การศึกษากิจกรรมต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส

STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM PASSION FRUIT

พงษ์พิสิษฐ์ กิตติลาภ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM PASSION FRUIT

PHONGPISIT GITTILAP

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIRMEMT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE

KIMG MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษากิจกรรมต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส

STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM PASSION FRUIT

ชื่อนักศึกษา นายพงษ์พิสิษฐ์ กิตติลาภ รหัสนักศึกษา 63050504

ปริญญา วิทยาศาตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2566

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กานต์ วงศาริยะ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร. โชคชัย กิตติวงค์วัฒนา ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร. วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการ	
ผศ.ดร. กานต์ วงศาริยะ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษากิจกรรมต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส

STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM PASSION FRUIT

ชื่อนักศึกษา นายพงษ์พิสิษฐ์ กิตติลาภ รหัสนักศึกษา 63050504

ปริญญา วิทยาศาตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2566

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเสาวรส ด้วยวิธี cross streak diffusion และ agar plug diffusion ผลจากการทดลองพบว่าไอโซเลท PFY1 และ PFY2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้งสามชนิด โดยให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 *Staphyloccus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ตามลำดับ ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธีทางจีโนไทป์ (genotypic characterization) โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA นำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานบนฐานข้อมูล Ezbiocloud พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA ของไอโซเลท PFY1 และ PFY2 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus velezensis* CR-502 *Bacillus siamensis* KCTC 13613 *Bacillus subtilis* NCIB 3610 และ *Bacillus amyloloquefaciens* DSM 7 ตามลำดับ

คำสำคัญ : แบคทีเรียเอนโดไฟท์ แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร เสาวรส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM PASSION FRUIT

Students Mr. Phongpisit Gittilap Student ID 63050504

Degree Bachelor of Science (Industrial Microbiology)

Department Biology

School Science

University of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)

Academic Year 2023

Advisor Asst. Prof. Dr. Karn Wongsariya

Abstract

The aim of this study is to determine antibacterial activity of endophytic bacteria isolated from passion fruit against the growth of bacteria causing foodborne illness by cross streak diffusion and agar plug diffusion methods. The result found that isolates, PFY1 and PFY2, could inhibit the growth of all tested strains. The highest antibacterial activity of endophytic bacteria was obtained after tested with *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Staphyloccus aureus* ATCC 25923, and *Bacillus subtilis* ATCC 6633, respectively. The result of genotypic characterization based on the nucleotide sequences of 16S rRNA from isolate PFY1 and PFY2 compared with nucleotide sequences of 16S rRNA of bacterial type strain in Ezbiocloud database revealed that isolate PYF1 and PYF2 were closely related with *Bacillus velezensis* CR-502, *Bacillus siamensis* KCTC 13613, *Bacillus subtilis* NCIB 3610, and *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7, respectively.

Keywords : Endophytic bacteria, Foodborne pathogenic bacteria, Passion fruit, Antibacterial activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดีจากการได้รับกรุณาจาก ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยาพนธ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ ที่จำเป็นเพื่อให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ผกากรอง วนไพศาล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และมอบองค์ความรู้สำคัญมาตลอดระยะเวลาการทำวิจัยฉบับนี้ ตลอดจนขอบพระคุณนักวิจัยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ นักวิจัยห้องปฏิบัติการ ภาคจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เป็นต่อการดำเนินงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณประธานกรรมการและคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำและข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ นักศึกษาระดับปริญญาตรีและพี่ๆ นักศึกษาปริญญาโทและนักศึกษาปริญญาเอกทุกท่านที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาตลอดจนนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณนางอัมพร กิตติลาภ และ นายพิทักษ์ กิตติลาภ มารดาและบิดาของข้าพเจ้าที่มีส่วนช่วยในการดำเนินงานวิจัยฉบับนี้ ตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจและเป็นส่วนหนึ่งในการทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินการวิจัยและจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้สำเร็จ

พงษ์พิสิษฐ์ กิตติลาภ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ค

สารบัญ.....ง

สารบัญตาราง.....ช

สารบัญรูป.....ฌ

คำย่อ/สัญลักษณ์ (ถ้ามี).....ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 1

1.3 ขอบเขตงานวิจัย..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 เอนโดไฟท์..... 3

2.2 แบคทีเรียเอนโดไฟท์..... 3

2.3 การกระจายเชื้อของแบคทีเรียเอนโดไฟท์เข้าสู่ในพืช.....3

2.4 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์..... 4

2.4.1 สารปฏิชีวนะ (Antibiotic).....5

2.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant agent).....5

2.5 เสาวรส.....5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.6 แบคทีเรียก่อโรค.....6

2.6.1 *Bacillus subtilis*.....6

2.6.2 *Kocuria rhizophila*.....6

2.6.3 *Staphylococcus aureus*.....6

2.7 ลักษณะทางจีโนไทป์.....7

2.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์.....7

2.8.1 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์.....7

2.8.1.1 หลักการสกัดดีเอ็นเอ.....7

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....8

3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้งาน.....8

3.2 สารเคมี.....10

3.3 เชื้อสำหรับทดสอบ.....11

3.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยาเบื้องต้น.....11

3.4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยา รูปร่าง การเรียงตัว การติดสีแกรม.....11

3.4.2 การศึกษาการเรียงตัวของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....11

3.5 การเตรียมเชื้อทดสอบ.....12

3.5.1 การเตรียมเชื้อทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟท์.....12

3.5.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร.....12

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์.....12

3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streak.....12

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar plugs.....13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.7 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 14

3.7.1 การเตรียมความเข้มข้นที่เหมาะสมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ สำหรับการสกัดสารพันธุกรรม (DNA) 14

3.7.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 14

3.7.3 การทำให้บริสุทธิ์และเพิ่มปริมาณสารทางพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR 15

3.7.4 การตรวจสอบการมีอยู่และคุณภาพของสารพันธุกรรมด้วยวิธี Gel electrophoresis 17

3.7.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการ Genotypic characterization โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16*S* rRNA 17

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 18

4.1 การเก็บตัวอย่าง และ การคัดแยกแบคทีเรีย 18

4.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยก 18

4.3 การคัดเลือกฤทธิ์ทางชีวภาพ 19

4.3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Cross Streak diffusion 19

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar plug diffusion 20

4.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลท PFY1 20

4.4.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์ 20

4.4.*2* ลักษณะการเจริญ 21

4.5 การคัดเลือกฤทธิ์ทางชีวภาพของไอโซเลท PFY2 21

4.5.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Cross Streak diffusion 21

4.5.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar plug diffusion 21

4.6 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลท PFY2 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

*4.*6.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์..... 22

4.6.*2* ลักษณะการเจริญ..... 22

4.7 การศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค..... 22

4.8 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์..... 23

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 26

เอกสารอ้างอิง..... 28

ภาคผนวก..... 32

ภาคผนวก ก..... 33

ภาคผนวก ข..... 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1. ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR.....15

3.2 PCR condition.....16

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสวรส.....18

4.2 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเสาวรสบนอาหาร TSAเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....19

4.3 ฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละไอโซเลทของ PFY1ด้วยวิธี Cross Streak diffusion...19

4.4 ฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละไอโซเลทของ PFY1 ด้วยวิธี Agar plug diffusion.....20

4.5 ฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละไอโซเลทของ PFY2ด้วยวิธี Cross Streak diffusion...21

4.6ฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละไอโซเลทของ PFY1 ด้วยวิธี Agar plug diffusion.....22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

3.1 แสดงการทำ Cross streak ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ.....13

3.2 แสดงการทำ Agar plug ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ.....14

3.3 PCR Product ของ 16S rRNA ที่สกัดจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสไอโซเลท PFY1และ PFY2.....23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
MHA	Mueller- Hinton agar
TSA	Tryptic Soy agar
TSB	Tryptic Soy broth
PCR	Polymerase chain reaction
Taq polymerase	Thermus aquaticuse DNA polymerase
PCA	Plate count agar
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
bp	Base pair

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันพบว่ามีปัจจัยหลายชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร โดยก่อให้พิษการติดเชื้อ การติดเชื้ออาจมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ เกิดการอักเสบบริเวณทางเดินอาหาร ซึ่งพบได้บ่อยครั้ง อาจมีผลข้างเคียงถึงขั้นเสียชีวิต ทำให้ส่งผลต่อการดำเนินชีวิตในประจำวันเป็นอย่างมาก หากกล่าวถึงการก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์ การติดเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียพบได้ในสิ่งแวดล้อม การรับประทานอาหาร หรือแม้กระทั่งการสัมผัส โยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนี้อาจก่อให้เกิดความเสียหายให้กับระบบทางเดินอาหารได้ เช่น ท้องเสีย ท้องร่วง และ ลำไส้อักเสบ เป็นต้น จากการศึกษาข้อมูลพบว่าแบคทีเรียที่ได้จากพืชหรือเรียกว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์นั้นสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด ในด้านของการแพทย์ ทางเภสัชกรรม อุตสาหกรรม และการเกษตร (Sun et al., 2014; Jia et al., 2016; Martinez-Kilmova et al., 2017) เช่นสารต้านฤทธิ์การเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค วิตามิน แร่ธาตุ และแบคทีเรียทำปฏิกิริยากับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร จากความน่าสนใจข้างต้นจึงทำการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากธรรมชาติ เพื่อยับยั้งการเกิดแบคทีเรียก่อโรคที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อระบบทางเดินอาหาร โดยทำการศึกษาเบื้องต้น นำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเสาวรส ซึ่งเป็นผลไม้ที่มีฤทธิ์ทั้งยังเป็นกรดและพบในง่ายทั่วไป นอกจากนี้พืชที่นำมาศึกษาฤทธิ์พบว่า สารที่ได้จากเสาวรสมีฤทธิ์ช่วยในระบบทางเดินอาหารและสามารถยับยั้ง ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae Staphylococcus aureus Pseudomonas* และ *Salmonella paratyphi* (Akanbi และคณะ) และจากใบของเสาวรสรวมถึงดอกของเสาวรสสามารถยับยั้งการเตริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Vibrio cholerae Eschericia coli* และ *Bacillua subtilis* (Ingale และ Hivrale, 2010)

