การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากเสาวรส

Study of Antibacterial Activity from Endophytic Bacteria Isolate from Passion fruit

กรรณิกา โคตรท่าคร้อ

นัฐนรา หอมรำพึง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study of Antibacterial Activity from Endophytic Bacteria Isolate from Passion fruit

KANNIKA KHOTTHAKHO

NATNARA HOMRAMPHUNG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRAIL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากเสาวรส Study of antibacterial activity from endophytic bacteria isolated from passion fruit
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกรรณิกา โคตรท่าคร้อ รหัสนักศึกษา 63050441 นางสาวนัฐนรา หอมรำพึง รหัสนักศึกษา 63050490
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ

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

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ กรรมการ	
ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากเสาวรส

ชื่อนักศึกษา นางสาวกรรณิกา โคตรท่าคร้อ รหัสนักศึกษา 63050441
นางสาวนัฐนรา หอมรำพึง รหัสนักศึกษา 63050490

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2566

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเสาวรส โดยผลจากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิดได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ด้วยวิธี cross streak agar plug และ agar well พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 5 ชนิด โดยให้ผลการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ได้ดีที่สุด และจากการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียเอนโดไฟท์โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA เทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16 rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานในฐานข้อมูล Ezbiocloud พบว่าไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T} โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA เท่ากับ 99.50% และ 99.86% ตามลำดับ

คำสำคัญ : แบคทีเรียเอนโดไฟท์ แบคทีเรียก่อโรค เสาวรส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Study of antibacterial activity from endophytic bacteria isolated from passion fruit

Students Miss Kannika Khotthakho Student ID 63050441

Miss Natnara Homramphung Student ID 63050490

Degree Bachelor of Science (Industrail Microbiology)

Department Biology

School Science

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

Academic Year 2023

Advisor Asst. Prof. Dr. Karn Wongsariya

Abstract

The aim of this research is to study on antibacterial activity of endophytic bacteria isolated from passion fruit against the growth of 5 strains of pathogenic bacteria including *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 by cross streak, agar plug, and agar well method. The results found that isolate Pfy1 and Pfy2 could inhibit the growth of all pathogens, moreover the highest antibacterial activity was obtained after tested with *P. aeruginosa* ATCC 27853. As the result from genotypic characterization based on 16S rRNA gene, isolate Pfy1 and Pfy2 were classified as *Bacillus siamensis* KCTC 13613T with the highest percentage of similarity at 99.50 and 99.86, respectively.

Keywords : Endophytic bacteria, Pathogenic bacteria, Passion fruit, Antibacterial activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงงานพิเศษ หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่สละเวลาอันมีค่ามาคอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ และเสนอวิธีแก้ไขปัญหา รวมถึงสนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีสำหรับการทำโครงงานพิเศษเสมอมา

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการโครงงานพิเศษซึ่งประกอบไปด้วย รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา และ ผศ.ดร.วิภาวี เดชติศักดิ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และสถานที่ในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณครอบครัว เพื่อน ๆ และพี่ ๆ ทุกท่านที่คอยให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ แต่ถ้าหากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางผู้จัดทำกราบขออภัยมา ณ ที่นี้

กรรณิกา โครตท่าคร้อ

นัฐนรา หอมรำพึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 แบคทีเรียเอนโดไฟท์ 3
2.1.1 กลุ่ม Obligate endophyte 3
2.1.2 กลุ่ม Facultative endophyte 3
2.1.2 กลุ่ม Passive endophyte 3
2.2 แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส 5
2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 5
2.4 เสาวรส 6
2.4.1 เสาวรสชนิดผลสีเหลือง (*Passiflora edulis,* var *flaicarpa*) 7
2.4.2 เสาวรสชนิดผลสีม่วง (*Passiflora edulis* Sims) 7
2.5 แบคทีเรียก่อโรค 7
2.5.1 *Bacillus subtilis* 7
2.5.1 *Escherichia coli* 8
2.5.1 *Kocuria rhizophila* 9
2.5.1 *Pseudomonas aeruginosa* 10
2.5.1 *Staphylococcus aureus* 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 12
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 12
3.2 สารเคมี 13
3.3 เชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ทดสอบ 14
3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น 14
3.4.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง 14
3.4.2 การศึกษารูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรม 14
3.5 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ 14
3.5.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 14
3.5.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 15
3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 15
3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streak 15
3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar plug 16
3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion 16
3.7 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 17
3.7.1 การเตรียมความเข้มข้นที่เหมาะสมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ สำหรับการสกัดสารพันธุกรรม (DNA) 17
3.7.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 17
3.7.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการ Genotypic characterization โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA 18
3.7.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA 20

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 21
4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น 21
4.1.1 ลักษณะการเจริญเชื้อบนอาหารแข็ง TSA 21
4.1.2 การศึกษารูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรม 21
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 22
4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streak 22
4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar plug 22
4.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 25
4.3.1 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 25
4.3.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการ 26
Genotypic characterization โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA
4.3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 16S rRNA 27

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 30
เอกสารอ้างอิง 31
ภาคผนวก 38
ภาคผนวก ก 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ตัวอย่างของแบคทีเรียเอนโดไฟท์และประโยชน์ต่อพืชอาศัย 4
3.1 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR..... 19
3.2 สภาวะอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR..... 19
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท 25
4.2 ผลการทดสอบบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (Inhibition zone) ของ..... 25
เอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท
4.3 ตารางเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1..... 2
กับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานในฐานข้อมูล Ezbiocloud
4.4 ตารางเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy2..... 28
กับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานในฐานข้อมูล Ezbiocloud

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

3.1 การขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (เส้น A) และแบคทีเรียก่อโรค (เส้น B)..... 15
ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streak

3.2 ลักษณะการขีดเชื้อเพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak..... 16

4.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2..... 21
บนอาหารแข็ง TSA

4.2 รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท..... 21
Pfy1 และ Pfy2

4.3 บริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) จากวิธี Cross streak ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์..... 22
ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2

4.4 บริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) จากวิธี Agar plug ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์..... 23
ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2

4.5 บริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) จากวิธี Agar well diffusion..... 24
ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2

4.6 สารพันธุกรรมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2 บน..... 26
0.8% Agarose gel electrophoresis

4.7 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16s rRNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์..... 26
ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
a_w	Water activity
IAA	Indole-3-acetic acid
kDa	Kilodalton
MDa	Malonaldehyde
IAA	Indole-3-acetic acid
μM	ไมโครโมลาร์
μL	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เสาวรส (Passion fruit) เป็นไม้เลื้อยซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Passifloraceae ที่ได้รับความนิยมปลูกในประเทศเขตร้อน เช่น บราซิล ปรากวัย อาเจนตินาและไทย ในประเทศไทยมีเสาวรส 3 สายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมเพาะปลูกได้แก่ สายพันธุ์ผลสีม่วง (*Passiflora edulis* L.) สายพันธุ์สีเหลือง (Deneger P. *edulis* F. flavicarpa) และสายพันธุ์ลูกผสม (สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, 2559) เสาวรสเป็นผลไม้ที่สามารถรับประทานได้ทั้งผลและเมล็ด มีรสเปรี้ยว มีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว และนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เนื้อสามารถรับประทานสด นำไปทำแยมหรือไวน์ผลไม้ได้ และส่วนเนื้อด้านนอกหรือเปลือกสามารถทำอาหารสัตว์หรือปุ๋ยได้ โดยจากการศึกษาเกี่ยวกับคุณค่าทางโภชนาการของเสาวรสพบว่ามีคุณค่าทางเศรษฐกิจและคุณค่าทางโภชนาการสูง มีการศึกษาวิจัยพบว่าเสาวรสเป็นแหล่งของธาตุอาหารหลากหลายชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต วิตามิน แร่ธาตุที่สำคัญต่อร่างกาย และมีปริมาณสารอาหารที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรค หรือโภชนบำบัดสูง เช่น กรดฟีนอลิก แอนโธไซยานินและฟลาโวนอยด์ สารประกอบที่เป็นโภชนบำบัดเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์ โดยสามารถป้องกันความเสื่อมถอยของอวัยวะและโรคเรื้อรัง เป็นสารยับยั้งการกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็ง รวมถึงมีฤทธิ์ต้านไวรัส และการอักเสบ (Dos Reis *et al.,* 2018) นอกจากนี้เสาวรสยังเป็นแหล่งของวิตามินซี น้ำตาล และกรดอินทรีย์หลากหลายชนิดอีกด้วย (Viera *et al.,* 2022) เสาวรสนั้นมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยสามารถขจัดคอเลสเตอรอลในร่างกายได้ สามารถขับสารพิษในลำไส้ บำรุงหัวใจ โลหิต และบำรุงสายตาได้

พืชเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชนั้นมีทั้งที่ส่งผลดีและผลเสียต่อพืชซึ่งขึ้นอยู่กับบทบาทและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แบคทีเรียเอนโดไฟท์เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืช ในรูปแบบพึ่งพิงอิงอาศัย (Symbiosis) กับพืช โดยพืชให้สารอาหารแบคทีเรียเอนโดไฟท์ใช้ในการเจริญเติบโต ในขณะที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์จะช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อมผ่านวิถีเมทาบอลิซึมที่หลากหลาย ซึ่งส่งเสริมการเจริญทางอ้อมโดยการให้แร่ธาตุเช่น ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม สังกะสี และเหล็ก รวมถึงฮอร์โมนพืช เช่นจิบเบอเรลลินและไซโตไคนิน (Rani *et al.,* 2022) และส่งเสริมทางตรงโดยสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้ (Ma *et al.,* 2016) และนอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ยังสามารถกระตุ้นภูมิต้านทานต่อโรค รวมทั้งส่งผลให้พืชสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดีขึ้นอีกด้วย (Dos Reis *et al.,* 2018) นอกจากนี้พบว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายชนิดที่ถูกผลิตขึ้นโดยกลุ่มของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ เช่น อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ กรดฟินอลิก และสารปฏิชีวนะ ซึ่งสารเหล่านี้ถูกนำไปประยุกต์ในหลากหลายด้าน เช่น การแพทย์ การเกษตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุตสาหกรรมอาหารและยา เป็นต้น ยกตัวอย่างเช่น สารฟลาโวนอยด์และแทนนินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้จากใบของต้นพุ่อมร (Diale *et al.,* 2018) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค *Bacillus cereus Staphylococcus aureus Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* IAA ซึ่งเป็นไฟโตฮอร์โมนที่ผลิตจากเชื้อ *Clavibacter michiganensis* ที่คัดแยกได้จากขมิ้น (Javid *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2016) ซึ่งส่งเสริมการแบ่งเซลล์ การแตกหน่อ และการสร้างรากของพืช และสารพิซีทานอลที่ผลิตจากเชื้อ *Brevibacterium* sp. PE28-2 ที่คัดแยกได้จากเสาวรส (Ishida and Furuya, 2021) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค *Staphylococcus aureus* ได้ (Güldaş *et al.,* 2019) โดยงานวิจัยก่อนหน้านั้นคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรสในส่วนของเมล็ดเท่านั้น แต่แบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถพบได้ในทุกโครงสร้างของพืช ทั้งเมล็ด ราก เหง้า ลำต้น และใบ (Alibrandi *et al.,* 2018) โครงงานพิเศษนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส เพื่อจำแนกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรสที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส

