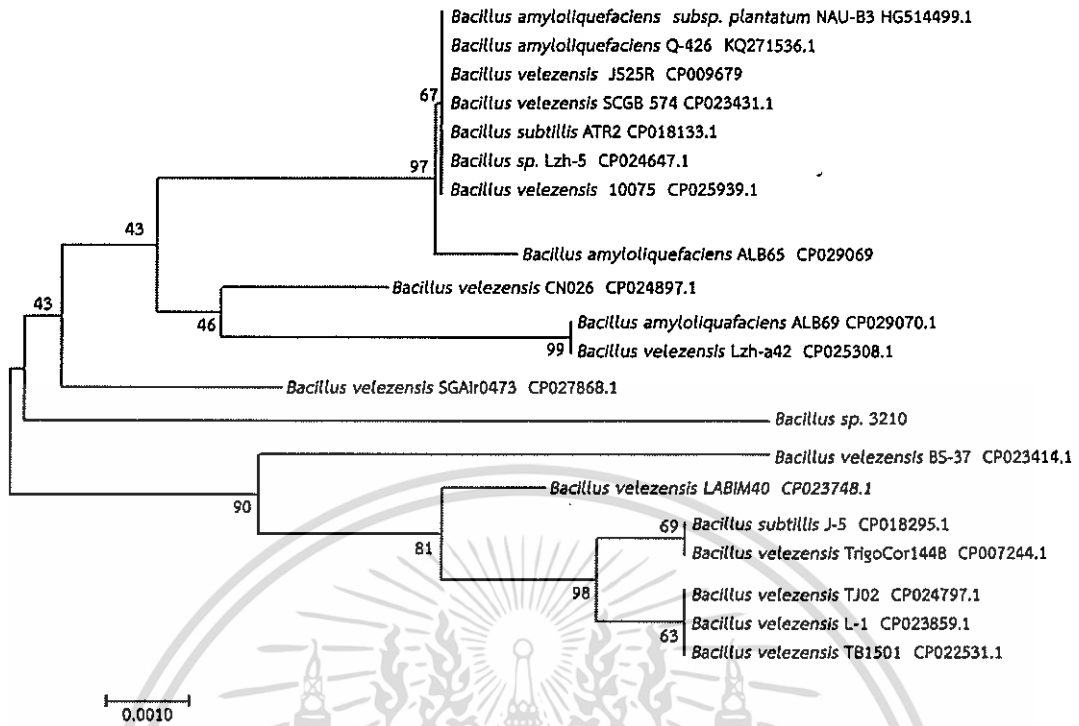
Description	E value	Identity
<i>Bacillus velezensis</i> SGAir0473	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> CN026	0.0	99%
<i>Bacillus velezensis</i> 10075	0.0	98%
<i>Bacillus</i> sp. Lzh-5	0.0	98%
<i>Bacillus subtilis</i> ATR2	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> SCGB 574	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> 157	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> JS25R	0.0	98%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> NAU-B3	0.0	98%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Q-426	0.0	98%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ALB65	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> TJ02	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> L-1	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> LABIM40	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> TB1501	0.0	98%
<i>Bacillus subtilis</i> J-5	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> TrigoCor1448	0.0	98%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ALB69	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> BS-37	0.0	98%
<i>Bacillus velezensis</i> Lzh-a42	0.0	98%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *fenC* ในแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastx

Description	E value	Identity
FenC [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus</i> sp. RUPDJ]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthase domain TIGR01720/amino acid adenylation domain-containing protein [<i>Bacillus</i> sp. RUPDJ]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase, partial [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
plipastatin synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
Plipastatin synthase subunit [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus</i> sp. 275]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus subtilis</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%
non-ribosomal peptide synthetase [<i>Bacillus velezensis</i>]	0.0	93%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