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาการคัดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส มาทำการทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ดังนี้ *Bacillus Subtillis* ATCC 6633 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส

2) เพื่อจัดจำแนกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรสที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งประกอบไปด้วยการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง การศึกษารูปร่าง การเรียงตัวและการติดสีแกรม และทดสอบความสามารถการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค รวมถึงจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

2) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารจากสารสำคัญที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์สร้างขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนโดไฟท์ (Endophytes)

สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่สามารถพบในต้นไม้ได้ทุกชนิด ซึ่งความแตกต่างของเอนโดไฟท์กับจุลินทรีย์ก่อโรค คือ เอนโดไฟต์จะไม่ทำอันตรายต่อพืชแต่จุลินทรีย์ก่อโรคทำลายโครงสร้างของพืช เช่น การสร้างสารพิษของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามวงจรชีวิต ได้แก่ กลุ่ม obligate endophyte กลุ่ม facultative endophyte กลุ่ม passive endophyte เป็นต้น ซึ่งกลุ่มแรก ไม่สามารถเจริญภายนอกต้นไม้ได้ กลุ่มที่สอง สามารถเจริญผ่านทางรอยแผลของพืช กลุ่มสุดท้าย สามารถเจริญเข้าสู่ต้นพืชผ่านทางแผลเปิดที่ขนราก (Hardoim et al., 2008)

2.2 แบคทีเรียเอนโดไฟท์

แบคทีเรียเอนไฟท์ คือ ที่มีช่วงชีวิตหรือทั้งชีวิต อาศัยอยู่บริเวณ ราก กิ่ง ใบ ลำต้น เป็นต้น และสามารถคัดแยกชิ้นส่วนของพืชโดยนำมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์จะไม่ส่งผลที่เป็นด้านต่อพืชแต่ช่วยในด้านสร้างภูมิคุ้มกันของพืชให้มีความสัมพันธ์ที่เป็นโยชน์ซึ่งกันและกัน นอกจากได้รับประโยชน์จากพืช คือ สารอาหารและที่อยู่อาศัย ยังให้ประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อม ในทางตรง เช่น การตรึงไนโตรเจน การละลายฟอสเฟต และการผลิตฮอร์โมนพืช เช่นไซโตโคนิน (Cytokinins) ออกซิน (Auxin) เป็นต้น และในทางอ้อม ได้แก่ การแย่งชิงสารอาหาร (nutrient compettition) และ การผลิตสารแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค (production of antibacterial and antifungal agent) ซึ่งวงจรชีวิตนี้จะขึ้นอยู่กับชนิด และสุขภาพของพืช (Gaiero et al., 2013)

2.3 การกระจายเชื้อของแบคทีเรียเอนโดไฟท์เข้าสู่ในพืช

การเข้าสู่เซลล์พืชอาศัยของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ เนื่องจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถนำมาใช้เป็นสารอาหารได้ โดยวิธีการเข้าสู่เซลล์พืชอาศัยของแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีทั้งหมด 3 วิธี ได้แก่ การเกิดจากบาดแผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเนื้อเยื่อพืชบริเวณนั้น การผลิตเอนไซม์ที่ช่วยให้แบคทีเรียเข้าสู่ผนังเซลล์พืชได้ และ การอาศัยพาหะ เช่น แมลง ซึ่งในระยะแรกของการที่จะเข้าไปอาศัยในพืชแบคทีเรียจะเติบโตเริ่มจากชิ้นส่วน และ เซลล์ในชั้นที่ตายแล้ว (Dead Cortex cells) ซึ่งสามารถพบแบคทีเรียเอนโดไฟท์ได้หลากหลายสายพันธุ์ ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ เมื่อมีการเข้าสู่เซลล์รากพืชในระยะแรกแบคทีเรียจะเข้าอาศัยอยู่ระหว่างเซลล์แล้วเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ ภายในเซลล์ จากนั้นจึงเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณเนื้อเยื่อของท่อลำเลียง (Hurek et al., 1994; Hallmann et al., 1997; Kobayashi and Palumbo, 2000) นอกจากนี้ แบคทีเรียบางชนิดอาศัยโครงสร้างแฟลกเจลลา (Flagella) ในการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณต่างๆ เพื่อเข้าสู่เซลล์ (Campodónico et al., 2010; Mukherjee and Kearns, 2014; Ludueña et al., 2018) การดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับพืชอาศัยนั้น มีการพิสูจน์แล้วว่าแบคทีเรียสามารถกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำพืชให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อโรคที่เข้ามาทาลาย และ สามารถเจริญอยู่ได้ในสภาวะอากาศที่ไม่เหมาะสม

2.4 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์

แบคทีเรียเอนโดไฟท์มีความโดดเด่นในทางการประยุกต์นำมาใช้โดยสารที่แยกออกมาใช้คือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือสารที่ได้มาจากธรรมชาติ สารเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์กับสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างของสาร ได้แก่ สารปฏิชีวนะ (Antibiotics) สารต้านออกซิเดชั่น (Antioxidant) สารต้านมะเร็ง (Anticacer compounds) เป็นต้น ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะต้องมีประสิทธิภาพที่ดีและมีความเป็นพิษที่ต่ำต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต สารเหล่านี้สามารภประยุกต์ใช้มนทางด้านการแพทย์ ด้านเกษตรกรรม ด้านอุตสาหกรรม เป็นต้น

แบคทีเรียตัวอย่างจากการศึกษาที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีกิจกรรมในการต้านแบคทีเรียก่อโรคและเชื้อราก่อโรคในแบคทีเรียจีนัส Bacillus ซึ่งสามารถพบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน บริเวณโคนรากของพืช แต่จะมีความปลอดภัยและใช้ประยุกต์ในด้านเกษตรกรรม การแพทย์ และอุตสาหกรรม เป็นต้น

หนึ่งในจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดในฐานะเชื้อโรคที่สำคัญในมนุษย์หรือเกี่ยวข้องกับความเสียหายด้านคุณภาพสกุลบาซิลลัสเช่น*B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. pumilus และ B. Thuringiensis* ฯลฯ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่พบได้ตามธรรมชาติในดินและพืชพรรณ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *B. cereus* และ *B. anthrax* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ที่ทำให้เกิดโรคตัวแทนและ *B. subtilis, B. stearothermophilus* และ*B. amyloliquefaciens* เป็นแบคทีเรียหลักที่ทำให้เกิดการย่อยสลายของอาหารแปรรูป ดังนั้นการฆ่าสปอร์บาซิลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคและการเสื่อมสภาพจึงมีความสำคัญต่อการฆ่าเชื้ออาหารแปรรูป (Higgins and Dworkin, 2012; Higgins and Dworkin, 2012) Leuschner และ Lillford, 2003)

2.4.1 สารปฏิชีวนะ (Antibiotic)

ยาปฏิชีวนะ สารเคมีต้านจุลชีพที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปคือจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์อื่นๆ ยาปฏิชีวนะโดยทั่วไปผลิตโดยจุลินทรีย์ในดินและอาจเป็นตัวแทนวิธีการที่สิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อมที่ซับซ้อน เช่น ดิน ควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่แข่งขันกัน จุลินทรีย์ที่ผลิตยาปฏิชีวนะที่มีประโยชน์ในการป้องกันหรือรักษาโรค ได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อรา โดยสารปฏิชีวนะที่ได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารแบ่งเป็นหลายกลุ่ม เช่น อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (Yu et al., 2010) สารจำพวกนี้มีฤทธิ์ยับยั้งผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย และจำลองการต้านเชื้อแบคทีเรีย

2.4.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant agent)

สารต้านอนุมูลอิสระโดยปกติจะเกี่ยวข้องกับออกซิเจนหรือไนโตรเจนของสิ่งมีชีวิต สารนี้ถือเป็นโมเลกุลที่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่นของอีกโมเลกุลหนึ่งได้ อนุมูลอิสระสามรถกำหนดได้ว่าเป็นสารเคมีที่ทำปฏิกิริยาต่อเนื่องซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบหลานอย่างของสิ่งมีชีวิตได้ โดยทำหน้าที่เป็นตัว Oxidation หรือ Reduction โดยจะรับหรือบริจาคอิเล็กตรอนตามลำดับ ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอาจเกิดความไม่สมดุลระหว่างการผลิตอนุมูลอิสระและป้องกันสารต้านอนุมูลอิสระที่จำเป็น ดังนั้นการป้องกันความเสียหายเหล่านี้ จึงเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันไขมัน กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก และเอนไซม์ต่างๆได้ เป็นต้น ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็นทั้งจากร่างกายและอาหาร