2) เพื่อจัดจำแนกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรสที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญต้านแบคทีเรียก่อโรค

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

นำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากเสาวรส 2 ไอโซเลท มาทำการศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยา ซึ่งประกอบไปด้วยการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง การศึกษารูปร่าง การเรียงตัวและการติดสีแกรม และทดสอบความสามารถการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค รวมถึงจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

2) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากสารสำคัญที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์สร้างขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียเอนโดไฟท์

แบคทีเรียเอนโดไฟท์เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ส่วนใหญ่ส่งเสริมการเจริญเติบโต ไม่ทำลายหรือสร้างผลกระทบในเชิงลบต่อพืช (Hirsh and Braun, 1992) โดยการเข้าอยู่อาศัยหรือการเพิ่มจำนวนในเซลล์พืชนั้นจะขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างพืชที่อาศัยและบทบาทของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืช โดยสามารถแบ่งแบคทีเรียเอนโดไฟท์ออกได้เป็น 3 กลุ่มตามวงจรชีวิต

2.1.1 กลุ่ม Obligate endophyte

เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่สามารถเจริญนอกต้นไม้ได้และถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นผ่านทางเมล็ด เช่น *Xyrella fastidiosa*

2.1.2 กลุ่ม Facultative endophyte

เป็นกลุ่มที่เคยอยู่อาศัยอย่างอิสระในดินมาก่อน และจะเข้าไปอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชสามารถเข้าไปได้ เช่นทางรอยแผลของพืช เช่น *Bacillus licheniformis Bacillus safensis* และ *Bacillus megaterium*

2.1.3 กลุ่ม Passive endophyte

เป็นกลุ่มที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดินและเข้าสู่ต้นพืชแบบสุ่ม (Hardoim *et al.,* 2008) ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้หลายช่องทางยกตัวอย่างเช่น ทางราก ชั้น Epidermis ของรากแขนง บริเวณขนราก รอยแตกของราก พื้นผิวของใบ และเมล็ด (Teotia *et al.,* 2017) โดยการเข้าสู่เซลล์พืชนั้นแบคทีเรียเอนโดไฟท์จะสร้างเอนไซม์ Cellulase และ Pectinase เพื่อย่อยผนังเซลล์พืชหรือผ่านบาดแผลของเนื้อเยื่อพืชบริเวณนั้น รวมถึงอาศัยพาหะ เช่น แมลง เมื่อเข้าสู่เซลล์พืชแล้วในระยะแรกจะเข้าอาศัยอยู่ที่ระหว่างเซลล์ของพืช และมีการเพิ่มจำนวนหลังจากนั้นจะเคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อลำเลียง (Vascular tissue) กระจายไปตามเนื้อเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของพืช ซึ่งส่วนมากจะพบแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในบริเวณราก ลำต้น และใบ (Dong *et al.*, 2003) นอกจากนี้แบคทีเรียเอนโดไฟท์บางชนิดยังสามารถใช้แฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณต่าง ๆ ของเซลล์ได้อีกด้วย แบคทีเรียเอนโดไฟท์จะปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เฉพาะเจาะจงภายในของเนื้อเยื่อพืช และทำให้เกิดเป็นความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียเอนโดไฟท์กับพืชที่เป็นเจ้าบ้าน (Compant *et al.,* 2005) เช่น การอยู่ร่วมกันแบบเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันของสิ่งมีชีวิต (Symbiosis) และการอยู่แบบภาวะพึ่งพากัน (Mutualistic relationship)

แบคทีเรียเอนโดไฟท์มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช กระตุ้นให้พืชมีความต้านทานต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ก่อโรคและศัตรูพืช (ดลฤดี, 2565) นอกจากนี้แล้วแบคทีเรียเอนโดไฟท์ยังมีส่วนช่วยในการตรึงไนโตรเจนของพืช (Nitrogen fixation) การละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilization) และการผลิตฮอร์โมนพืช (Phytohormone production) เช่น ออกซิน (auxins) ไซโตไคนิน (Cytokinins) และจิบเบอเรลลิน (Gibberellins) และประโยชน์ทางอ้อมคือการผลิตสารไซเดอโรฟอร์ (Siderophore production) การแย่งชิงสารอาหาร (Nutrient competition) การผลิตสารประกอบบางชนิดที่มีคุณสมคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช (Martinez-Klimova *et al.,* 2017) เชื้อรา รวมถึงแมลงได้ (Kusari *et al.,* 2012) โดยตัวอย่างของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เคยมีรายงานว่าถูกคัดแยกได้จากพืชและมีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญหรือช่วยป้องกันพืชจากการรุกรานของศัตรูพืชแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างของแบคทีเรียเอนโดไฟท์และประโยชน์ต่อพืชอาศัย

แบคทีเรียเอนโดไฟท์	พืช	เนื้อเยื่ออาศัย	หน้าที่	เอกสารอ้างอิง
Burkholderia phytofirmans	หัวหอม	ราก	เพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์	Zuniga *et al.*, 2013
Herbaspirillum seropedicae	ข้าวโพด	ราก ใบ	ตรึงไนโตรเจน ส่งเสริมการเจริญเติบโต	Brusamarello santos *et al.*, 2017
Klebsiella pneumoniae	ข้าวสาลี	ราก	ตรึงไนโตรเจน เพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์	Iniguez *et al.*, 2004
Pantoae sp.	ใบบัวบก	ราก ลำต้น	กระตุ้นระบบคุ้มกันของพืช	Rakotoniriana *et al.*, 2013
Phyllobacterium myrsinacearum	หญ้าเขาแพะ	ลำต้น ใบ	ลดจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช	He *et al.*, 2009
Bacillus siamensis	ผักชี	ราก ลำต้น	เพิ่มความยาวของราก ปลายยอด และน้ำหนักแห้ง	Ibrahim *et al.*, 2019
Lysinibacillus fusiformis	โสมจีน	ราก	ส่งเสริมการเพิ่มมวลชีวภาพของเมล็ด	Vendan et al., 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเสาวรส

Ishida and Furuya (2021) ได้คัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากเมล็ดของเสาวรสและจัดจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Brevibacterium casei* DSM 20657^{T} *Janibacter limosus* DSM 11140^{T} *Denococcus radiodurans* DSM 20539^{T} และ *Sphingomonas aqualitis* DSM 15581^{T}

2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติซึ่งสามารถออกฤทธิ์อย่างเฉพาะเจาะจงต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ทั้ง คน สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (Hiranrat, 2009) ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านการเกษตรเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชเศรษฐกิจ อย่างเช่นข้าว มะเขือเทศ มันฝรั่ง รวมถึงอุตสาหกรรมอาหารและยาที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสารออกฤทธิ์ สำหรับนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งและการผลิตยาปฏิชีวนะ (ชุติมา, 2553; Teotia, 2017; Brannen *et al*., 1997; Keerthana *et al*., 2018)

สารปฏิชีวนะเป็นหนึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ซึ่งสารปฏิชีวนะเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์ โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์นั้นสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์ผลิตได้ เช่น อัลคาลอยด์ เปปไทด์ ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (Yu *et al.,* 2017)

การเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นเป็นกลไกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ได้แก่การผลิตสารปฏิชีวนะ โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์จะสามารถผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ การแย่งชิงพื้นที่และสารอาหาร โดยจะเข้าไปแย่งชิงพื้นที่และสารอาหารกับจุลินทรีย์ก่อโรคพืชภายใต้สภาวะที่มีเหล็กอยู่อย่างจำกัด ตัวอย่างเช่นการผลิตไซเดอร์โรฟอร์ที่ส่งผลกับการดูดซึมธาตุเหล็กของจุลินทรีย์ก่อโรค และการย่อยสลายผนังเซลล์ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของแบคทีเรียที่จะทำให้แบคทีเรียนั้นสามารถดำรงชีวิตได้ ถ้าผนังเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคถูกย่อยสลายจะทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำรงชีวิตได้ (ฉัตรชฎา, 2559)

ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีกิจกรรมการต้านแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคได้หลายชนิดคือแบคทีเรียในจีนัส Bacillus ซึ่งมักพบในแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน บริเวณรอบ ๆ ของรากพืชและภายในพืช โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีปลอดภัย และนำไปประยุกต์ใช้ได้ในการเกษตรและอุตสาหกรรม (Yu *et al.,* 2002; Ongena and Jacques, 2008) โดยการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารเหลว สร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สปอร์ที่ทนความร้อนได้ สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มักเป็นสารกลุ่มโพลีเปปไทด์ (Katz and Demain, 1977) เช่น Surfactin Iturin และ Fengycin (Ongena and Jacques, 2008)

Diale *et al.,* 2018 พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากส่วนใบของต้นพู่อมร (*Combretum molle*) คือ *Bacillus subtilis* MF 187644^{T} มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus Staphylococcus aureus Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* นอกจากนี้เมื่อทำการสกัดหยาบแบคทีเรียเอนโดไฟท์ พบว่ามีสารพฤษเคมี (Phytochemical) ชนิดเหมือนกับในต้นพู่อมร เช่นฟลาโวนอยด์และแทนนิน ซึ่งมีคุณสมบัติทางการแพทย์ เช่น การยับยั้งจุลินทรีย์ ไวรัส มะเร็ง