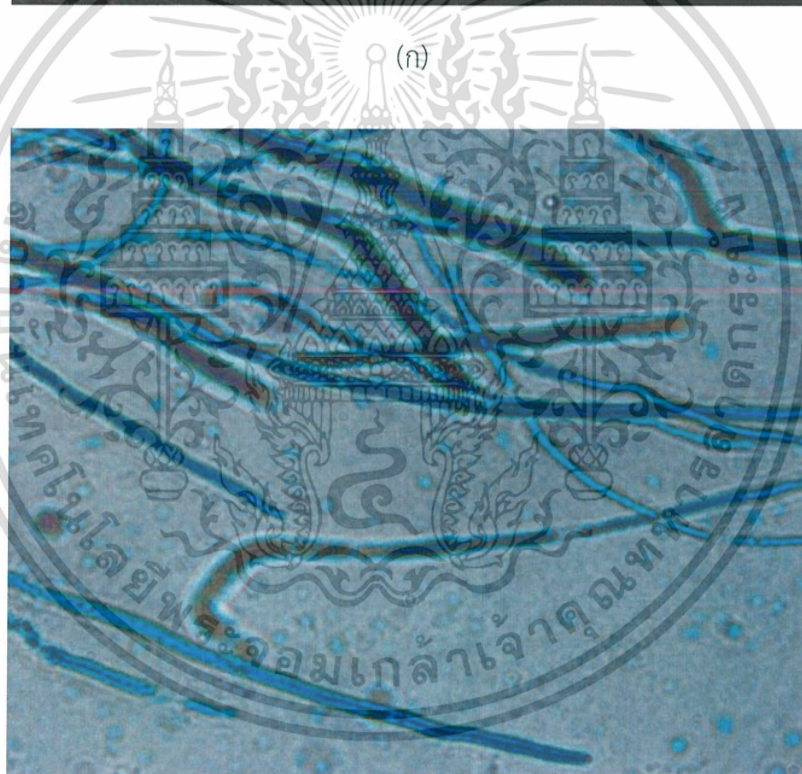
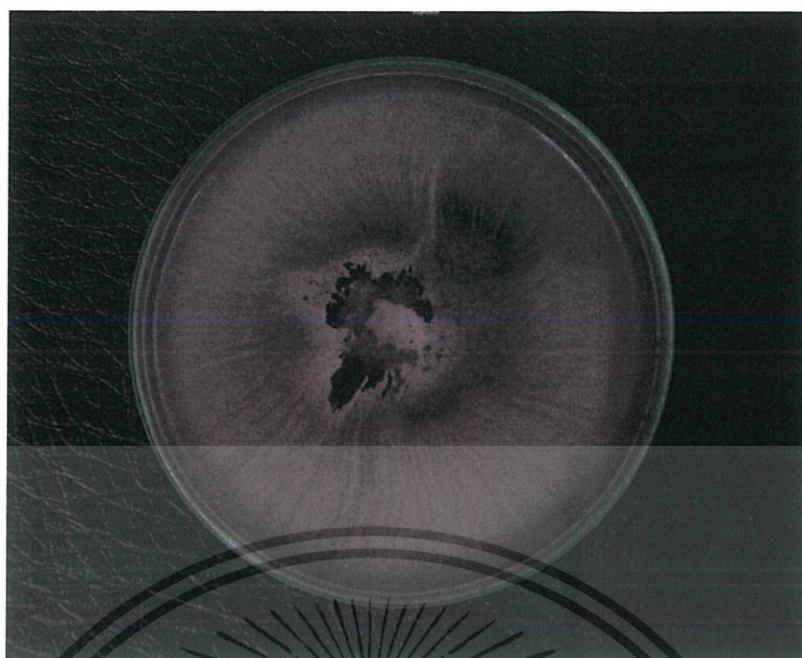


รูปที่ 4.19 แผนภูมิ Phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชิ้นส่วนยีน *fenC* ของแบคทีเรีย *B. siamensis* 3210 กับลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานะข้อมูล

4.7 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

จากการเลี้ยงเชื้อรา *P. oryzae* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021, *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยเส้นใยเชื้อราด้านที่มีแบคทีเรียเจริญได้น้อยหรือไม่มีการเจริญ ในขณะที่เส้นใยฝั่งตรงข้ามที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญเติบโตได้อย่างปกติ และเมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยปกติ ดังรูปที่ 4.20 พบว่าเส้นใยของเชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแทบจะไม่มี การเปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 4.21, 4.22 และ 4.23 อาจเนื่องจากข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ศึกษาเป็นกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบกำลังขยายสูงสุด 1000 เท่า เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้าได้เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* ร่วมกับ *Bacillus subtilis* และตรวจดูเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ด้วยกำลังขยาย 10,000 เท่า พบว่าเส้นใยมีการโป่งพองและผนังขรุขระต่างจากเส้นใยเชื้อราปกติ (Yuxia et al., 2016) และสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะใน *B. subtilis* พบว่าสามารถสร้างสารในกลุ่ม nonribosomal peptide ได้แก่ surfactin, fengycin และ bacilysin ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Torsten Stein, 2005)