2.5 เสาวรส

เสาวรส (Passion fruit) หรือกะทกรกฝรั่ง เป็นพืชที่อยู่ในสกุล Passiflora ในประเทศไทยพบ 2 ชนิดตามลักษณะสีของผลสุกได้แก่ พันธุ์ผลสีม่วง (*Passiflora edulis* Sims) และพันธุ์ผลสีเหลือง (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.) ในวงการอุตสาหกรรมการแปรรูปน้ำผลไม้ นิยมใช้เสาวรสเพราะในผลมีน้ำมาก มีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ผลสุกมีคุณค่าทางอาหารมาก จึงเหมาะสำหรับการนำมาบริโภคเป็นเครื่องดื่มหรืออาหารสุขภาพ และนอกจากส่วนเนื้อในผลที่มีประโยชน์มากแล้ว ในต่างประเทศมีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และทางการแพทย์มีการนำส่วนอื่นๆ ของเสาวรสมาใช้ประโยชน์ เช่น ดอก ใบ เปลือกผล ลำต้น และเมล็ด และพบว่ามีฤทธิ์ทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เภสัชวิทยาที่มีประโยชน์มากมาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบและบรรเทาปวด ลดความดันโลหิตสูง ลดไขมัน ต้านเบาหวาน ต้านมะเร็ง บรรเทาอาการหอบหืด และฤทธิ์คลายเครียดและความวิตกกังวล

2.6 แบคทีเรียก่อโรค

2.6.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรม สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ เคลื่อนที่ได้ มีรูปร่างคล้ายแท่ง แกรมบวก มักพบในดินและพืชพรรณที่มีอุณหภูมิการเจริญเติบโตที่เหมาะสมระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส *B. subtilis* มีความสามารถในการผลิตและหลั่งยาปฏิชีวนะ โครงสร้างจีโนมของจุลินทรีย์นี้มียีนเปปทิเดสช่วยส่งสัญญาณให้ยีนที่มีความสำคัญต่อการหลั่งยาปฏิชีวนะเหล่านี้ และยังสามารถหลั่ง polymyxin, difficidin, subtilin และ mycobacillin ได้ ยาปฏิชีวนะจะถูกหลั่งออกมาระหว่างการสร้างสปอร์เพื่อเพิ่มโอกาสรอดชีวิตของจุลินทรีย์และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีภาวะแข่งขันกัน B.subtilis ใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในการศึกษาการสร้างเอนโดสปอร์ในแบคทีเรีย เอนโดสปอร์ และพบว่ายัง สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรง เช่น การสัมผัสรังสียูวีและอุณหภูมิสูง (Serra CR et. Al., 2014), (Hirooka K. et. Al., 2014)

2.6.2 *Kocuria rhizophila*

Kocuria rhizophila เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการเรียงตัวเป็นคู่ สายโซ่สั้น และเป็นกระจุก มักก่อตัวเป็นโคโลนีทรงกลมสีขาวขนาด 2-3 มิลลิเมตรถูกนำมาใช้ทดสอบความเป็นหมัน เพื่อทดสอบประสิทธิผลของยาปฏิชีวนะและสารฆ่าเชื้อรา แลสำหรับการทดสอบความไวต่อยา doxycycline tetracycline และ chloramphenicol แบคทีเรียชนิดนี้ถือว่าเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสจาการศึกษาพบว่าผู้ที่ป่วยเป็นโรค *Kocuria rhizophila* เกิดขึ้นในเด็กอายุ 6 ขวบที่ติดเชื้อ Port-A-Carth ที่ปนเปื้อน ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน ซึ่งจะพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องเท่านั้น

2.6.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ถูกจัดให้อยู่ในวงศ์ Micrococcaceae เจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศแต่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ มีรูปร่างเป็นทรงกลม (coccus)ขนาด 0.5 – 1.0 ไมครอน แกรมบวก (Gram positive bacteria) มักเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่นหรือเป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ6-46 องศาเซลเซียส pH 4.0-10.0 แต่เจริญได้ดีที่ 35-40 องศาเซลเซียส pH 7.0-7.5 วอเตอร์แอคทิวิตี (water activity, aw) อยู่ในช่วง 0.85 – 0.99 สามารถทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกลือสูงถึง15-18% และทนต่อการฉายรังสี (food irradiation)

การบริโภคอาหารที่มีสารพิษเพียงน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม สามารถทำให้ผู้บริโภคเกิดอาหารเป็นพิษ Stapyhloenterotoxicosisและ Staphylorenterotoxemia โดยสร้างสารพิษเมื่อมีเชื้อเจริญอยู่100,000 เซลล์ต่อกรัม ในอาหารการตรวจไม่พบ หรือพบเชื้อปริมาณเล็กน้อยในอาหารไม่ได้หมายความว่าอาหารปลอดภัยจากสารพิษ เนื่องจากถ้ามีเชื้อปนเปื้อนอยู่ในอาหารระหว่างขั้นตอนการผลิตจนสามารถสร้างสารพิษได้ เมื่อผ่านกระบวนการผลิต ปริมาณเชื้อจะลดลงจนมีปริมาณน้อยและอาจตรวจไม่พบ แต่สารพิษยังคงอยู่ดังนั้นการผลิตอาหารจึงมีการควบคุมสุขลักษณะการผลิตให้ดีพอ

2.7 ลักษณะทางจีโนไทป์

การศึกษาเกี่ยวกับกรดนิวคลีอิกของจุลินทรีย์มีความสำคัญต่อยีนอย่างยิ่ง เนื่องจากการศึกษายีน 16 S rRNA ช่วยทำให้สามารรู้ถึงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นได้ ดังนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมากในการจัดอนุกรมวิธาน

2.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

2.8.1 การศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์

ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ไม่สามารถมองเห็นได้ แต่สามารถประเมินหรือวัด คำนวณค่าได้จากการทดลอง ถูกควบคุมโดย Gene ซึ่งอยู่ในโครโมโซมในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อควบคุมให้สิ่งมีชีวิตมีลักษณะต่างๆ เมื่อสิ่งมีชีวิตเจริญเติบโตขึ้นภายใต้สภาพแวดล้อมหนึ่งๆลักษณะทางพันธุ์จะส่งผลให้มีการปรับตัวอย่างค่อยเป็นค่อยไปทำเกิดรูปลักษณ์ที่เราสามารถมองเห็นได้

2.8.1.1 หลักการสกัดดีเอ็นเอ

หลักการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเริ่มจากการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มของแบคทีเรีย จากนั้นกำจัดออร์แกเนลล์อื่น ๆ ภายในเซลล์ที่ไม่ต้องการออกเพื่อให้ได้มาซึ่งดีเอ็นเอและในขั้นตอนสุดท้ายคือการตกตะกอนดีเอ็นเอและการทำให้ดีเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ ขั้นตอนที่ใช้ในการทำลายผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่ไม่ต้องการนั้นมี 3 วิธี คือ การทำลายโดยใช้สารเคมี การทำลายโดยใช้เอนไซม์และการทำลายโดยวิธีทางกล (Chauhan, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้งาน

3.1.1 บีกเกอร์

3.1.2 หลอดทดลอง

3.1.3 ปิเปตพลาสติก ขนาด 10 มิลลิลิตร

3.1.4 Micropipette ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.1.5 Micropipette Tip ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.1.6 ลูปสำหรับเขี่ยเชื้อ (Innoclating loop)

3.1.7 หลอดกาแฟ

3.1.8 โหลแก้ว

3.1.9 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.1.10 เครื่องปั่น (Vortex mixer)

3.1.11 เครื่องสเปกโครโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3.1.12 คีมคีบ (Forceps)

3.1.13 จานเพาะเชื้อแก้วขนาดเล็กและขนาดใหญ่ (Petri disc)

3.1.14 น้ำกลั่น (Distilation Water)

3.1.15 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.16 ขวด Duran ขนาด 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.17 ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อ

3.1.18 ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabinet Class I)

3.1.19 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator)

3.1.20 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

3.1.21 ตู้บ่มเชื้อสภาวะเขย่า (Shaker Incubator)

3.1.22 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำแรงดันสูง (Autoclave)

3.1.23 ตู้เย็นสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (Refrigerator)

3.1.24 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.25 ไม้พันสำลี (Cotton swab)

3.1.26 สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Slide and Coverslip)

3.1.27 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)

3.1.28 เครื่องชั่งสารแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision Balance 2 Dights)

3.1.29 กระบอกตวง ขนาด 10 100 และ 1000 มิลลิลิตร

3.1.30 กล่องใส่ทิปปลอดเชื้อ Pipette (tips box)

3.1.31 สำลีปลอดเชื้อ (Cottons)

3.1.32 แร็ควางหลอดทดลอง (Test Tube Rack Stainless)

3.1.33 ช้อนตักสารสแตนเลส (Stainless spatula)

3.1.34 กระดาษเช็ดเลนส์ (Lens tissue paper)

3.1.35 พาราฟิล์ม เอ็ม (Parafilm M)

3.1.36 กระดาษกรอง วอทแมน (Filter paper Grade 1 diameter 90 mm Whatman)

3.1.37 เครื่องอิเล็กโตรโฟไลซิส (Electrophoresis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.38 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine)

3.1.39 เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)

3.1.40 กระบอกสแตนเลสใส่จานเพาะเชื้อ (Petri dish can)

3.1.41 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.1.42 ไฟแช็ค (Gas Lighter)

3.1.43 เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ (Pipette controller)

3.1.44 ชุดคิทส์ทดสอบการสกัดดีเอ็นเอชุด BIOFACT™ Genomic DNA Prep Kit For Gram (+) Bacterium

3.1.45 กระดาษทำความสะอาดอเนกประสงค์

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 75% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v)

3.2.2 สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v)