Seo *et al.,* 2005 ได้ทำการคัดแยกและศึกษาแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากใบของแรดิช ซึ่งพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้นั้นมีศักยภาพในการสร้างสารที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) เช่น Mannase Protease และ DNase เมื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Enterobacter sp.* YRL01^{T} ที่คัดแยกได้มีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ และแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Bacillus subtilis* YRL02^{T} มีความสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้

Nifakos *et al.,* 2020 พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Bacillus velezensis* Bvel1^{T} สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในผลองุ่นได้โดยการสร้างสารทุติยภูมิ Iturin A2 Surfactin-C13 และ C15 Oxydificidin L-dihydroanticapsin และ azelaic acid ซึ่งสารทุติยภูมิเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียได้

2.4 เสาวรส

เสาวรส (Passion fruit) เป็นพืชตระกูล *Passifloraceae* โดยเป็นพืชไม้เลื้อยเครือยาว ซึ่งยาวได้ถึง 15 เมตร มีอายุประมาณ 4-5 ปี ลำต้นของเสาวรสมีลักษณะแข็งแรง ลำต้นอ่อนจะมีสีเขียว ไม่มีขนข้างในกลวง เมื่อต้นแก่จะกลายเป็นสีม่วงแดงเรื่อ มีมือเกาะมีสีเดียวกับลำต้น ก้านใบม้วนขดเป็นวงช่วยยึดลำต้นและเถาจากเมล็ดงอกเจริญเป็นต้นอ่อน ใบอ่อนที่แตกออกมาจะเป็นใบเรียบไม่มีแฉก เมื่อเจริญเติบโตจะกลายเป็น 3 แฉก และเมื่อเจริญเติบโตได้ระยะหนึ่งจะเริ่มแตกเป็นกิ่ง การเจริญเติบโตในช่วงนี้จะเป็นไปอย่างช้า ๆ หลังจากนั้นจะมีการเจริญเติบโตแผ่กิ่งก้านสาขาปกคลุมพื้นที่อย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปเสาวรสแบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ผลสีเหลือง และสายพันธุ์ผลสีม่วง ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนี้

2.4.1 เสาวรสชนิดผลสีเหลือง (*Passiflora edulis,* var *flaicarpa*)

เสาวรสชนิดผลสีเหลืองนั้นจะมีผลเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 เซนติเมตรโดยประมาณ น้ำหนัก 80-120 กรัม พบได้ในพื้นที่ต่ำเขตร้อน เมื่อผลสุกจะมีสีเหลือง ผิวเป็นมัน น้ำคั้นมีรสเปรี้ยวเนื่องจากกรดสูง และ pH ต่ำกว่า 3 โดยเสาวรสชนิดนี้มีข้อดีคือต้นมีความแข็งแรง มีความต้านทานโรคและแมลงสูงกว่าพันธุ์สีม่วง และผลขนาดใหญ่และให้ผลดก (อัจฉราและคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 เสาวรสชนิดผลสีม่วง (*Passiflora edulis* Sims)

พบได้ในสภาพแวดล้อมที่อากาศเย็น โดยเฉพาะแถบเส้นละติจูดที่สูงขึ้นไป (ณรงค์ชัย, 2560) ผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5 เซนติเมตร น้ำหนัก 50-60 กรัม เมื่อผลแก่จะมีสีม่วง ลักษณะกลม รูปไข่ มีรสหวานและกลิ่นหอมกว่าพันธุ์สีเหลือง มีกรดต่ำและรสหวาน เหมาะกับรับประทานผลสด เสาวรสชนิดนี้มีข้อเสียคือค่อนข้างอ่อนแอกับโรคในเขตร้อน (อัจฉราและคณะ, 2555)

เสาวรสนั้นเป็นผลไม้ชนิดกรดสูงซึ่งมีpH เท่ากับ 3.2 โดยประมาณ ซึ่งประกอบไปด้วยกรด 2 ชนิดหลัก ๆ คือกรดซิตริกและกรดมาร์ลิก (Thokchom and Mandal, 2020) เสาวรสนั้นมีวิตามินเอค่อนข้างสูง โดยเฉพาะสารแคโรทีนอยด์ซึ่งช่วยบำรุงสายตาและผิวพรรณ และยังมีวิตามินซีสูงและพบสาร albumin-homologous protein ในเมล็ดของเสาวรสซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ช่วยแก้อาการนอนไม่หลับ ลดไขมันในเส้นเลือด และโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ

เสาวรสนั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย โดยเนื้อในสามารถรับประทานสดหรือนำไปทำแยมได้ เปลือกและเนื้อส่วนนอกสามารถทำอาหารสัตว์หรือปุ๋ยได้ อีกทั้งน้ำคั้นจากเนื้อนั้นมีกลิ่นหอม กรดสูง สามารถใช้ผสมเป็นเครื่องดื่มหรือผสมกับน้ำผลไม้ชนิดอื่นได้เพื่อเพิ่มกลิ่นหอมและรสชาติ เพราะเสาวรสนั้นเนื่องจากกลิ่นและรสชาติดีแล้วนั้นยังมีคุณค่าทางอาหารสูงอีกด้วย นอกจากนั้นยังนำไปใช้แต่งกลิ่นและรสชาติของไอศกรีม เค้ก ลูกกวาด และไวน์ โดยมีการนำเสาวรสนั้นเข้ามาปลูกในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2498 เพื่อส่งโรงงานแปรรูป โดยมีแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญอยู่ที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย น่าน เพชรบูรณ์ ปราจีนบุรี ระยอง ตราด กาญจนบุรี บุรีรัมย์ ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และนราธิวาส (บรรจง และคณะ, 2555) ซึ่งเสาวรสสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศประเทศไทยเนื่องจากปลูกได้ง่ายและดูแลรักษาไม่ยุ่งยาก

2.5 แบคทีเรียก่อโรค

2.5.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นรูปท่อน (rod shape) ขนาด 0.3-2.2 x 1.2-7.0 ไมโครเมตร สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะมีอากาศ สร้างเอนโดสปอร์ และสร้างเอนไซม์คะตะเลส อุณหภูมิที่เหมาะสม 25-35 องศาเซลเซียส โดยพบได้ทั่วไปตามสิ่งแวดล้อมในดินและพืช ปกติแล้วมักไม่ก่อโรคในมนุษย์ แต่สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ เนื่องจากสปอร์ที่มีความสามารถในการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียสจึงทำให้สปอร์สามารถอยู่รอดได้ในอาหารที่ผ่านความร้อนสูงมาแล้ว สามารถทำให้เกิดเมือกในขนมปัง อีกทั้งยังเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องอีกด้วย (Serra *et al.*, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นรูปท่อน มีขนาด 1.1-1.5 x 2.0-6.0 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นคู่หรืออยู่เดี่ยว ๆ อาจเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์หรือบางชนิดอาจไม่เคลื่อนที่เพราะไม่มีแฟลกเจลลา ไม่สร้างสปอร์ แต่สามารถสร้างแคปซูลและพิษได้ อุณภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ซึ่งมีทั้งแมทาบอลิซึมของการหมักและการหายใจ ปกติแล้ว *E. coli* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่นรวมถึงมนุษย์ด้วย และยังสามารถสร้างวิตามินเคให้แก่ร่างกาย ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเจริญในลำไส้ได้ ซึ่งปกติแล้วส่วนใหญ่จะไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค แต่ถ้าหากเข้าไปในระบบต่าง ๆ ในร่างกายมนุษย์อาจก่อให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรงได้ เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ และโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2557)

นอกจากนั้นแล้ว *E. coli* บางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง (diarrhea) ได้จากการปนเปื้อนผ่านน้ำดื่มหรืออาหารที่รับประทานเข้าไป โดยสามารถจำแนกได้ด้วยวิธีทางซีโรวิทยา ซึ่งปัจจุบันพบได้ถึงมากกว่า 200 โอซีโรไทป์ และเมื่อพิจารณาตามคุณลักษณะการก่อโรค serological grouping แล้วนั้นจะแบ่ง *E. coli* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคได้ 5 กลุ่มดังนี้

2.5.2.1 Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)

E. coli สายพันธุ์นี้มีพลาสมิดขนาด 60 MDa ซึ่งจำเป็นต่อการสร้าง fimbriae ที่มีผลต่อ aggregative expression เชื้อกลุ่มนี้มีสายพันธุ์สร้างเอนเทอโรทอกซินที่ทนความร้อน (heat-stable enterotoxin) โดย enterotoxin/cytotoxin ที่สร้างขึ้นมีขนาด 108 kDa อยู่บน virulence plasmid ขนาดใหญ่ ทำให้เกิดอาการท้องเสียนานกว่า 14 วัน โดยเฉพาะในเด็ก

2.5.2.2 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

E. coli สายพันธุ์นี้สร้างสารพิษที่เรียกว่า Shiga-like toxins (หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า verotoxin / verocytotoxin) ตัวอย่างเชื้อก่อโรคที่เป็นอันตรายมากในกลุ่มนี้คือ *E. coli* O157:H7 สัญลักษณ์ O คือโอแอนติเจน (O antigen) ที่อยู่ที่ส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เยื่อหุ้มชั้นนอกรอบ ๆ ผนังเซลล์ และ H หมายถึงแฟลกเจลลาแอนติเจน

การติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงมีอาการท้องเสียไม่รุนแรงและมีเลือดออก หรือแม้แต่มีอาการของโรคท้องเสียที่รุนแรงและมีเลือดออก (severe hemorrhagic cotilis, HC) ระยะฟักตัวเฉลี่ยประมาณ 3-8 วัน ผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการปวดท้องรุนแรง ท้องเสียมีน้ำออกมามากบริเวณกระพุ้งลำไส้ใหญ่ (cecum) และลำไส้ใหญ่ด้านที่เอนลงเป็นบริเวณหลักที่ติดเชื้อ หลังจากนั้น 1-3 วันอาการจะรุนแรงขึ้นจนมีเลือดออกโดยไม่มีไข้หรือมีไข้เล็กน้อย หลังจากมีอาการท้องเสียได้ประมาณ 7-10 วัน ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 50 โดยเฉพาะในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 10 ปี จะมีอาการรุนแรงขึ้นเป็น hemolytic uremic syndrome (HUS) นำไปสู่อาการไตวายในที่สุด การสร้าง Shiga toxin นั้นมีบทบาทในการก่อโรค HC และ HUS

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณี ...