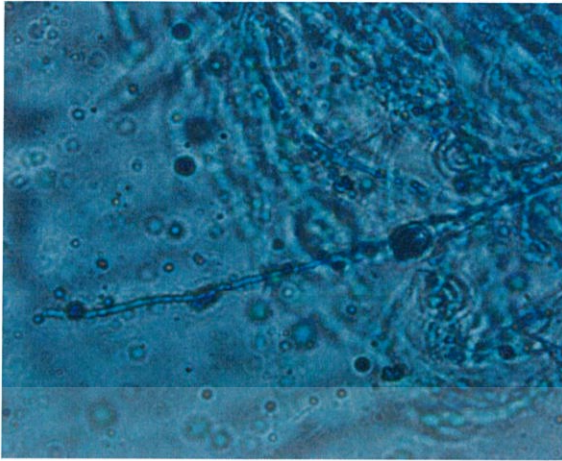
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



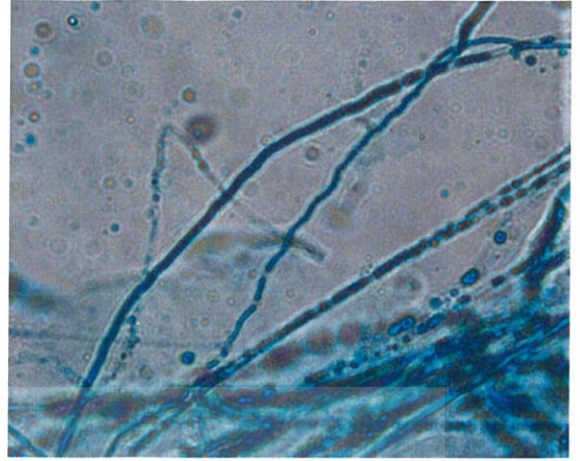
(ข)

รูปที่ 4.20 เชื้อรา *P. oryzae* บนอาหาร PDA นาน 7 วัน (ก) และ เส้นใยของเชื้อราเมื่อตรวจดูด้วย กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 1000 เท่า (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)



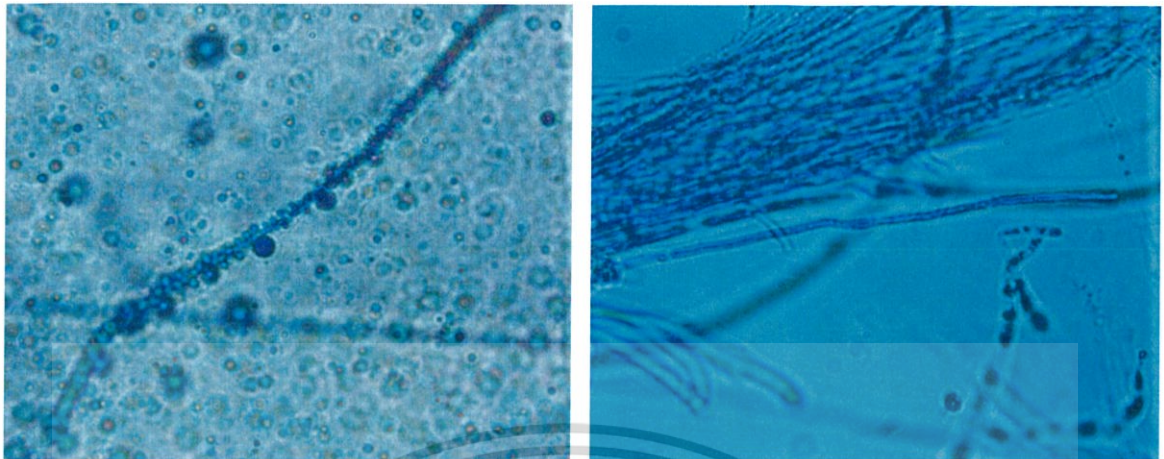
(ค)