3.2.3 Normal Saline 0.89% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v)

3.2.4 Phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4)

3.2.5 Tryptic Soy Broth (TSB)

3.2.6 Plate count agar (PCA)

3.2.7 Agar Powder

3.2.8 Mueller Hinton Broth (MHB)

3.2.9 สารละลายคริสตัลไวโอเลต

3.2.10 สารละลายซาฟรานิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.11 สารละลายไอโอดีน

3.2.12 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v)

3.2.13 อิมเมอร์ชั่นออยล์

3.3 เชื้อสำหรับทดสอบ

3.3.1 *Bacillus Subtillis* ATCC 6633

3.3.2 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

3.3.3 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.4.การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

3.4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยา รูปร่าง และการเรียงตัว การติดสีแกรม

ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเสาวรสลงบนอาหาร TSA ด้วยวิธี Cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จดบันทึกการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งโดยสังเกต ขนาด สี ขอบ ความนูน ของโคโลนี

3.4.2 การศึกษาการเรียงตัวของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์บนอาหารอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการทำ Gram stain เพื่อย้อมดูการเรียงตัวศึกษาลักษณะการจัดเรียงตัวของของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายทั้งหมด 100 เท่า โดยนำน้ำกลั่นหยดลงบนสไลด์ และใช้ Loop ลากเชื้อจากอาหารแข็ง TSA ให้ทั่วพื้นผิว รอให้แห้ง ลนไฟตรึงผิวเชื้อ หยด Crystal Violet ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ชำระล้างสีออก หยด Iodine ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยด Alcohol 95% ลง 10-15 หยด ล้างออกด้วยน้ำกลั่น และหยด Safranin ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตการติดสีของเชื้อทั้งสองตัว และการเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเตรียมเชื้อทดสอบ

3.5.1 การเตรียมเชื้อทดสอบแบคทีเรียเอนโดไฟท์

นำเชื้อทดสอบจากอาจารย์ Cross Streak เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ลงบนอหาร Trystic soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งและระยะเวลาที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีแล้วทำการบันทึกผล

3.5.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

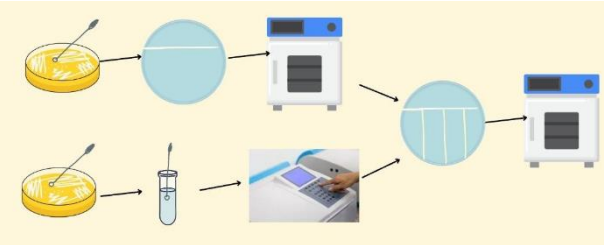
นำเชื้อทดสอบจากตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส cross – streak เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis Kocuria rhizophila* และ *Staphylococcus aureus* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อบนอาหารแข็ง

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์

3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streakDiffusion

เตรียมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ใช้ในการทดสอบ โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงบนอาหาร TSA ด้วยวิธี Cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อที่เจริญได้ดีที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงสำหรับเชื้อที่เจริญได้ดีที่ 48 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวขีดลงบนอาหาร MHA Agar สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร เพื่อให้แบคทีเรียเอนโดไฟท์ผลิตสาร Secondary metabolite จากนั้นเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร TSA สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร ด้วยวิธี Cross streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำ Dilute Suspension โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็ง TSA ลงในหลอดทดลองที่มี Normal saline 0.89% ในการทำเจือจางเพื่อวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.8-0.13 แล้วจึงขีดลงบนอาหาร MHA Agar สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร โดยสังเกตลักษณะ clear zone พร้อมทั้งวัดระยะที่เกิดขึ้นโดยใช้ไม้บรรทัด และบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

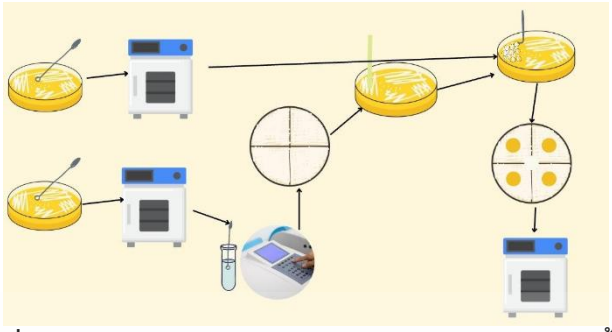


รูปที่ 3.1 แสดงการทำการ Cross streak ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar Plugs Difussion

เตรียมเชื้อทดสอบโดยเพาะเชื้อลงบนอาหาร TSA ด้วยวิธี Cross Streak บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาเพาะเชื้ออีกครั้ง โดยเพาะเชื้อด้วยวิธี Cross Streak ให้รอยแรกมีความหนาของเชื้อที่มากสำหรับการทำ Plugs บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียเอนโดไฟท์สร้างสาร Secondary Metabolite จากนั้นเตรียมเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร เพาะเชื้อลงบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำ Dilute Suspension โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็ง TSA ลงในหลอดมี Normal saline 0.89% ในการทำเจือจางเพื่อวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.8-0.13 แล้วจึงนำมา Swab โดยใช้สำลีก้านในการ Swab เชื้อให้ทั่วบนอาหาร MHA สำหรับใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร ทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้น เตรียมหลอดกาแฟปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนอาหาร TSA เพื่อใช้เป็น Control ในการวาง Plugs ของเชื้อแบคทีเรียเอนไฟท์เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยนำหลอดกาแฟปลอดเชื้อเจาะบนรอย Streak รอยแรก บนอาหาร TSA ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบนผิว Plugs ให้มีความหนาแน่นที่น้อยลงของเชื้อ เพราะเนื่องจากเป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการเจริญของเชื้อที่มีความหนาแน่นของตัวเชื้อ ภายหลังนำ Plugs แบคทีเรียเอนไฟท์ที่ได้และ Control นำมาวางบนอาหาร MHA ที่ Swab เชื้อแบคทีเรียก่อโรคแล้วด้วย Bent Needle บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สังเกตลักษณะ clear zone พร้อมทั้งวัดระยะที่เกิดขึ้นโดยไม้บรรทัด และบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 แสดงการทำ Agar plugs ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.7 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

3.7.1 การเตรียมความเข้มข้นที่เหมาะสมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ สำหรับการสกัดสารพันธุกรรม (DNA)

เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง TSA ในสภาวะปกติที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB แล้วบ่มในสภาวะเขย่า 175 รอบต่อนาที 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.7.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

สกัดสารพันธุกรรมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์โดยใช้ชุด BIOFACT^{TM} Genomic DNA Prep Kit For Gram(+) Bacterium เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 สายพันธุ์ลงบนอาหารแข็ง TSA โดยวิธีการ Cross streak นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว TSB นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 175 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 12-16 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับค่าความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1 x 10^8 CFU/mL) จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลังจากนั้นใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปซึ่งสามารถอธิบายวิธีการได้ดังนี้

1) เติม GD1 200 ไมโครลิตร ซึ่งได้ผสมกับเชื้อปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร(ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1 x 10^8 CFU/mL) เติม Lysozyme (10 mg/ml) 2 ไมโครลิตร เขย่าสารทั้งหมดด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2) เติม GD2 200 ไมโครลิตร ซึ่งจะผสมกับ Proteinase (20 mg/ml) 5 ไมโครลิตร และ RNase A (4 mg/ml) 2 ไมโครลิตร เขย่าสารทั้งหมดด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น บ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที

3) ดูดสารละลายส่วนใสลงหลอดไมโครทิวป์อันใหม่และเติม GB 200 ไมโครลิตร ทำการผสมสารโดยใช้นิ้วผสม จำนวน 10-20 ครั้ง

4) ทำการใส่ Spin Column ประกอบกับ Collection Tube ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติม Help B buffer 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อวินาที เป็นเวล 30 วินาที

5) ทิ้งของเหลวส่วนใสที่ไม่ต้องสารออกและใส่สารลงบน Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 7,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสที่ต้องการจาก Spin Column ลงใน ไมโครทิวป์อันใหม่ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

6) เติม WB (80% Ethanol) โดยปริมาตรต่อปริมาตร (V/V) 500 ไมโครลิตร ลง Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 วินาที และดูดส่วนใสที่ไหลผ่าน Spin Column ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง

7) นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3 นาที ทำการทิ้งส่วนที่เป็นของเหลวที่ผ่าน Spin Column ย้าย Spin Column ใส่ลงไมโครทิวป์อันใหม่ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร

8) เติม DNA Hydration Solution 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้ง Spin Column หลังจากนั้นตรวจสอบความถูกต้องสำหับการที่ทำให้บริสุทธิ์ของการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้วุ้น Agarose 1% (w/v)

3.7.3 การทำให้บริสุทธิ์และเพิ่มปริมาณสารทางพันธุกรรม ด้วยวิธี PCR

ทำการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายบริเวณ 16s rRNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCA -3’) และไพรเมอร์ 1492R 5’-(GGTTACCTTGTTACGACTT-3’)

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร)

ลำดับที่	สารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรที่ใช้
1	27F	10 µM	5.0 µL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2	1492R	10 µM	5.0 µL
3	dNTPs	2 mM	2.5 µL
4	Standard Taq Buffer	10X	5.0 µL
5	Taq DNA Polymerase	5U/ µL	0.1 µL
6	Delonizef Water (DI)	-	30.4 µL
7	DNA Template	-	2.0 µL
8	Total	-	50 µL

นำส่วนของผสมของปฏิกิริยา ไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermo cycle (GeneAmp® PCR System 2700) ด้วยสภาวะอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา (Thermal reaction condition) ดังแสดงใน