คือทำให้เกิดการตอบสนองต่อการติดเชื้อเพิ่มขึ้นโดยการเกิดการอักเสบในลำไส้เล็กและเป็นผลให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดอาการท้องเสียและมีเลือดออก

2.5.2.3 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

โดยทั่วไปเชื้อสายพันธุ์นี้ไม่สร้างเอนเทอโรทอกซินเหมือนกลุ่ม ETEC แต่เมื่อเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และเพิ่มจำนวนใน colonic epithelial cells และแพร่ไปยังเซลล์ติดกัน เชื้อสายพันธุ์นี้มีพลาสมิดขนาด 140 MDa พลาสมิดนี้มีความสำคัญต่อการบุกรุกของเชื้อ โดยพบว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีพลาสมิดจะไม่มีการบุกรุกและไม่ก่อโรค เชื้อในกลุ่มนี้จะบุกรุกเข้าที่ลำไส้ใหญ่ มีผลทำให้เกิดอาการท้องเสีย อาจมีเลือดหรือไม่มีเลือดปนมา เด็กเล็กและคนชราจะติดเชื้อนี้ได้ง่าย ระยะเวลาหลังได้รับเชื้อจนกระทั่งเกิดอาการระหว่าง 2-48 ชั่วโมง

2.5.2.4 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ปกติไม่สร้างเอนเทอโรทอกซิน แม้แต่ว่าจะเป็นสาเหตุของอาการท้องเสีย เชื้อนี้จะมีพลาสมิดที่ทำให้สามารถเกาะติดและเพิ่มจำนวนที่ intestinal mucosa ได้

2.5.2.5 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

แบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะเกาะติดและเพิ่มจำนวนที่ลำไส้เล็กโดยอาศัย fimbrial colonization factor antigens (CFAs) ซึ่งจะถูกกำกับโดยพลาสมิด เมื่อเชื้อแบคทีเรียเกาะติดแล้วจะสร้างเอนเทอโรทอกซินจำนวน 1 หรือ 2 ชนิด เชื้อสายพันธุ์นี้จะทำให้เกิดอาการท้องเสียทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ เป็นสาเหตุหลักของ travelers' diarrhea โรคที่เกิดจาก ETEC มักไม่ค่อยมีไข้แต่จะมีอาการท้องเสียฉับพลัน และต้องได้รับเชื้อปริมาณมากถึง 10^8 – 10^{10} CFU/mL จึงจะเกิดอาการท้องเสียในผู้ใหญ่

นอกจากนี้แล้วด้วยคุณสมบัติของ *E. coli* ที่สามารถมีชีวิตอยู่ภายนอกร่างกายได้นาน จึงทำให้ *E. coli* ถูกใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนอุจจาระ (index of faecal contamination) ซึ่งถ้าตรวจพบ *E. coli* ในน้ำและอาหารนั้นบ่งบอกถึงความเป็นไปได้ว่าอาจปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารด้วยเช่นกัน

2.5.3 *Kocuria rhizophila*

Kocuria rhizophila เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลมคู่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-3.5 ไมโครเมตร เซลล์อาจอยู่เดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นคู่ หรืออาจเกาะเป็นกลุ่มเนื่องจากแบ่งตัวหลายระนาบหรือเกาะกัน 4 เซลล์ (tetrad) หรือเกาะกัน 8 เซลล์คล้ายลูกบาศก์ (sarcinae) สร้างเอนไซม์คะตะเลส สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 5 ชอบเจริญในที่อุณหภูมิปานกลางในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดได้ แต่ไม่มีการผลิตแก๊ส (กมลวรรณ และคณะ, 2557) ปกติแล้วจะสามารถพบ *Kocuria rhizophila* ได้จากสภาวะแวดล้อมทั่วไปตามผิวหนังของมนุษย์และสัตว์หรือตามสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ยังพบเชื้อชนิดนี้ได้ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือจำหน่าย ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญต่อการเสียของอาหาร โดยสามารถทำให้ปลาที่ถนอมด้วยเกลือเน่าเสียได้ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม และถ้าหากน้ำนมดิบไม่ถูกนำไปแช่เย็นทันทีก็สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อ *K. rhizophila* จากการรักษาในโรงพยาบาลด้วย โดยพบมากในอากาศภายในอาคาร เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการอักเสบแล้วแต่ตำแหน่งของอวัยวะที่ติดเชื้อ เช่น ฝีหนองบนผิวหนัง หรือปอดอักเสบ

2.5.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นรูปท่อนตรงถึงโค้ง ขนาด 0.5-1.0 x 1.5-5.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้หลายชนิด สร้างเอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดสได้ ต้องการอากาศในการเจริญ โดยปกติแล้วจะแพร่กระจายตามธรรมชาติในดินหรือน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำจืด ปกติแล้ว *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ แต่ก็สามารถก่อโรคได้เช่นกัน โดยจะก่อโรคได้ในมนุษย์ สัตว์ และต้นไม้ *P. aeruginosa* นั้นเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่มักพบได้บ่อยในโรงพยาบาล สามารถแพร่กระจายจากผู้ป่วยคนหนึ่งไปยังอีกคนหนึ่งได้ผ่านการบริโภคน้ำหรืออาหารที่ไม่สะอาด ซึ่งปกติแล้วจะไม่ก่อให้เกิดโรคในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง แต่จะก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาลนาน ๆ จะมีโอกาสติดเชื้อชนิดนี้ได้สูงขึ้น เมื่อติดเชื้อ *P. aeruginosa* ผู้ป่วยจะมีความเสี่ยงในการเสียชีวิตสูงขึ้น โดยจะเข้าสู่บริเวณที่ระบบป้องกันตนเองของผู้ป่วยมีความผิดปกติ เช่น บริเวณเยื่อบุเมือก ผิวหนังที่ฉีกขาดจากการถูกทำลายที่เนื้อเยื่อโดยตรง เมื่อเกิดการใช้สายหรือท่อสวนเข้าที่เส้นเลือดหรือท่อปัสสาวะ เมื่อ neutrophil ลดลง หรือในช่วงที่ให้เคมีบำบัดสำหรับรักษาโรคมะเร็ง เชื้อแบคทีเรียจะเข้าเกาะและ colonize ที่เยื่อบุเมือกหรือผิวหนัง จากนั้นจะเกิดการบุกรุกเฉพาะที่ และก่อให้เกิดโรคที่กระจายไปทั่วร่างกาย กระบวนการเหล่านี้จะเกิดจากเอนไซม์และสารพิษ ส่วนพอลิแซคคาไรด์จะเป็นส่วนหลักที่ทำให้เกิดไข้ ช็อค ปัสสาวะน้อย (oliguria) เกิดการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวที่ผิดปกติ (leukocytosis) หรืออาจเกิดการลดลงของเม็ดเลือดขาว (leucopenia) เกิดการจับตัวในเส้นเลือดกระจายไปทั่ว และเกิดอาการหายใจลำบาก *P. aeruginosa* มีความสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่แผลหรือแผลไฟไหม้ได้ โดยจะเกิดเป็นหนองสีเขียว-น้ำเงิน ถ้าติดเชื้อจากการเจาะเข้าที่บริเวณเอว (lumbar puncture) จะเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ถ้าติดเชื้อจากสายหรือท่อสวนจะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ ส่วนการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะจากเครื่องช่วยหายใจปนเปื้อนและทำให้เกิดปอดบวม บางครั้งอาจทำให้เกิดการอักเสบของหูชั้นนอก (บริเวณใบหูหรือช่องหู) แบบไม่รุนแรงในนักว่ายน้ำ นอกจากนี้อาจทำให้เกิดการอักเสบของหูชั้นนอกชนิดรุนแรงในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน การติดเชื้อที่บริเวณตาจะทำให้เกิดการทำลายตาอย่างรวดเร็ว มักเกิดขึ้นหลังจากผ่าตัดหรือบาดเจ็บในเด็กทารก ผู้

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อ่อนแอ ผู้ที่มีแผลไฟไหม้รุนแรง เชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือดและทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด และเสียชีวิต

2.5.5 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Staphylococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่เกิน 4 เซลล์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ สร้างแคปซูลในช่วงที่ยังอ่อนอยู่ แต่ในช่วง Stationary phase แคปซูลจะหายไป ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobe) หรือเจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ *S. aureus* สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 7.0-47.8 องศาเซลเซียส แต่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 30-37 องศาเซลเซียส ระดับ pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0-7.5 ลักษณะเด่นคือส่วนใหญ่ทนเกลือและน้ำตาลได้สูง โดยเจริญในค่า a_w ระดับต่ำกว่าระดับ a_w ที่แบคทีเรียไม่ชอบความเค็ม (nonhalophilic bacteria) จะเจริญได้ โดยเจริญได้ในช่วง 0.85 ถึงมากกว่า 0.99 และสามารถทนเกลือได้ที่ 18-20% เชื้อ *S. aureus* ส่วนใหญ่สร้าง enterotoxin ได้ ซึ่งจะให้ผลบวกกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลสและเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส

แบคทีเรีย *S. aureus* ส่วนใหญ่จะปนเปื้อนในอาหาร โดยทั่วไปมักมีสาเหตุมาจากการสัมผัสของมนุษย์ เนื่องจากมนุษย์เป็นแหล่งที่สำคัญของเชื้อชนิดนี้ โดยเฉพาะตามผิวหนังและรูจมูกของมนุษย์เป็นแหล่งสะสมของ *S. aureus* จึงทำให้โรคอาหารเป็นพิษเนื่องมาจาก *S. aureus* มักมีสาเหตุจากการปนเปื้อนในอาหารโดยตรงจากมือของมนุษย์ หรือผ่านอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ประกอบการแปรรูปอาหาร เช่น มีด เขียง ภาชนะใส่อาหารและอื่น ๆ นอกจากนี้การเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อชนิดนี้อาจมีสาเหตุร่วมกับสภาพที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น การทำให้อาหารเย็นไม่เพียงพอ การเตรียมอาหารไว้ล่วงหน้านานเกินไป สุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดี และการให้ความร้อนอาหารไม่เพียงพอ เป็นต้น

อาการของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus* จะเกิดขึ้นภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไป จะเกิดอาการภายใน 1-6 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้นได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน เป็นตะคริวที่ท้อง (abdominal cramp) มักจะรุนแรง ท้องเสียเหงื่อออก ปวดหัว บางครั้งอุณหภูมิของร่างกายลดลง อัตราการเสียชีวิตต่ำมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 บีกเกอร์

3.1.2 หลอดทดลอง

3.1.3 Pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร

3.1.4 Micropipette ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.1.5 ทิป (Tip)

3.1.5 ลูปสำหรับเขี่ยเชื้อ (Innoculating Loop)

3.1.6 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.1.7 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)

3.1.8 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3.1.9 ปากคีบ (Forcep)

3.1.10 จานเพาะเชื้อ (Petri disc)

3.1.11 น้ำกลั่น (Distillation Water)

3.1.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

3.1.13 ขวดแก้วดูแรน (Duran bottle)

3.1.14 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.1.15 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.1.16 เครื่องชั่งสารแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision Balance 2 Digits)

3.1.17 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)

3.1.18 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (250 ml Erlenmeyer flask)

3.1.19 ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (incubator)

3.1.20 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker)

3.1.21 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูง (Autoclave)

3.1.22 ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabinet)

3.1.23 สไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Slide and Coverslip)

3.1.24 ไม้พันสำลี (Cotton swab)

3.1.25 กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร (100 ml Cylinder)

3.1.26 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycle)

3.1.27 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.28 เครื่องถ่ายภาพจากเจล (Gel Documentary)

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (70% v/v)

3.2.2 สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (90% v/v)

3.2.3 สารละลายคริสตัลไวโอเลต 2% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (2% v/v)

3.2.4 สารละลายแกรมไอโอดีน 1% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (1% v/v)

3.2.5 สารละลายซาฟรานิน 0.5% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (0.5% v/v)

3.2.6 อิมเมอร์ชั่นออยล์ (immersion oil)

3.2.7 10X Phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4)

3.2.8 ผงวุ้นสำหรับเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (Microbiological Agar)

3.2.9 Tryptic Soy broth (TSB)

3.2.10 Plate count agar (PCA)

3.2.11 Mueller Hinton broth (MHB)

3.2.12 Plate Count Agar (PCA)

3.2.13 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% โดยมวลต่อปริมาตร (3% w/v)

3.2.14 กลีเซอรอล 20% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (20% v/v)

3.2.15 สารละลาย GD1

3.2.16 สารละลาย GD2

3.2.17 Lysozyme 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.18 Proteinase K 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.19 RNase 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

3.2.20 สารละลาย GB

3.2.21 Help B Buffer

3.2.22 เอทานอล 80% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (80% v/v)

3.2.23 DNA Hydration solution

3.2.24 Primer 27F และ 1492R

3.2.25 dNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate)

3.2.26 10X Taq Buffer

3.2.27 Taq Polymerase

3.2.28 วุ้นผง Agarose

3.2.29 1X TAE (Tris-Acetate-EDTA)

3.2.30 สีย้อม DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.31 6X Loading dye

3.2.32 100 bp DNA Ladder M

3.3 เชื้อแบคทีเรียสำหรับใช้ทดสอบ

3.3.1 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

3.3.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.3.3 *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

3.3.4 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.3.6 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

3.4.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง

เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy 1 และ Pfy 2 บนอาหารแข็ง TSA ด้วยวิธี Cross streak นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งได้แก่ ลักษณะโคโลนี สี และการสร้างสารสี เป็นต้น

3.4.2 การศึกษารูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรม

นำเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA ในข้อ 3.4.1 มาศึกษารูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยหยดน้ำกลั่นลงบนกระจกสไลด์ ใช้ลูปแตะเชื้อนำมาผสมกับหยดน้ำกลั่นและเกลี่ย (Smear) ให้ทั่วทิ้งไว้ให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟเพื่อตรึงเซลล์ หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตบนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำอีกครั้ง หยดเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 % v/v เพื่อล้างสี ล้างด้วยน้ำกลั่นทันที แล้วทำการหยดสารละลายซาฟรานิน ทิ้งไว้ 30 วินาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่น รอให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษารูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรม

3.5 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

3.5.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์

เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยวิธี cross streak ลงบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีอากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ถ่ายเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA จำนวน 5-7 โคโลนีใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube ที่มีอาหารเลี้ยงเหลว TSB ซึ่งมีองค์ประกอบของสารละลายกลีเซอรอล 20 % v/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำเชื้อไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาระยะยาวต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

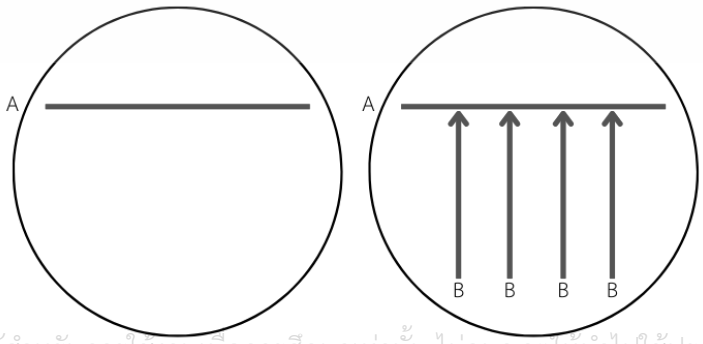
เพาะเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis Escherichia coli Kocuria rhizophila Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี cross streak ลงบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีอากาศ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นใช้ถ่ายเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA จำนวน 5-7 โคโลนีใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube ที่มีอาหารเลี้ยงเหลว TSB ซึ่งมีองค์ประกอบของสารละลายกลีเซอรอล 20 % v/v ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำเชื้อไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาระยะยาวต่อไป

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์

3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streak

การทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเบื้องต้นด้วยวิธี Cross streak ได้ดัดแปลงวิธีจาก Boonman *et al.,* 2023 เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยวิธี cross streak ลงบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร TSA มาทำการขีดเชื้อในลักษณะเป็นเส้นตามยาวลงบนอาหารแข็ง Mueller Hinton agar (MHA) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอายุ 18 ชั่วโมงที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA ลงในสารละลาย Phosphate Buffer Saline (pH 7.4) และทำการเจือจางให้มีค่าความการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จากนั้นใช้เชี่ยเชื้อจุ่มสารละลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนำไปขีดในแนวตั้งฉากกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เจริญบนอาหารแข็ง MHA โดยขีดให้ใกล้กับรอยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เจริญมากที่สุดโดยไม่สัมผัสโดยรอยเชื้อที่เจริญ ดังแสดงในรูปที่ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง บันทึกความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตผลจากรอยขีดที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.1 การขีดเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (เส้น A) และแบคทีเรียก่อโรค (เส้น B) ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streak

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar plug

เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยวิธี cross streak ลงบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้หลอดพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลงบนตำแหน่งที่มีเชื้อเจริญบริเวณ quadrant แรกของรอยเชื้อที่เกิดขึ้นจากการ cross streak ดังแสดงในรูปที่ 2

เตรียมและเจือจางเชื้อแบคทีเรียก่อโรคตามข้อ 3.6.1 จากนั้นใช้ไม้พันสำลี (Cotton swab) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มสารละลายเชื้อก่อโรคและนำไปป้าย (swab) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MHA ทิ้งไว้ซักครู่ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นนำชิ้นวุ้นของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เจาะไว้มาวางลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เปรียบเทียบความสามารถการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยบันทึกขนาดของวงใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ ชิ้นวุ้นของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

รูปที่ 3.2 ลักษณะการขีดเชื้อเพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak

3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion

การทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion ได้ดัดแปลงวิธีจาก Tavarideh *et al.,* 2022 เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท โดยวิธี cross streak ลงบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาถ่ายเชื้อ 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบเวลาแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการแยกน้ำเลี้ยง (supernatant) ออกจากตัวเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมและเจือจางเชื้อแบคทีเรียก่อโรคตามข้อ 3.6.1 จากนั้นใช้ไม้พันสำลี (Cotton swab) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มสารละลายเชื้อก่อโรคและนำไปป้าย (swab) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MHA ทิ้งไว้ซักครู่ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้หลอดพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลงบนอาหารแข็ง MHA จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงปราศจากตัวเซลล์ที่จากการก่อนหน้าปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะไว้ ที่ไว้ ณ อุณหภูมิห้องจนกระทั่งของเหลวในหลุมแพร่ออกจากหลุมจนหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เปรียบเทียบความสามารถการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยบันทึกขนาดของวงใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุมทดสอบ

3.7 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

3.7.1 การเตรียมความเข้มข้นที่เหมาะสมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ สำหรับการสกัดสารพันธุกรรม (DNA)

เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทลงบนอาหารแข็ง TSA โดยวิธีการ Cross streak นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว TSB นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปรับความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 0.3 และ 0.4 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำเชื้อแต่ละค่าการดูดกลืนแสงมาเจือจางด้วยวิธีการเจือจางทีละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) โดยกำหนดให้มีระดับช่วงการเจือจางอยู่ในช่วง 10^{-1} ถึง 10^{-5} จากนั้นปิเปตเชื้อที่แต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 20 ไมโครลิตรหยดลงบนหน้าอาหารแข็ง Plate Count Agar (PCA) ระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียทดสอบในรูป CFU/mL โดยความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัด BIOFACT^{TM} Genomic DNA Prep Kit For Gram(+) Bacterium คือ 1 x 10^{8} CFU/mL