(ก)

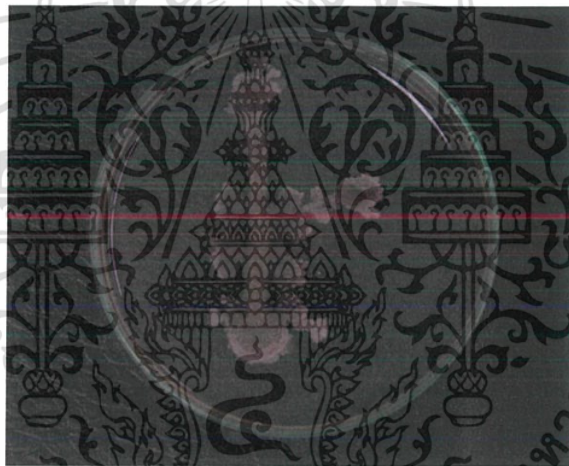
รูปที่ 4.21 ผลของแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021 ต่อเส้นใยเชื้อราเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในจานเลี้ยงเชื้อ (ก) และผลการตรวจสอบโครงสร้างเส้นใยเชื้อราที่เจริญในด้านเดียวกับแบคทีเรีย (ข) และด้านตรงข้าม (ค) เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบกำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

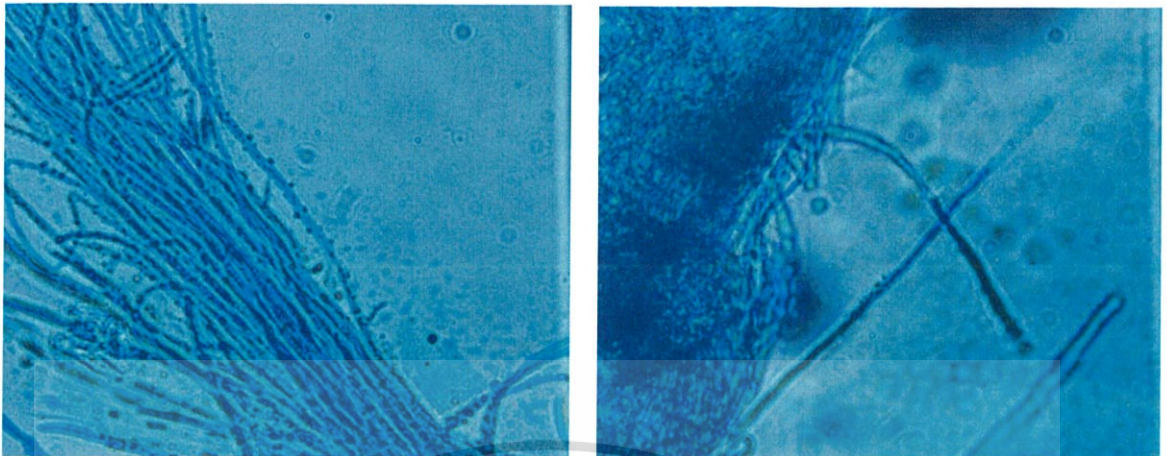
(ค)



(ก)