ตารางที่ 3.2 PCR condition

PCR condition 35 Cycles		
Stage	Temp (องศาเซลเซียส)	Time (วินาที)
Initial denaturation	94	180
Denaturation	94	30
Annealing	55	60
Extension	72	90
Final Extension	72	180

ซึ่งในหลอดปฏิกิริยาจะประกอบด้วย ในปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารพันธุกรรมแม่แบบ (DNA template) 2 ไมโครลิตร dNTPs 25 ไมโครลิตร 10X Standard Taq Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 304 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Thermo cycle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(GeneAmp® PCR System 2700) โดยมีกระบวนการดังนี้ กระบวนการ Initial denaturation อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 35 รอบ การแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturing step) 94 องศาเซลเซียส 1 นาที การเข้าคู่สายใหม่ของดีเอ็นเอ (Annealing step) อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอ (Extension step) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที และเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอสุดท้าย (Final extension) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 12 นาที

3.7.4 การตรวจสอบการมีอยู่และคุณภาพของสารพันธุกรรมด้วยวิธี Gel electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ใช้ agarose gel 1.5% (w/v) โดยชั่งผง Agarose 4.5 กรัม ใส่ลงใน 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer 30 มิลลิลิตร นำไปละลายในไมโครเวฟจนเข้ากันดีแล้วจึงเทลงในถาด (Tray) ที่ประกอบหวี (Comb) ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวนำใส่ลงใน Chamber บนเครื่อง Gel Electrophoresis โดยให้ด้านที่มีหลุมบนเจลอยู่ทางขั้วลบ จากนั้นเท 1X TBE จนท่วมถาด ผสม PCR BIO Ladder I กับ Loading dye 1 ไมโครลิตร แล้วปิเปตลงบนหลุมแรกของเจล ผสมผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ 4.5 ไมโครลิตรผสมกับ Safe dye 0.5 ไมโครลิตร Loading dye 1 ไมโครลิตร รันด้วยกำลังไฟฟ้า 80 โวลต์ 45 นาที ตรวจสอบขนาดและเปรียบเทียบตำแหน่งของผลิตภัณฑ์บนเจลด้วยเครื่อง Gel Doc system (ImageLab6.0) แล้วจึงส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.7.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการ Genotypic characterization โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA

นำ PCR product ที่ได้ ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท SolGent Co.,Ltd., สาธารณรัฐเกาหลี โดยใช้ universal primer 2 คู่ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16S rRNA ได้แก่ 27F/1492R primer หลังจากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล GenBank แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม bioedit และ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานในฐานข้อมูล Ezbiocould (www.ezbiocloud .net/eztaxon)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่าง และการคัดแยกแบคทีเรีย

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาหาฤทธิ์ยับยั้งจากตัวอย่างเสวรสนำมาจากตู่ -80 °C แยกออกเป็นจำนวนทั้งหมด 2 ไซเลท คือ PFY1 และ PFY2 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสวรส

สถานที่นำตัวอย่างมาศึกษา	ตัวอย่าง	ไอโซเลต
ตู้ -80 °C	เสาวรส	PFY1
		PFY2

4.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยานเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยก

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้ตัวอย่างคือเสาวรส จำนวน 2 ไอโซเลต พบว่าเป็นแบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก การติดสีเป็นสีม่วงเกาะกันเป็นกลุ่มและ การเรียงตัว

ไอโซเลท PFY1 เป็นแบคทีเรียเป็นเชื้อที่มีความหนาแน่นของเชื้อค่อนข้างมาก พื้นผวโดโลนีลักษณะเป็นแผ่น มีขอบหยัก สีขาวขุ่น แบคทีเรียเรียมีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่ม ติดสีแกรมสีม่วง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ดีบนอาหาร TSA

ไอโซเลท PFY2 เป็นแบคทีเรียเป็นเชื้อที่มีความหนาแน่นของเชื้อค่อนข้างมาก พื้นผิวโคโลนีลักษณะเป็นแผ่นมีขอบหยัก สีขาวขุ่น ซึ่งมีลักษณะการเจริญที่หนาแน่น กว่า ไอโซเลท PFY1 แบคทีเรียเรียมีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่ม ติดสีแกรมสีม่วง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ดีบนอาหาร TSA (ตารางภาคผนวกที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเสาวรสบนอาหาร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ลักษณะการเจริญ	สีโคโลนีของเชื้อ	การติดแกรม/การจัดเรียงตัว
PFY1	เจริญได้ดี	ขาวขุ่น	ติดสีม่วงแกรมบวก เป็นกลุ่มและกระจายตัว
PFY2	เจริญได้ดี	ขาวขุ่น	ติดสีม่วงแกรมบวก เป็นกลุ่มและกระจายตัว

4.3 การคัดเลือกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Cross Streak diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Coss Streak diffusion ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากตัวอย่างเสาวรส ผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 2 ไอโซเลท แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ คือ ไอโซเลท PFY 1 โดยแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกได้ทั้งหมด

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละไอโซเลทด้วยวิธี Cross Streak diffusion

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	ไอโซเลท/บริเวณยับยั้ง (มม.)		ค่าเฉลี่ย
	PFY1.1	PFY1.2	
Bacillus subtilis 1	5	5	5±0.00
Kocuria rhizophila 1	15	17	16±1.41
Staphylococcus aureus 1	14	15	14.5±0.70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar plug diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar plug diffusion ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากตัวอย่างเสาวรส ผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 1 ไอโซเลท แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ คือ ไอโซเลท PFY 1 โดยแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกได้ทั้งหมด ผู้ทดลองจึงมีความสนใจนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ PFY1 มาทำให้บริสุทธิ์ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และพิสูจน์จัดจำแนกสายพันธุ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA สืบไป

ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละไอโซเลทด้วยวิธี Agar Plug diffusion

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	ไอโซเลท/บริเวณยับยั้ง (มม.)						ค่าเฉลี่ย	
	PFY1.1			PFY1.2			PFY1.1	PFY1.2
Bacillus subtilis 1	9	9	9	9	10	9	9±0.00	9.33±0.58
Kocuria rhizophila 1	11	12	11	12	12	12	11.33±0.58	12±0.00
Staphylococcus aureus 1	11	10	12	10	12	11	11±1.00	11±1.00
Bacillus subtilis 2	9	10	9	10	9	10	9.33±0.58	9.67±0.58
Kocuria rhizophila 2	10	11	11	13	13	13	10.67±0.58	13±0.00
Staphylococcus aureus 2	11	11	11	12	12	13	11±0.00	12.33±0.58

4.4 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลท PFY1

4.4.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

การศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท PFY1 ที่เจริญบนอาหาร TSAเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท PFY1 จัดเป็นแบคทีเรียชนิด โคโลนีสีขาวขุ่นผิวเรียบมีรอยหยัก โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ลักษณะการเจริญ

เป็นแผ่นมีขอบหยัก สีขาวขุ่น แบคทีเรียเรียมีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่ม ติดสีแกรมสีม่วง เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ดีบนอาหาร TSA

4.5 การคัดเลือกฤทธิ์ทางชีวภาพของไอโซเลท PFY2

4.5.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Cross Streak diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Cross Streak diffusion ของแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากตัวอย่างเสาวรส ผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 2 ไอโซเลท แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ คือ ไอโซเลท PFY 1 โดยแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกได้ทั้งหมด

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละไอโซเลทด้วยวิธี Cross Streak Diffusion

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	ไอโซเลท/บริเวณยับยั้ง (มม.)		ค่าเฉลี่ย
	PFY2.1	PFY2.2	
Bacillus subtilis 2	5	7	6±1.41
Kocuria rhizophila 2	15	14	14.5±0.70
Staphylococcus aureus 2	15	14	14.5±0.70

4.5.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar plug diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar plug diffusion ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากตัวอย่างเสาวรส ผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 1 ไอโซเลท แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ คือ ไอโซเลท PFY 1 โดยแสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกได้ทั้งหมด ผู้ทดลองจึงมีความสนใจนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ PFY1 มาทำให้บริสุทธิ์ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แลพิสูจน์จัดจำแนกสายพันธุ์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA สืบไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละไอโซเลทด้วยวิธี Agar Plug Difussion

เชื้อแบคทีเรียก่อโรค	ไอโซเลท/บริเวณยับยั้ง (มม.)						ค่าเฉลี่ย	
	PFY2.1			PFY2.2			PFY2.1	PFY2.2
Bacillus subtilis 1	11	11	11	10	11	10	11±0.00	10.33±0.58
Kocuria rhizophila 1	11	11	12	11	12	11	11.33±0.58	11.33±0.58
Staphylococcus aureus 1	12	12	11	12	13	12	11.67±0.58	12.33±0.58
Bacillus subtilis 2	11	11	11	10	10	10	11±0.00	10±0.00
Kocuria rhizophila 2	10	9	9	10	10	10	9.33±0.58	10±0.00
Staphylococcus aureus 2	14	14	14	11	11	12	14±0.00	11.33±0.58

4.6 การศึกษาอนุกรมวิธานของไอโซเลท PFY2

4.6.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

การศึกษาลักษณะสัณฐานทางวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท PFY2 ที่เจริญบนอาหาร TSAเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท PFY2 จัดเป็นแบคทีเรียชนิดโคโลนีสีขาวขุ่นผิวเรียบมีรอยหยัก โดยการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์แบคทีเรียมีรูปร่างกลม

4.6.2ลักษณะการเจริญ

พื้นผิวโคโลนีลักษณะเป็นแผ่นมีขอบหยัก สีขาวขุ่น ซึ่งมีลักษณะการเจริญที่หนาแน่น กว่า ไอโซเลท PFY1