3.7.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

สกัดสารพันธุกรรมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์โดยใช้ชุด BIOFACT^{TM} Genomic DNA Prep Kit For Gram(+) Bacterium เพาะเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทลงบนอาหารแข็ง TSA โดยวิธีการ Cross streak นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว TSB นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับค่าความขุ่นให้มีค่าการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^8 CFU/mL) จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรลงหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที และดูดส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย GD1 200 ไมโครลิตรและ lysozyme เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 2 ไมโครลิตรเขย่าผสมสารละลายในหลอดไมโครทิวบ์ด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vortex) 1 นาที นำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย GD2 200 ไมโครลิตร Proteinase K เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 5 ไมโครลิตรและ RNase เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 2 ไมโครลิตร เขย่าผสมสารละลาย 10 วินาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 นาที และ 70 องศาเซลเซียส 10 นาทีตามลำดับ นำมาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใสที่ได้ลงในหลอดไมโครทิวบ์ แล้วเติมสารละลาย GB 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาประมาณ 10 ถึง 20 ครั้ง ทำการ column binding โดยใส่สปินคอลัมน์ (spin column) ลงในหลอด collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตรและเติมสารละลาย Help B Buffer 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 30 วินาที ทิ้งของเหลวที่ผ่านสปินคอลัมน์ ปิเปตสารละลายในหลอดไมโครทิวบ์ก่อนหน้านี้ลงบนสปินคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยง 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่ผ่านสปินคอลัมน์ แล้วย้ายสปินคอลัมน์ลงในหลอด collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทำการล้างคอลัมน์โดยปิเปตสารละลาย WB (Ethanol 80% v/v) 500 ไมโครลิตรลงบนสปินคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที 30 วินาที ย้ายสปินคอลัมน์ใส่ลงในหลอด collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ด้วย WB ซ้ำอีกครั้งแล้วทิ้งสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ ย้ายสปินคอลัมน์ใส่ลงในหลอด Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำสปินคอลัมน์ใส่ลงในหลอด ไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปต DNA Hydration Solution 50 ไมโครลิตรลงบนสปินคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที ทิ้งสปินคอลัมน์

นำสารพันธุกรรมที่สกัดไปตรวจสอบการมีอยู่ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ผสม PCR product 4 ไมโครลิตร สีย้อม DNA 1 ไมโครลิตร และ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร นำไปหยอดลงหลุมของ agarose gel ความเข้มข้น 0.8 % w/v ในสารละลาย TAE buffer กำหนดค่ากระแสไฟฟ้าสำหรับการวิเคราะห์อยู่ที่ 80 โวลต์ ระยะเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปวิเคราะห์ภายใต้เครื่อง เครื่อง Gel Doc system (ImageLab6.0) เพื่อแสดงภาพของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้น

3.7.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการ Genotypic characterization โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายบริเวณ 16s rRNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA -3') และไพรเมอร์ 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') โดยส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR

ลำดับ	องค์ประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตร
1	ไพรเมอร์ 27F	10 μM	5.0 μL
2	ไพรเมอร์ 1492R	10 μM	5.0 μL
3	dNTP	2 μM	2.5 μL
4	Standard Taq Buffer	10X	5.0 μL
5	Taq DNA polymerase	5 U/μL	0.1 μL
6	Deionized water (DI)	-	30.4 μL
7	DNA template	-	2.0 μL
8	Total	-	50 μL

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermocycle (GeneAmp®PCR system 2700) ด้วยสภาวะอุณหภูมิ ในการทำปฏิกิริยา (Thermal reaction condition) ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)
Initial denaturation	94	180
วงจรอุณหภูมิการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายจำนวน 35 รอบ		
Denaturation	94	30
Annealing	54	60
Extension	72	90
Final extension	72	180

นำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยวิธีการ PCR (PCR product) ไปตรวจสอบการมีอยู่และขนาดของ PCR product ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ผสม PCR product 4 ไมโครลิตร สีย้อม DNA 1 ไมโครลิตร และ 6X loading

เอกสารนี้ [illegible] ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dye 1 ไมโครลิตร นำไปหยอดลงหลุมของ agarose gel ความเข้มข้น 1.5 %w/v ในสารละลาย TAE buffer กำหนดค่ากระแสไฟฟ้าสำหรับการวิเคราะห์อยู่ที่ 80 โวลต์ ระยะเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างไปวิเคราะห์ภายใต้เครื่อง เครื่อง Gel Doc system (ImageLab6.0) เพื่อแสดงภาพและขนาดของ PCR Product ที่เกิดขึ้น

3.7.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3.7.3 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท SolGent Co., Ltd., สาธารณรัฐเกาหลี โดยใช้ universal primer 2 คู่ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16S rRNA ได้แก่ 27F/1492R primer หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานในฐานข้อมูล Ezbiocloud (www.ezbiocloud.net/eztaxon)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

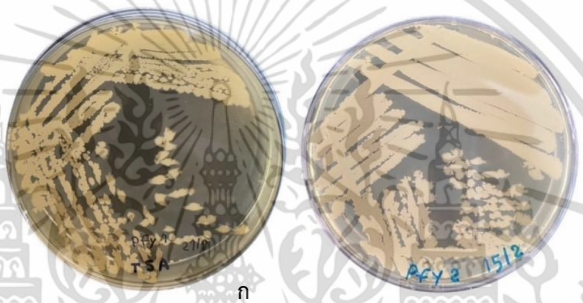
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

4.1.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA

การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2 บนอาหารแข็ง TSA พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2 มีลักษณะโคโลนีสีขาวขอบหยัก ผิวหน้าขรุขระ ไม่มีความนูน และไม่พบการสร้างสารสี ดังแสดงในรูปที่ 4.1

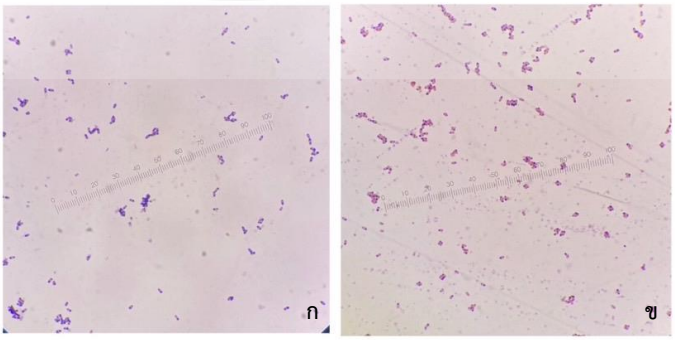


ก ข

รูปที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟท์บนอาหารแข็ง TSA
(ก) ไอโซเลท Pfy1 **(ข)** ไอโซเลท Pfy2

4.1.2 การศึกษารูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรม

การศึกษารูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2 พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทนั้นเป็นแกรมบวกเนื่องจากย้อมติดสีม่วงของ crystal violet และรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ไอโซเลท Pfy1 มีรูปร่างท่อนสั้น จัดเรียงตัวต่อกันเป็นเส้นสาย พบเอนโดสปอร์กลางเซลล์ และไอโซเลท Pfy2 มีรูปร่างท่อนสั้น จัดเรียงตัวต่อกันเป็นเส้นสาย พบเอนโดสปอร์ปลายเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.2



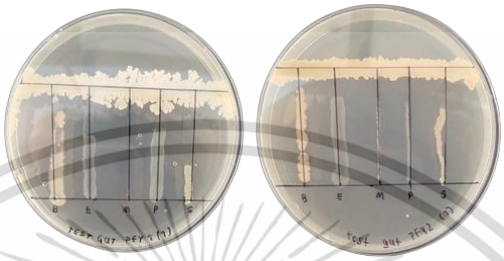
รูปที่ 4.2 รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีแกรมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์
(ก) ไอโซเลท Pfy1 **(ข)** ไอโซเลท Pfy2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์

4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streak

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากเสาวรสทั้ง 2 ไอโซเลท ด้วยวิธี Cross streak พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis E. coli K. rhizophila P. aeruginosa* และ *S. aureus* ดังแสดงในรูปที่ 4.3



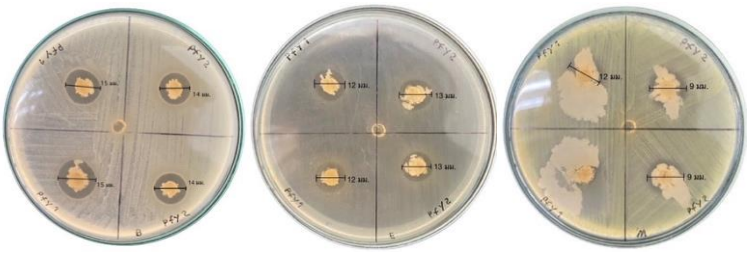
ก ข

รูปที่ 4.3 แสดงบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) จากวิธี Cross streak ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อแบคทีเรียก่อโรค **(B)** *B. subtilis* **(E)** *E. coli* **(M)** *K. rhizophila* **(P)** *P. aeruginosa* และ **(S)** *S. aureus* **(ก)** ไอโซเลท Pfy1 **(ข)** ไอโซเลท Pfy2

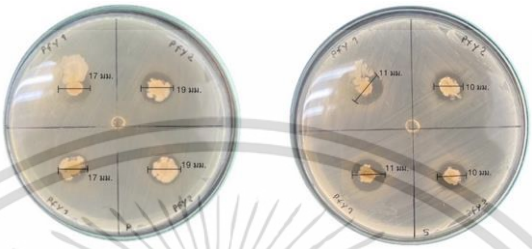
4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar plug

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar plug พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis E. coli K. rhizophila P. aeruginosa* และ *S. aureus* ดังแสดงในรูปที่ 4.4 โดยไอโซเลท Pfy1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้มากที่สุดซึ่งปรากฏบริเวณยับยั้งเท่ากับ 17 มิลลิเมตร และ *B. subtilis E. coli K. rhizophila S. aureus* มีความสามารถในการยับยั้งรองลงมาตามลำดับ และไอโซเลท Pfy2 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* ได้มากที่สุดซึ่งปรากฏบริเวณยับยั้งเท่ากับ 19 มิลลิเมตร และ *B. subtilis E. coli S. aureus K. rhizophila* มีความสามารถในการยับยั้งรองลงมาตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข ค