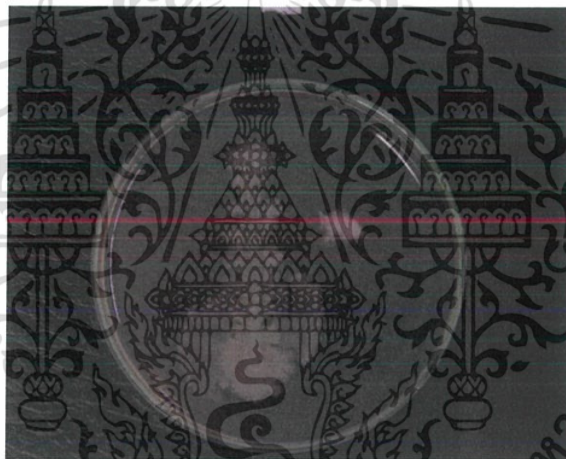
รูปที่ 4.22 ผลของแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 ต่อเส้นใยเชื้อราเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในจานเลี้ยงเชื้อ (ก) และผลการตรวจสอบโครงสร้างเส้นใยเชื้อราที่เจริญในด้านเดียวกับแบคทีเรีย (ข) และด้านตรงข้าม (ค) เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบกำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 4.23 ผลของแบคทีเรีย *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 ต่อเส้นใยเชื้อราเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในจานเลี้ยงเชื้อ (ก) และผลการตรวจสอบโครงสร้างเส้นใยเชื้อราที่เจริญในด้านเดียวกับแบคทีเรีย (ข) และด้านตรงข้าม (ค) เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบกำลังขยาย 1,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีนเกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะใน *Bacillus* spp. พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1021 มียีน *lchAA* และ *lchAC* *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2211 มียีน *srfAA*, *srfAC* และ *fenC* และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 3210 มียีน *srfAA*, *srfAC* และ *fenC* เมื่อนำลำดับเบสบางส่วนของยีน *lchAA*, *bacD*, *srfAA*, *srfAC* และ *fenC* มาทำไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR พบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ แต่เมื่อนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) กับชิ้นส่วนยีน *lchAA*, *srfAA*, *srfAC* และ *fenC* พบ *B. safensis* สายพันธุ์ 1021, *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ 3210 มีความแตกต่างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงจำนวน 20 ชนิด เพราะเมื่อนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้มีค่า Bootstrap analysis ที่ต่ำ อาจเกิดได้จากข้อมูลของแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลมีไม่มากพอ ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. safensis* 1021, *B. siamensis* 2211, *B. siamensis* 3210 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้งสามตัวและเส้นใยของเชื้อรา *P. oryzae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่าพบว่าเส้นใยแทบไม่มีความแตกต่างจากเส้นใยเชื้อราปกติ

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้เมื่อตรวจสอบเส้นใยเชื้อรา *P. oryzae* ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *B. safensis* สายพันธุ์ 1021, *B. siamensis* สายพันธุ์ 2211 และ *B. siamensis* สายพันธุ์ 3210 พบว่าเส้นใยของเชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแทบจะไม่มีเปลี่ยนแปลงไปจากเส้นใยของเชื้อราบริสุทธิ์ อาจเป็นเพราะข้อจำกัดของกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ ในการศึกษาหน้าควรใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อให้เห็นถึงความเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเชื้อรามากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

จักรพงษ์ หรั่งเจริญ, ถนิมนันต์ เจนอักษร และ พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2554. “การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium myriotylum* โดยแบคทีเรียเขตรากพืชจากระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน” วิทยานิพนธ์เทคโนโลยีรเกษตรบัณฑิต เทคโนโลยีการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วัชรระ ภูริวิโรจน์กุล. 2534. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคแมลง. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี,ปทุมธานี.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์, 2560. สินค้าส่งออก 10 อันดับของไทย [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www2.ops3.moc.go.th/>

Armin Fiechter. 1992. “Biosurfactants: moving toward industrial application.” *Trends biotechnol.* 10(6) : 208-127.

Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, et al. 2013. “Ribosomally Synthesized And Post-translationally Modified Peptide Natural Products: overview and recommendations for a universal nomenclature.” *Nat Prod Rep.* 30(1) :108–60.

Agrios, G. N. 1988. Plant pathology. 3rded. London : Academic press. Inc.

Baltz RH, Miao V, Wrigley SK. 2005. “Natural Products To Drugs: Daptomycin And Related Lipopeptide Antibiotics”. *Nat Prod Rep.* 22(6) :717–41.

Belshaw, P. J.; Walsh, C. T.; Stachelhaus, Torsten Stachelhaus.1999. “ Aminoacyl-CoAs As Probes Of Condensation Domain Selectivity In Nonribosomal Peptide Synthesis. *Science* 284(5413) : 486–489.

Borel JF, Baumann G, Chapman I, Donatsch P, Fahr A, Mueller EA, et al. 1996. “In Vivo Pharmacological Effects Of Ciclosporin And Some Analogues.” *Adv Pharmacol* 35 : 115–246.

Caboche S, Leclere V, Pupin M, Kucherov G, Jacques P. 2010. “Diversity Of Monomers In Nonribosomal Peptides: Towards The Prediction Of Origin And Biological Activity.” *J Bacteriol* 192(19) : 5143–50.