4.7 การศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

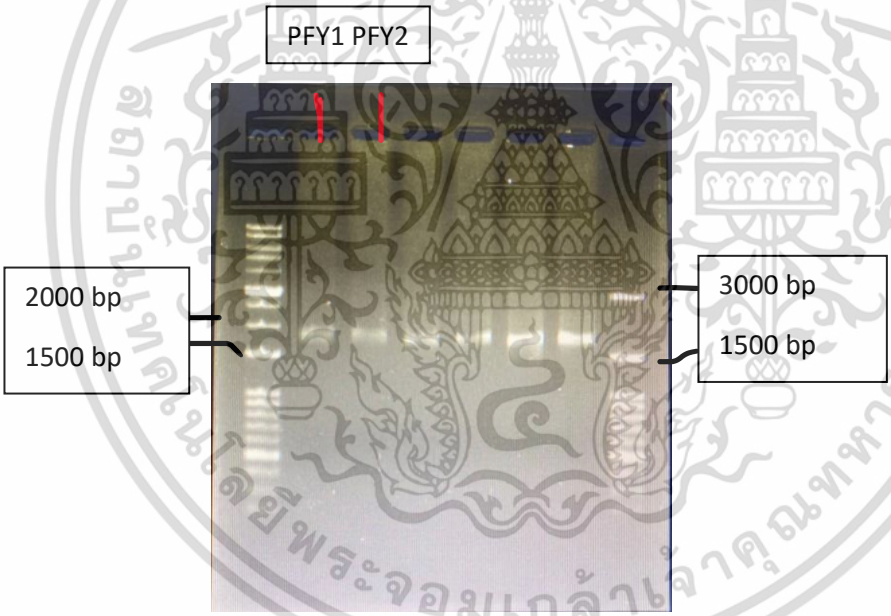
จากการศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีความสามรถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเสาวรส จำนวน 2 ไอโซเลท พบว่าวิธี Cross streak มีผลการการศึกษาพบว่าไอโซเลท PFY1 และ PFY2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis Kocuria rhizophila*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Staphylococcus aureus* หลังจากนั้นทำการทดสอบด้วยวิธี Agar plug มีผลการการศึกษาพบว่าไอโซเลททั้ง 2 ไอโซเลท มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกทั้ง 3 ชนิด ซึ่งมีความสามารถยับยั้ง *K. rhizophila* ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกับการทดสอบด้วยวิธี Cross streak โดยวิธี Cross streak ไอโซเลท PFY 1 พบบริเวณยับยั้งเท่ากับ 17 มิลลิเมตร และ ไอโซเลท PFY2 พบบริเวณยับยั้ง 15 มิลลิเมตร และ วิธี Agar plug ไอโซเลท PFY1 พบบริเวณยับยั้ง 13 มิลลิเมตร และ ไอโซเลท PFY2 พบบริเวณยับยั้ง 14 มิลลิเมตร (ดังตารางที่ 4.1-4.4)

4.8 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณของสายพันธุกรรม 16S rRNA ด้วย ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด คือ 27F และ 1492R พบว่า PCR Product ที่ได้เมื่อใช้โปรแกรม Gel Doc เพื่อใช้ดูลักษณะ Banned ขนาดที่ได้อยู่ในช่วง 1700 bp



รูปที่ 3 PCR Product ของ 16S rRNA ที่สกัดจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสไอโซเลท PFY1 และ PFY2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ PFY1 และ PFY2 ด้วยการศึกษาเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA เทียบความเหมือนกับฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus velezensis* FZB42 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes อยู่ในวงศ์ Bacillaceae มีลักษณะเป็นท่อน แกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่ทนความร้อน และ สามารถผลิตยาปฏิชีวนะหลายชนิดได้มีการศึกษานี้เราแสดงให้เห็นว่า *B. velezensis* FZB42 สามารถต่อต้าน *P. sojae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ กลไกพื้นฐานสำหรับการยับยั้งพบว่า การกลายพันธุ์ของ FZB42 ที่สังเคราะห์ไลโปเปปไทด์ (bacillomycin D และ fengycin) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อรา และโพลีคีไทด์ (บาซิลลาอีน ดิฟฟิซิดิน และแมคโครแลคติน) และยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Xingshan H et. Al., 2021)

โดยมีงานวิจัยศึกษาแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. velezensis* สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และเชื้อรา ได้แก่ *Botrytis cinerea, Fulvia fulva, Fusarium graminearum, F. oxysporum, F. verticillioides, Phytophthora nicotianae และ Ustilaginoidea virens* นอกจากนั้นยังสามารถยับยั้งไส้เดือนฝอยรากปม Meloidogyne incognita (Calvo et al., 2020; Cao et al., 2018; Chen et al., 2018; Guo et al., 2020; Jiang et al., 2019; Myo et al., 2019; Wang et al., 2020) โดยมีรายงานการวิเคราะห์จีโนมิกส์ของ B. velezensis พบมีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ ซึ่งมีบทบาทสำคัญ ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช กลุ่ม cyclic lipopeptides ได้แก่ iturin, surfactin, bacillomycin-D, fengicin และ bacillibactin กลุ่ม antibacterial polyketide ได้แก่ macrolactin, bacillaene และ difficidin และ antibacterial dipeptide ได้แก่ bacilicin (Chen et al., 2007; Liu et al., 2020; Pandin et al., 2018; Rabbee et al., 2019)

Macrolactin ซึ่งเป็นสารประกอบโพลีคีไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง C. gloeosporioides และจากการศึกษา B. subtilis บางสายพันธุ์ พบว่ามีการผลิตสารกลุ่มlipopeptide ได้ตั้งแต่ หนึ่งชนิดขึ้นไปเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวต่างชนิดกัน (Dunlap et al., 2011; Kwon and Kim, 2014) แบคทีเรียจีนัส Bacillus เช น B. subtilis และ B. siamensis รายงานว่า สามารถผลิตสารกลุ่ม lipopeptide ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคในจีนัส Colletotrichum, Fusarium และ Rhizoctonia ได้ (Dunlap et al., 2011; Hussain and Khan, 2021; Huang et al., 2022) ดังนั้น Bacillus subtilis DB016 และ Bacillus siamensis DB071

จากการศึกษาพบว่า งานวิจัยของ Yu et al. (2022) ยังรายงานว่า B. velezensis YA215 ซึ่งแยกได้จากป่าชายเลนมีการสารชีวโมเลกุลในกลุ่มของ lipopeptides ทั้ง surfactin. Iturin และ fengycin ซึ่งสารในกลุ่มของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lipopeptides มีคุณสมบัติในการเป็นสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพด้วยในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาความไม่ชอบน้ำ (BATH assay) และความสามารถในการเกิด E24 (emulsification index, E24) ซึ่งผลจาก BATH assay B. velezensis ให้เปอร์เซ็นต์ความไม่ชอบน้ำของเซลล์ 4.10-46.86% ส่วน ค่า E24 มีค่าอยู่ในช่วง 38.97-51.92% ซึ่งจากงานวิจัยของ Syahriansyah and Hamzah (2016) และ Mouafi et al. (2016) ซึ่งตรวจสอบความสามารถในการเกิด E24 ของ B. subtilis และ B. brevis เพื่อระบุความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ พบว่ามีค่า E24 เพียง 17% และ 46.6% ตามลำดับ