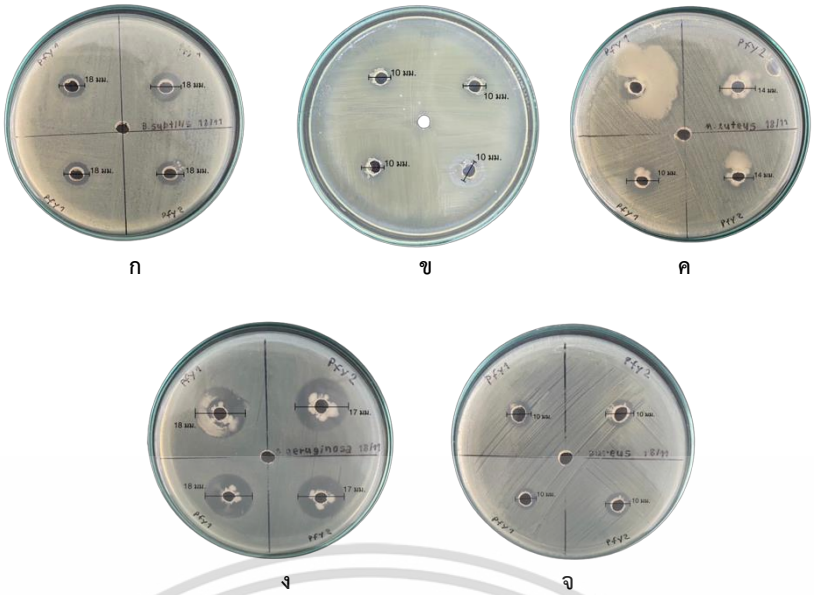
ง จ

รูปที่ 4.4 แสดงบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) จากวิธี Agar plug ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อแบคทีเรียก่อโรค **(B)** *B. subtilis* **(E)** *E. coli* **(M)** *K. rhizophila* **(P)** *P. aeruginosa* และ **(S)** *S. aureus* **(ก)** ไอโซเลท Pfy1 **(ข)** ไอโซเลท Pfy2

4.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิดได้ ได้แก่ *B. subtilis E. coli K. rhizophila P. aeruginosa* และ *S. aureus* ดังแสดงในรูปที่ 4.5 โดยไอโซเลท Pfy1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ได้มากที่สุดซึ่งปรากฏบริเวณยับยั้งเท่ากับ 18 มิลลิเมตร และ *E. coli S. aureus K. rhizophila* มีความสามารถในการยับยั้งรองลงมาตามลำดับ และไอโซเลท Pfy2 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ได้มากที่สุดซึ่งปรากฏบริเวณยับยั้งเท่ากับ 18 มิลลิเมตร และ *P. aeruginosa K. rhizophila E. coli S. aureus* มีความสามารถในการยับยั้งรองลงมาตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) จากวิธี Agar well diffusion ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ต่อแบคทีเรียก่อโรค **(B)** *B. subtilis* **(E)** *E. coli* **(M)** *K. rhizophila* **(P)** *P. aeruginosa* และ **(S)** *S. aureus* **(ก)** ไอโซเลท Pfy1 **(ข)** ไอโซเลท Pfy2

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streak Agar plug และ Agar well diffusion พบว่าการทดสอบทั้ง 3 วิธีนั้นมีความสอดคล้องกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 คือ แบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 ชนิด แต่ความสามารถในการยับยั้งนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละวิธีการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่าการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion นั้นมีแนวโน้มที่จะมีบริเวณยับยั้งที่มากกว่าการทดสอบด้วยวิธี Agar plug โดยอาจเป็นผลมาจากวิธีทดสอบด้วย Agar well diffusion นั้นมีขั้นตอนในการปั่นเหวี่ยงน้ำเลี้ยงของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ จึงทำให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สร้างภายในเซลล์นั้นออกมาอยู่ใน supernatant ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท

ไอโซเลท	Cross streak						Agar plug						Agar well diffusion				
	B	E	K	P	S	Sa	B	E	K	P	S	Sa	B	E	K	P	S
Pfy1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pfy2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B : *Bacillus subtilis*, E : *Escherichia coli*, K : *Kocuria rhizophila*, P : *Pseudomonas aeruginosa*, S : *Staphylococcus aureus*,

+ : มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย, - : ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบบริเวณยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (Inhibition zone) ของเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลท

เชื้อก่อโรค	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	Agar plug		Agar well diffusion	
	Pfy1	Pfy2	Pfy1	Pfy2
B. subtillis	$15\pm0^{(a,b,c)}$	$14\pm0.141^{(a,b,c)}$	$18\pm0.141^{(c)}$	$18\pm0.071^{(c)}$
E. coli	$12\pm0.212^{(a,b)}$	$13\pm0.071^{(a,b)}$	$10\pm0^{(a)}$	$10\pm0.071^{(a)}$
K. rhizophila	$12\pm0^{(a)}$	$9\pm0.212^{(a)}$	$10\pm0^{(a)}$	$14\pm0.212^{(a)}$
P. aeruginosa	$17\pm0.071^{(b,c)}$	$19\pm0.071^{(b,c)}$	$18\pm0.141^{(b,c)}$	$17\pm0.141^{(b,c)}$
S. aureus	$11\pm0.141^{(a)}$	$10\pm1.414^{(a)}$	$10\pm0^{(a)}$	$10\pm0.071^{(a)}$

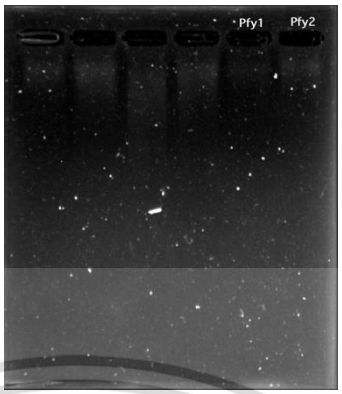
4.3 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

4.3.1 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์

จากการนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทไปสกัดสารพันธุกรรม (DNA) และตรวจสอบการมีอยู่ของสารพันธุกรรมด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis พบแถบแบนสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

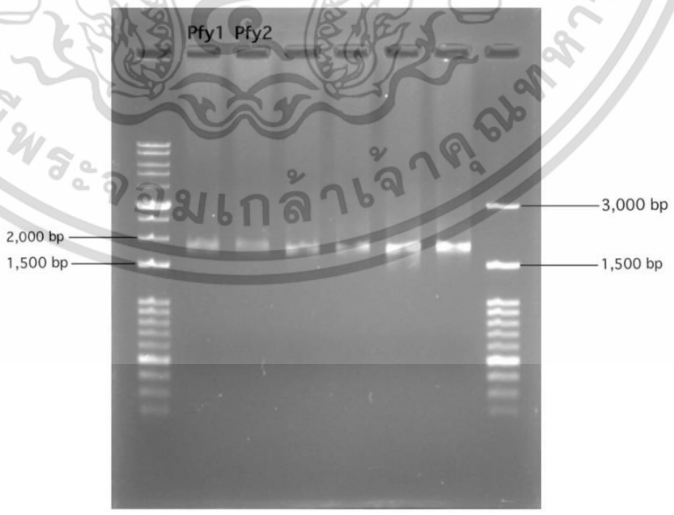
พันธุกรรมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทซึ่งสามารถนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนการ PCR ต่อไปได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 สารพันธุกรรมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2 บน 0.8% Agarose gel electrophoresis

4.3.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยวิธีการ Genotypic characterization โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 16S rRNA

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R และตรวจสอบการมีอยู่และขนาดของ PCR product ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยผลการศึกษานั้นพบดีเอ็นเอเป้าหมาย และเมื่อเทียบผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทนั้นมีขนาดอยู่ที่ 1800 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rRNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

จากการนำ PCR product ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานในฐานข้อมูล Ezbiocloud พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 นั้นมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus siamensis* KCTC 13613^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.50% *Bacillus velezensis* CR-502^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.49% *Bacillus subtilis* NCIB 3610^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.36% *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.29% และ *Bacillus nakamurai* B-16^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.21% แบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy2 นั้นมีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus siamensis* KCTC 13613^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.86% *Bacillus velezensis* CR-502^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.85% *Bacillus subtilis* NCIB 3610^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.71% *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.64% และ *Bacillus nakamurai* NRRL B-4109^T โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.57% ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.3 ตารางเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy1 กับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานในฐานข้อมูล Ezbiocloud

Taxon name	Strain name	Similarity(%)	Variation ratio	Completeness (%)
Bacillus siamensis	KCTC 13613^T	99.50	7/1401	100.0
Bacillus velezensis	CR-502^T	99.49	7/1386	95.4
Bacillus subtillis	NCIB 3610^T	99.36	9/1401	100.0
Bacillus amyloliquefaciens	DSM 7^T	99.29	10/1401	100.0
Bacillus nakamurai	B-16^T	99.21	11/1401	100.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ตารางเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทดด์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ไอโซเลท Pfy2 กับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานในฐานข้อมูล Ezbiocloud

Taxon name	Strain name	Similarity(%)	Variation ratio	Completeness (%)
Bacillus siamensis	KCTC 13613^{T}	99.86	2/1391	100.0
Bacillus velezensis	CR-502^{T}	99.85	2/1379	95.4
Bacillus subtillis	NCIB 3610^{T}	99.71	4/1391	100.0
Bacillus amyloliquefaciens	DSM 7^{T}	99.64	5/1391	100.0
Bacillus nakamurai	NRRL B-41091^{T}	99.57	6/1391	100.0

จากผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus siamensis* KTCC 13613^{T} และ *Bacillus velezensis* CR-502^{T} โดยมีค่าความคล้ายคลึงที่ใกล้กันมาก อย่างไรก็ตามทั้ง *B. siamensis* และ *B. velezensis* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสที่แตกต่างกัน โดย *B. velezensis* สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ แต่ *B. siamensis* ไม่พบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Layly *et al.,* 2021) ดังนั้นจึงสามารถทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสเพื่อระบุความแตกต่างของทั้งสองสายพันธุ์ได้

แบคทีเรีย *Bacillus velezensis* และ *Bacillus siamensis* เป็นแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes อยู่ในวงศ์ Bacillaceae มีลักษณะเป็นรูปท่อน ติดสีแกรมบวก พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Punnanee *et al.*, 2010) สามารถสร้างเอนโดสปอร์บริเวณกลางหรือเกือบปลายเซลล์ ซึ่งเอนโดสปอร์นั้นทนต่อความร้อน ความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ (Emmert and Handelsman, 1999)

Bacillus velezensis เป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช การศึกษายีนบนจีโนมของ *B. velenzensis* พบว่ายีน 10% ของจีโนมทั้งหมดเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่มีศักยภาพในการยับยั้งจุลชีพได้ (Chen *et al.,* 2007) โดยส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์สารในกลุ่มnon-ribosomal peptides คือ surfactins bacillomycin-D และ fengycin (Devi *et al*., 2019) และ polyketides คือ macrolactin bacillaene และ difficidin รองลงมาตามลำดับ