Felnagle, Elizabeth A, Emily E. Jackson, Yolande A. Chan, Angela M. Podevels, Andrew D. Berti, Matthew D. McMahon, and Michael G. Thomas. 2008. “Nonribosomal

Peptide Synthetases Involved In The Production Of Medically Relevant Natural Products” *Molecular Pharmaceutics*. 5(2) : 191-211.

Gan HY, Gan HM, Savka MA, Triassi AJ, Wheatley MS, Naqvi KF, Foxhall TE, Anauo MJ, Baldwin ML, Burkhardt RN, O'Bryon IG, Dailey LK, Busairi NI, Keith RC, Khair MHMM, Rasul MZM, Rosdi NAM, Mountzouros JR, Rhoads AC, Selochan MA, Tautanov TB, Polter SJ, Marks KD, Caraballo AA, Hudson AO. 2015. “Whole-Genome Sequencing And Annotation Of *Bacillus safensis* RIT372 And *Pseudomonas oryzihabitans* RIT370 From *Capsicum annuum* (bird’s eye chili) And *Capsicum chinense* (yellow lantern chili), respectively.” *Genome Announc*. 3(2): 00288-15.

Gautam, K. K., and Tyagi, V. K. 2006. “Microbial Surfactants: A Review.” *J. Oleo Sci*. 55 : 155–166.

Guo QG, Li SZ, Lu XY, Li BQ, Ma P. 2002. “PhoR/PhoP Two Component Regulatory System Affects Biocontrol Capability Of *Bacillus subtilis* NCD-2.” *Genet Mol Biol*. 33(2) : 333–40.

Gevers, W.; Kleinkauf, H.; Lipmann, F. 1968. “The Activation Of Amino Acids For Biosynthesis Of Gramicidin S.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 60 (1) : 269–76.

Hebert, T. T. 1971. “The perfect stage of *Pyricularia grisea*.” *Phytopathology*. 61 : 83-87

Jill E Maddison, A David J Watson, Jonathan Elliott. 2008. *Small Animal Clinical Pharmacology*. London : Elsevier Limited.

Juergen Loeffler, Holger Hebart, Ralf Bialek, Lars Hagemeyer, Diethard Schmidt, Francois-Prâseth Serey, Matthias Hartmann, Jan Eucker, and Hermann Einsele. 1999. “Contaminations Occurring In Fungal PCR Assays.” *Journal of Clinical Microbiology*. 37(4) : 1200-1202.

Konz D, Klens A, Schorgendorfer K & Marahiel MA. 1997. “The Bacitracin Biosynthesis Operon Of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716 Molecular Characterization Of Three Multi-Modular Peptide Synthetases. *Chem Biol* 4(12) : 927–937.

Kothari VV, Kothari RK, Kothari CR, Bhatt VD, Nathani NM, Koringa PG, Joshi CG, Vyas BRM. 2014. “Genomic sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain VK, isolated from saline desert area of Gujarat, India.” *Genome A*. 1(5) : 671-713.