Bacillus velezensis FZB42 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นตัวแทนของไรโซแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) สามารถสร้างฟิล์มชีวะที่แข็งแกร่งและผลิตยาปฏิชีวนะหลายชนิดเพื่อต่อต้านเชื้อราจากพืชในธรรมชาติ ในการศึกษานี้ การทดลองที่เป็นปฏิปักษ์ยังแสดงให้เห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไวด์ สายพันธุ์ sprT แสดงการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC-9144 และ *Phytophthora sojae* ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการหยุดใช้งาน ส่งผลให้การผลิตยาปฏิชีวนะบาซิลีซินลดลง การวิเคราะห์ PCR เปิดเผยว่า sprT ควบคุมการแสดงออกของยีนสำหรับการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ bacilysin ลง ผลลัพธ์ของเราชี้บ่งบอกว่ายีน sprT มีบทบาทควบคุมในลักษณะหลายประการของ *B. velezensis* FZB42 รวมถึงการสร้างฟิล์มชีวะ การจับกลุ่ม การสร้างสปอร์ และการผลิตยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส สามารคัดแยกได้จำนวน 2 ไอโซเลท ประกอบด้วย PFY1 และ PFY2 เมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus Subtillis* ATCC 6633 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยใช้วิธี Cross streak และ Agar plug พบว่า PFY1 เป็นเชื้อที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งสิ้น ตามลำดับ โดยสามารยับยั้ง *Kocuria rhizophila* ATCC 9341มีประสิทธิภาพดีที่สุด และ สามารยับยั้ง *Bacillus Subtillis* ATCC 6633 มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด และเชื้อ PFY 2 มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งสิ้น ตามลำดับ โดยสามารยับยั้ง *Kocuria rhizophila* ATCC 9341มีประสิทธิภาพดีที่สุด และ สามารยับยั้ง *Bacillus Subtillis* ATCC 6633 มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด หลังจากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบและการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR polymerase ผ่านการดูการเกิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Gel electrophoresis และสังเกตการเกิด banned ด้วยเครื่อง Gel Documentaryr พบว่าการเกิด Banned ของ เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท อยู่ในช่วง 1,700 bp และเมื่อส่งให้บริษัททดสอบในฐานข้อมูลของ BLAST พบว่าได้แบคทีเรียสปีชีส์ใหม่จำนวน 1 ไอโซเลท คือ *Bacillus velezensis* FZB42 ภายหลังนำผลที่ได้จากบริษัททำการลำดับเบสบนยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ได้แก่ 27F และ 1492R พบว่า เมื่อเปรียบเทียบความใกล้เคียงของสายพันธุ์ของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท มีความคลึงของสายพันธุ์ตามลำดับ ได้แก่ PFY1 มีความคล้ายของสายพันธุ์ ดังนี้ Bacillus velezensis CR-502 99.64% Bacillus siamensis KCTC 13613 99.30% Bacillus subtilis NCIB 3610 99.02% และ Bacillus amyloloquefaciens DSM 7 99.02% PFY2 มีความคล้ายของสายพันธุ์ ดังนี้ Bacillus siamensis KCTC 13613 99.65% Bacillus velezensis CR-502 99.64% Bacillus subtilis NCIB 3610 99.36% และ Bacillus amyloloquefaciens DSM 7 99.36%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในการศึกษานี้พบว่ามีจำนวนไอโซเลตที่ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญจุลินทรีย์ได้ทั้ง 2 ไอโซเลท มีความเป็นไปได้ว่าบริเวณที่เก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์อาจจะมาจากแหล่งเดียวกัน จึงทำให้มีผลที่ไม่ต่างกัน ซึ่งสภาพสิ่งแวดล้อมนี้อาจส่งผลให้แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกมีความหลากหลายไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างในการศึกษาต่อไปควรเก็บตัวอย่างต่างถิ่นเพื่อหาความหลากหลายทางชีวภาพ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการต้านการเจริญแบคทีเรียก่อโรคนี้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อก่อโรค การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA และการระบุสายพันธุ์ การศึกษาต่อไปควรมีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง เนื่องจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ข้างต้นมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านมะเร็ง นอกจากนี้การพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ในการต้านอนุมูลอิสระแม้กระทั่งทำเป็นผลิตภัณฑ์บริโภคในอนาคตควรมีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังเช่น เซลล์ผิวหนังชนิด HaCaT (Human keratinocyte cell line) ตลอดจนศึกษากลไกการออกฤทธิ์และคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น การดูดซึม การแพร่กระจายของสาร และกลไกการขับออกจากร่างกาย เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Akanbi BO, Bodunrin OD, Olyanju S. 2011. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Passifora edulis*. Researcher. 3(5): 9-12.

Campodónico, V. L., Llosa, N. J., Grout, M., Döring, G., Maira-Litrán, T., & Pier, G. B. 2010. Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. Infection and Immunity. 78(2): 746-755.

Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O, Junge H, Voigt B, Jungblut PR, Vater J, Sussmuth R, Liesegang H, Strittmatter A, Gottschalk G, Borriss R. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nat Biotechnol. 25(9): 1007–1014.

Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Price, N. P., & Vaughn, S. F. 2011. Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of Fusarium head blight. The Journal of Microbiology. 49(4): 603-609.

Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. 2018. Biological control of plant pathogens by Bacillus species. J. Biotechnol. 285: 44–55.

Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol. 16(10): 463–71.

Higgins D, Dworkin J. 2012.Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. FEMS Microbiol. 36: 131–148.

Hirooka K. 2014.Transcriptional response machineries of *Bacillus subtilis* conducive to plant growth promotion. Biosci Biotechnol Biochem. 78: 1471–84.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Huang, Y., Zhang, X., Xu, H., Zhang, F., Zhang, X., Yan, Y., ... & Liu, J. 2022. Isolation of lipopeptide antibiotics from *Bacillus siamensis*: A potential biocontrol agent for *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Microbiology. 99(999): 1-9.

Hurek T, Reinhold-Hurek B, van Montagu M, Kellenberger E. 1994. Root colonization and systemic spreading of Azoarcus sp. strain BH72 in grasses. J Bacteriol 176: 1913–1923.

Hussain, T., & Khan, A. A. 2021. Biocontrol prospective of *Bacillus siamensis*-AMU03 against Soil-borne fungal pathogens of potato tubers. Indian Phytopathology. 1-11.

Ingale AGand Hivrale AU. 2010. Pharmacological studies of Passifora sp. And their bioactive compounds. Afr J Plant Sci. 4(10): 417-426.

Jia M., Chen L., Xin H. L., Zheng C. J., Rahman K., Han T., et al. 2016. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. Front. Microbials. 7: 906.

Jonathan R, Crystal A , Karen A , Nicola J , Anna S , Kari E. 2013. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. National Library od Medicine. 100(9): 1738-90.

Kobayashi DY, Palumbo JD. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon CW, White JF (eds) Microbial endophytes. Marcel Dekker, New York. 199–233.

Kwon, J. W., & Kim, S. D. 2014. Characterization of an antibiotic produced by *Bacillus subtilis* JW-1 that suppresses *Ralstonia solanacearum*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 24(1): 13-18.

Leuschner RGK, Lillford PJ. 2003. Thermal properties of bacterial spores and biopolymers. Int. J. Food Microbiol. 80: 131–143.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Li, L., Ma, M., Huang, R., Qu, Q., Li, G., Zhou, J., ... & Luo, J. 2012. Induction of chlamydospore formation in Fusarium by cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* C2. Journal of Chemical Ecology. 38(8): 966-974.

Luisa, F., Posada, L.F., Alvarez, J.C., Romero-Tabarez, M., de-Bashan, L., Villegas-Escobar, V. 2018. Enhanced molecular visualization of root colonization and growth promotion by *Bacillus subtilis* EA-CB0575 in different growth systems. Microbiological Research. 217: 69-80.

M.F. Rabbee, M.S. Ali, J. Choi, B.S. Hwang, S.C. Jeong, K.H. 2019. Baek *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes Molecules. 10.3390.

Martinez-Klimova E., Rodriguez-Pena K., Sanchez S. 2017. Endophytes as sources of antibiotics. Biochem. Pharmacol. 134: 1–17.

Olga M, Magdalena C et. Al. 2023. Endophytic bacteria isolated from *Urtica dioica* L.preliminary screening for enzyme and polyphenols production. Microbial Cell Factories. 22: 169.

Serra CR, Earl AM, Barbosa TM, Kolter R, Henriques AO. 2014. Sporulation during growth in a gut isolate of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 196: 4184–96.

Sun W. J., Zhu H. T., Zhang T. Y., Zhang M. Y., Wang D., Yang C. R., et al. 2018. Two new alkaloids from *Fusarium tricinctum* SYPF 7082, an endophyte from the root of Panax notoginseng. Nat. Prod. Bioprospect. 10: 1007.

Syahriansyah, U. K. M. & Hamzah, A. 2016. Determination of optimum conditions and stability study of biosurfactant produced by Bacillus subtilis UKMP-4M5. Malaysian J. Anal. Sci. 20(5): 986-1000.

KANDI, Venkataramana, et al. 2016. Emerging bacterial infection: identification and clinical significance of Kocuria species. Cureus. 8(8).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wu, T., Xiao, F., & Li, W. 2021. Macrolactins: biological activity and biosynthesis. Marine Life Science & Technology. 3(1): 62-68.

Xingshan H., Dongxia S., Xiong Q., Bao B., Zhang W., Dai C.-F., et al. 2021. The plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 controls the soybean pathogen *Phytophthora sojae* due to bacilysin production. Appl. Environ. Microbiol. 87: 0160121.

Yu X. Y., Zhang X., Zhang J., Zhang L. D., Jiao Y. J., Guo L. F., et al. 2022. Mixtures of suppressive bacteria enhance biological control of tomato bacterial wilt. Biol. 170: 104937.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหารสำหรับคัดแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ

1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA)

Pancreatic Digest of Casein	15 g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5 g
Sodium Chloride	5 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

ละลายส่วนผสมทั้งหมด 1000 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วนความดันไอแรงสูง 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth

Pancreatic Digest of Casein	15 g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5 g
Sodium Chloride	5 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

ละลายส่วนผสมทั้งหมด 1000 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วนความดันไอแรงสูง 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การเตรียมหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar (MHA)

Beef extract powder	2 g
Acid Digest of Casein	17.5 g
Soluble stratch	1.5 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
pH	7.3 ± 0.1

ละลายส่วนผสมทั้งหมด 1000 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วนความดันไอแรงสูง 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA)

Approximate Formula Per Liter	
Pancreatic Digest of Casein	5 g
Yeast Extract	2.5 g
Dextrose	1 g
Agar	15 g
pH	7.0 ± 0.2
Distilled water	1000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมด 1000 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วนความดันไอแรงสูง 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายและสารเคมีในการทำวิจัย

2.1 การเตรียมสารละลายNormal saline (0.89% NaCL)

NaCl	0.89 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Distilled water	100 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมด 100 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วนความดันไอแรงสูง 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียม 70% Alcohol จาก 95% Alcohol

95% Alcohol	750 ml
Distilled water	250 ml

2.3 การเตรียมสารละลาย Crystal violet

สารละลาย A	
Crystal violet	2 g
95% Ethyl alcohol	20 ml
สารละลาย B	
Ammonium oxalate	0.8 g
Distilled water	80 ml

ผสมสารละลายทั้ง 2 สาร เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองจะได้เป็น Crystal violet staining reagent

2.4 การเตรียมสารละลายไอโอดีน

Iodine	1 g
Distilled water	100 ml
Potassium iodide	20 g

ใช้น้ำเพียงเล็กน้อยละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์จนหมดจึงเติมน้ำที่เหลือลงไปแล้วผสมให้เข้ากันดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