- Kim, H.-K., Kim, G.-T., Kim, D.-K., Choi, W.-A., Park, S.-H., Jeong, Y.-K. & Kong, I.-S. 1997. "Purification And Characterization Of A Novel Fibrinolytic Enzyme From *Bacillus* sp. KA 38 Originated From Fermented Fish." *J Ferment Bioeng.* 84(4) : 307–312.
- Masataka Satomi, Myron T. La Duc and Kasthuri Venkateswaran. 2006. "*Bacillus safensis* sp. nov., Isolated From Spacecraft And Assembly-Facility Surfaces." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56 : 1735-1740.
- Nerurkar AS. 2010. "Structural And Molecular Characteristics Of Lichenysin And Its Relationship With Surface Activity." *Adv Exp Med Biol.* 672: 304–315.
- Nadim Naimur Rahman. 2007. "Bioinformatics: Analyzing DNA Sequence Using BLAST." Thesis submitted to the faculty of the BRAC University In partial fulfillment of the requirements of the degree of BACHELOR OF SCIENCE in Computer Science and Engineering.
- Ongena M, Jacques P. 2007. "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease bio-control." *Trends Microbiology.* 16 : 115–25.
- Punnanee Sumpavapol, Linna Tongyongk, Somboon Tanasupawat, Nipa Chokesajjawatee, Plearnpis Luxananil and Wonnop Visessanguan. 2010. "*Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 60 : 2364–2370.
- Pamela S. Soltis and Douglas E. Soltis. 2003. "Applying the Bootstrap in Phylogeny Reconstruction." *Statistical Science.* 18(2) : 256-267.
- Rajavel, M., and Gopal. 2006. "Crystallization And Preliminary X-ray Diffraction Studies On The Bicipin YwfC From *Bacillus subtilis*." *Structural Biology And Crystallization Communications.* 62(12) : 1259 –1262.
- Romero, Diego; de Vicente, Antonio; Rakotoaly, Rivo H.; Dufour, Samuel E.; Veening, Jan; Arrebola, Eva; Cazorla, Francisco M.; Kuipers, Oscar; Paquot, Michel; Perez-Garcia, Alejandro. 2007. "The Iturin And Fengycin Families Of Lipopeptides Are Key Factors In Antagonism Of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*." *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 20(4) : 430-440.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sigrid Steller, Andrea Sokoll, Christopher Wilde, Frank Bernhard, Peter Franke and Joachim Vater. 2004. "Initiation Of Surfactin Biosynthesis And The Role Of The SrfD-Thioesterase Protein." *Biochemistry*. 43(35) : 11331-11343.

Torsten Stein, 2005. "*Bacillus subtilis* Antibiotics: Structures, Syntheses And Specific Functions." *Molecular Microbiology*. 56(4) : 845-857

Tsuey-pin lin, Chyi-liang-chen, Li-kwan chang, Johannes scheng-ming tschen and Shih-tung liu. 1999. "Functional And Transcriptional Analyses Of A Fengycin Synthetase Gene, *fenC*, From *Bacillus subtilis*." *Journal Of Bacteriology*. 181(16) : 5060-5067.

von Döhren, H. 1990. "Nonribosomal Biosynthesis Of Peptide Antibiotics." *European Journal Of Biochemistry*. 192 : 1-15.

Walsh CT. 2004. "Polyketide And Nonribosomal Peptide Antibiotics: Modularity And Versatility." *Science*. 303 : 1805-1810.

Yuexia Sha, Qi Wang, and Yan Li. 2016. "Suppression Of *Magnaporthe oryzae* And Interaction Between *Bacillus subtilis* And Rice Plants In The Control Of Rice Blast." *SpringerPlus*. 5(1) : 1238.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

Stock culture medium

Potato Dextrose Agar

ส่วนประกอบต่อลิตร

Potato Dextrose Agar	39 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร : ชั่ง Potato Dextrose Agar ปริมาณ 39 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแรน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Tryptic Soy Agar

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tryptic Soy Broth	30 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร : ชั่ง Tryptic Soy Broth ปริมาณ 30 กรัม เติมวุ้น 15 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแรน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Tryptic Soy Broth

ส่วนประกอบต่อลิตร

Tryptic Soy Broth	30 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร : ชั่ง Tryptic Soy Broth ปริมาณ 30 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ปีเปตแบ่งลง Centrifuge tube ขนาด 50 ml ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียม Master mix ในปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

ปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 μ l

น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	7.92 μ l
ไพรเมอร์ F ความเข้มข้น 5mM	2 μ l
ไพรเมอร์ R ความเข้มข้น 5mM	2 μ l
5X Buffer A	4 μ l
2mM dNTP	2 μ l
<i>Taq</i> Polymerase	0.08 μ l
DNA	2 μ l

การเตรียม Master mix : ใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 7.92 μ l, ไพรเมอร์ F ความเข้มข้น 5mM ปริมาตร 2 μ l, ไพรเมอร์ R ความเข้มข้น 5mM ปริมาตร 2 μ l, 5X Buffer A ปริมาตร 4 μ l, 2mM dNTP ปริมาตร 2 μ l และ ใส่ *Taq* Polymerase ปริมาตร 0.08 μ l ใส่ลงใน Microtube ขนาด 200 μ l ที่มีดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 2 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงให้สารจจะกอนเข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้