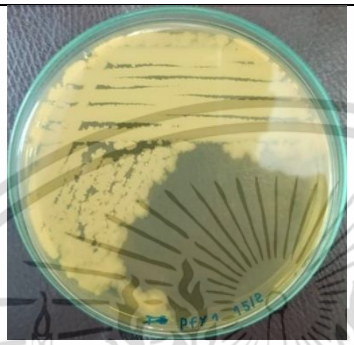
2.5 การเตรียมสารละลาย Safranin (counterstain)

ทำการละลาย Safranin O ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (W/V) ใน Ethyl alcohol ความเข้มข้น 10 มิลลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

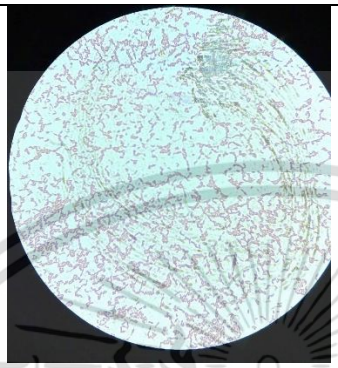
ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 การแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ PFY1 และ PFY2

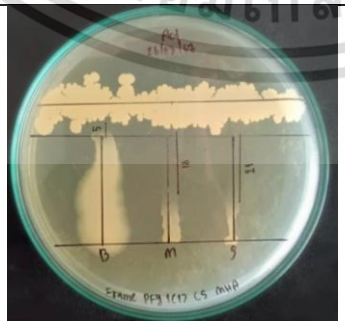
Isolation	ภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟต์	ลักษณะสัณฐานเบื้องต้น
PFY 1		โคโลนีเป็นขอบหยักสีขาวขุ่น ไม่มีความนูนของผิวเชื้อ มีความหนาแน่นของเชื้อค่อนข้างมาก
PFY 2		โคโลนีเป็นขอบหยักสีขาวขุ่น ไม่มีความนูนของผิวเชื้อ มีความหนาแน่นของเชื้อค่อนข้างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

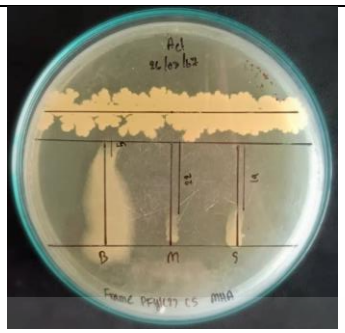
ตารางที่ 2 ภาพแสดงการส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง การติดสีแกรม

Isolation	ภาพภายใต้การส่องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	การเรียงตัวและการติดสีแกรม
PFY 1		เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เป็นรูปท่อนสั้น มีการเรียงตัวทั้งการกระจายและแบบกลุ่ม การติดสีแกรมเป็นสีม่วง
PFY 2		เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เป็นรูปท่อนสั้น มีการเรียงตัวทั้งการกระจายและแบบกลุ่ม การติดสีแกรมเป็นสีม่วง

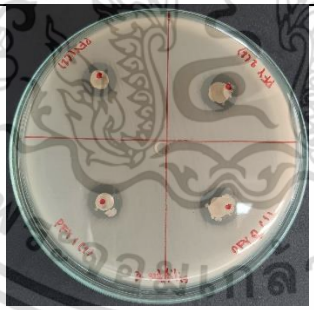
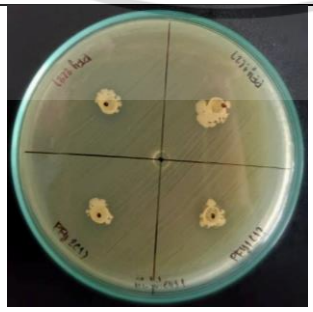
ตารางที่ 3 การแสดงฤทธิ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี Cross streak

Isolation	ภาพแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค	ผลของฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค
PFY 1		สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis Kocuria varians* และ *Staphylococcus aureus*

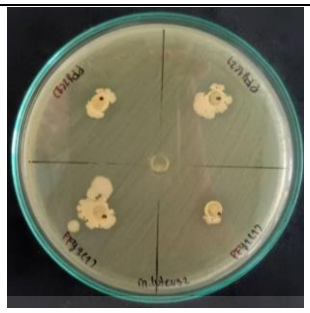
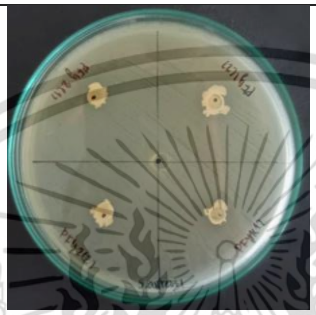
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PFY 2		สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis Kocuria varians* และ *Staphylococcus aureus*

ตารางที่ 4 การแสดงฤทธิ์ของแบคทเรียเอนโดไฟท์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี Agar plugs

Isolation	ภาพของฤทธิ์ของแบคทเรียเอนโดไฟท์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค	ผลของฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค
Bacillus subtilis 1		ไอโซเลท PFY 1 และ PFY2 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis*
Bacillus subtilis 2		ไอโซเลท PFY 1 และ PFY2 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Bacillus subtilis*
Kocuria rhizophila 1		ไอโซเลท PFY 1 และ PFY2 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Kocuria rhizophila*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kocuria rhizophila *2*		ไอโซเลท PFY 1 และ PFY2 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Kocuria rhizophila*
Staphylococcus aureus *1*		ไอโซเลท PFY 1 และ PFY2 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus *2*		ไอโซเลท PFY 1 และ PFY2 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*

ตารางที่ 5 การคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Drop plate เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

ตารางความเจือจางที่นับได้		ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ค่าเฉลี่ย	คำนวณ CFU/ml = ค่าเฉลี่ย/0.02*ความเจือจาง	
PFY 1 10^-5 (1) 0.2	PFY 1 10^-5 (1) 0.2	40	39	40	39.66666667	198333333.3	1.9*10^8
0.23	PFY 1 10^-5 (2) 0.2	28	31	37	32	160000000	1.6*10^8
PFY 1 10^-5 (1) 0.3	PFY 1 10^-5 (1) 0.3	62	60	48	56.66666667	283333333.3	2.8*10^8
0.34	PFY 1 10^-5 (2) 0.3	25	31	34	30	150000000	1.5*10^8
PFY 1 10^-5 (1) 0.4	PFY 1 10^-5 (1) 0.4	26	42	28	32	160000000	1.6*10^8
0.44	PFY 1 10^-5 (2) 0.4	51	60	53	54.66666667	273333333.3	2.7*10^8
PEY 2 10^-5 (2) 0.2	PFY 2 10^-5 (1) 0.2	28	33	25	28.66666667	143333333.3	1.4*10^8
0.23	PFY 2 10^-5 (2) 0.2	13	10	12	11.66666667	58333333.33	0.5*10^8
PEY 2 10^-5 (2) 0.3	PFY 2 10^-5 (1) 0.3	24	19	20	21	105000000	1.05*10^8
0.34	PFY 2 10^-5 (2) 0.3	13	12	17	14	70000000	0.7*10^8
PEY 2 10^-5 (2) 0.4	PFY 2 10^-5 (1) 0.4	14	23	21	19.33333333	96666666.67	0.9*10^8
0.44	PFY 2 10^-5 (2) 0.4	18	16	21	18.33333333	91666666.67	0.9*10^8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.การลำดับเบสนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA ของไพรเมอร์ 27F และ 1492R ของ PFY1 และ PFY2

ภาพที่ 1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA จากแบคทีเรีย PFY1 c1 Forward และ Reward

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA

CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA

TGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG

GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC

CGACCTGAGAGGGTGATCGGTCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA

GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT

GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCCGTTCAAAT

AGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG

CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCG

GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG

GAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT

GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAA

AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT

AAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG

GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA

GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA

ATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC

AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG

ATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGA

ACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT

CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC

GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAC

ACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGTGACAGGAAATTC

ภาพที่ 1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA จากแบคทีเรีย PFY1 c2 Forward และ Reward

TATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGG

TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAA

TACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTT

ACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAT

GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT

ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC

GTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTT

CAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC

AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGC

AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA

CTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA

GAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGA

G CTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT

CCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATT

GGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCA

GGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCA

GTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCG

GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCT

GCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGT

TCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT

CCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGC

AGCACTAAGGGGC

ภาพที่ 1.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA จากแบคทีเรีย PFY2 d1 Forward และ Reward

CTATAATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGG

TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAA

TACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTT

ACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGAT

GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT

ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC

GTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTT

CAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC

AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAA

CTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA

GAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGA

GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA

GTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG

CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG

GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTC

TGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTG

TCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCT

TAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG

TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG

ACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTT

CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC

ATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT

GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGA

ภาพที่ 1.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA แบคทีเรีย PFY2 d2 Forward และ Reward

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA

CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGA

TGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATG

GACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG

GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG

ATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAG

GGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG

GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGT

TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA

ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT

GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAG

CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA

GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG

AGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC

ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAT

CCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG

CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGC

CAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT

GACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAC

AAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG

CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC

GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACAC

CCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 19 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นาย พงษ์พิสิษฐ์ กิตติลาภ รหัสประจำตัว 63050504

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีวิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การศึกษากิจกรรมต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส

ชื่อภาษาอังกฤษ STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM PASSION FRUIT

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.42 % หรือโปรแกรม Turnitin - %

ลงชื่อ พงษ์พิสิษฐ์ กิตติลาภ	ลงชื่อ.....	ลงชื่อ.....
(พงษ์พิสิษฐ์ กิตติลาภ)	( )	( )
นักศึกษา	นักศึกษา	นักศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าพเจ้า ผศ.ดร. กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..... ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้