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบสารอื่น ๆ เช่น bacillysins และ bacteriocins อีกด้วย (Romero-tabarez *et al.,* 2004)

Bacillus siamensis เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในดินซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชและสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ โดย Dong *et al.* (2023) ได้ศึกษาลำดับเบสทั้งหมดบนจีโนมของ *Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T} ซึ่งพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารยับยั้งจุลชีพ โดยพบสารในกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile organic compounds) คือ acetoin และ 2,3-butanediol สารในกลุ่ม non-ribosomal peptide คือสาร surfactin และ fengycin สารในกลุ่ม polyketides ส่วนใหญ่ที่พบคือสาร bacillaene และ difficidin (pan *et al*., 2019)

Romero-tabarez *et al.* (2006) รายงานว่าสาร macrolactin ที่ผลิตได้จาก *B. velezensis* มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ได้ โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ peptide deformylase ของแบคทีเรีย ทำให้หมู่ formyl ไม่ถูกตัดออกโดยเอนไซม์ deformylase ทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน จึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (จันทนาและคณะ, 2560)

Wu *et al.* (2006) รายงานว่าสาร bacillysin ที่ผลิตได้จาก *B. velezensis* มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ได้ โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ glucosamine synthetase ที่แบคทีเรียใช้ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ได้ (Kenig et al, 1976)

Zimmer man et al. (1986) รายงานว่าสาร difficidin และ oxydifficidin ที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ โดยสามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการแบ่งตัว ยีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีน และยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ได้

Scholz et al. (2014) รายงานว่าสาร amylocyclin และ plantazolicin ที่ผลิตได้จาก *B. velezensis* มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *B. subtilis* และ *K. rhizophila* ได้

Beltran-Gracia *et al.* (2017) รายงานว่าสาร surfactins ที่สร้างจากแบคทีเรียในวงศ์ Bacillaceae มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ และ Xu *et al.* (2004) รายงานว่าสาร surfactins ที่ผลิตได้จาก *B. siamensis* มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ โดย surfactins สามารถทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางลงและเกิดช่องว่างส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์รั่วไหลได้

Medeot DB *et al.* (2020) รายงานว่าสาร fengycins ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* spp. มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *P.aeruginosa* ได้

Pramathesh *et al.* (2020) รายงานว่า bacillaene ที่ผลิตได้จาก *B. siamensis* มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* และ *S. aureus* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกจากเสาวรส 2 ไอโซเลท ได้แก่ Pfy1 และ Pfy2 มาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่าบนอาหารแข็ง TSA ทั้ง 2 ไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีสีขาว ขอบหยัก ผิวหน้าขรุขระ ไม่มีความนูน และไม่พบการสร้างสารสี โดยทั้งสองไอโซเลทเป็นแกรมบวก เนื่องจากย้อมติดสีม่วงของ crystal violet และเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเป็นรูปร่างท่อนสั้น จัดเรียงตัวต่อกันเป็นเส้นสาย พบเอนโดสปอร์ปลายเซลล์ และเมื่อทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Cross streak Agar plug และ Agar well diffusion พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทมีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิดได้ ได้แก่ *Bacillus subtilis Escherichia coli Kocuria rhizophila Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* และเมื่อนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทไปจัดจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลโดยการหาลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบว่าแบคทีเรียเอนโดไฟท์ทั้ง 2 ไอโซเลทมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus siamensis* KCTC 13613^{T} โดยไอโซเลท Pfy1 และ Pfy2 มีค่าความคล้ายคลึง99.50% และ 99.86% ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาปัจจัยเกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะการบ่ม

2. สกัดและระบุสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จันทนา ห่วงสายทอง, แสง อุษยาพร และ อภิโชติ โซ่เงิน. (2560). **Antibiotics in the pipeline**. ในธนะพันธ์ พิบูลย์บรรณกิจ...[และคนอื่น ๆ] (บ.ก.), *ยาต้านจุลชีพที่สำคัญ 2* (หน้า 120-138). กรุงเทพฯ: สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย.

ฉัตรชฎา กันทะเรียน. (2559). **การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สาขาวิชาเทตโนโลยีชีวภาพ

ชุติมา สาตรจีนพงษ์. (2553). **ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยราเอนโดไฟท์ *Nodullisporium* sp.**, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวงศ์. 2550. **การผลิตไม้ผลเมืองหนาวขนาดเล็กในเขตร้อน**. สานักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กรุงเทพมหานครฯ.176หน้า.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2557). ***Escherichia coli***. (สืบค้นออนไลน์)

สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. (ไม่ระบุปีที่เผยแพร่). **จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค: *Salmonella***. (สืบค้นออนไลน์)

อัจฉรา ภาวศุทธิ์ บรรจง ปานดี กนกธร วงศ์กิติ อาภากร อนุพันธ์ และณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวงศ์. (2555). **การทดสอบพันธุ์เสาวรสหวานบนพื้นที่สูงที่ระดับความสูงแตกต่างกัน**. ผลการวิจัยของมูลนิธิโครงการหลวงประจำปี 2555.

Aleynova, O. and K. Kiselev (2023). "**Interaction of Plants and Endophytic Microorganisms: Molecular Aspects, Biological Functions, Community Composition, and Practical Applications.**" Plants 12: 714.

Alibrandi, P., Cardinale, M., Rahman, M. M., Strati, F., Ciná, P., de Viana, M. L., et al. (2018). **The seed endosphere of Anadenanthera colubrina is inhabited by a complex microbiota, including Methylobacterium spp. and *Staphylococcus* spp. with potential plant-growth promoting activities**. **Plant Soil** 422, 81–99. doi: 10.1007/S11104-017-3182-4/FIGURES/5

Bernier SP and Surette MG. (2013). **Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments**. *Front. Microbio.* **4**:20. doi: 10.3389/fmicb.2013.00020

Brusamarello-Santos LC, Gilard F, Brulé L, Quilleré I, Gourion B, Ratet P, Maltempi de Souza E, Lea PJ, Hirel B. **Metabolic profiling of two maize (Zea mays L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Herbaspirillum seropedicae and Azospirillum brasilense. PLoS One. 2017 Mar 31;12(3):e0174576. doi: 10.1371/journal.pone.0174576. PMID: 28362815; PMCID: PMC5375134.

Boonman, N., et al. (2023). "**Antimicrobial activities of endophytic bacteria isolated from Ageratum conyzoides Linn. Biodiversitas Journal of Biological Diversity** Vol. 24 DOI: 10.13057/biodiv/d240405

Chen, X. H., et al. (2008). "**Difficidin and bacilysin produced by plant-associated Bacillus amyloliquefaciens are efficient in controlling fire blight disease**." Journal of biotechnology 140: 38-44.

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka (2005). **Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects**. Appl Environ Microbiol71:.https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005

Diale, O., et al. (2018). "**The antibacterial activity of bacterial endophytes isolated from Combretum molle**." African Journal of Biotechnology 17: 255-262. DOI: 10.5897/AJB2017.16349

Dong, Y., Iniguez, A.L. & Triplett, E.W. (2003). **Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae*** 342. *Plant and Soil* **257**, 49–59 https://doi.org/10.1023/A:1026242814060

Dos Reis LCR, Facco EMP, Salvador M, Flôres SH, de Oliveira Rios A. (2018). **Antioxidant potential and physicochemical characterization of yellow, purple and orange passion fruit**. J Food Sci Technol. Jul;55(7):2679-2691. doi: 10.1007/s13197-018-3190-2.

Emmert EA, Handelsman J. (1999). **Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective**. FEMS Microbiol Lett. Feb 1;171(1):1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13405.x. PMID: 9987836.

Güldaş, Nevcivan & Uysal, Tuğba & Ellidokuz, Hülya & Basbinar, Yasemin. (2019). **Antimicrobial Effect of Piceatannol, a Resveratrol Metabolite, on *Staphylococcus Aureus*. The Journal of Basic and Clinical Health Sciences.** 10.30621/jbachs.2019.745.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD. (2008). **Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol**. Oct;16(10):463-71. doi:10.1016/j.tim.2008.07.008. Epub 2008 Sep 12. PMID: 18789693.

Harvey R.A., Champe P.C., and Fisher B.D. (2007). **Microbiology**. 2 nd ed. United State of America. Lippincott Williams & Wilkins.

He, R.-L., et al. (2009). "**Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from Epimedium brevicornu Maxim**." African Journal of Biotechnology 8: 191- 195.

Hiranrat, W., et al. (2021). "**Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites from Endophytic Fungus Fusarium sp. Isolated from Eichhornia crassipes Linn**." ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports 24: 84-90.

Hirsch, G., Braun, U. (1992). **Communities of parasitic microfungi. In: Winterhoff, W. (eds) Fungi in vegetation science**. Handbook of vegetation science, vol 19. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2414-0_8

Ibrahim, E., Fouad, H., Zhang, M., Zhang, Y., Qiu, W., Yan, C., Li, B., Mo, J., & Chen, J. (2019). **Biosynthesis of silver nanoparticles using endophytic bacteria and their role in inhibition of rice pathogenic bacteria and plant growth promotion**. *RSC Advances, 9*, 29293 - 29299.

Iniguez AL, Dong Y, Triplett EW. (2004). **Nitrogen fixation in wheat provided by Klebsiella pneumoniae 342. Mol Plant Microbe Interact**. Oct;17(10):1078-85. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.10.1078. PMID: 15497400.

Ishida A, Furuya T. (2021). **Diversity and characteristics of culturable endophytic bacteria from Passiflora edulis seeds**. Microbiologyopen. Aug;10(4):e1226. doi: 10.1002/mbo3.1226. PMID: 34459555; PMCID: PMC8364935.

Javid MG, Sorooshzadeh A, Moradi F, Sanavy SAM, Allahdadi I (2011) **The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants**. AJCS 5:726–734

Katz, E. and Demain, A.L. (1977**) The peptide antibiotics of Bacillus: Chemistry, biogenesis, and possible functions**. Bacteriological Reviews, 41, 449-474.

Kenig M, Vandamme E, Abraham EP.(1976) **The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin-resistant mutants**. J Gen Microbiol. doi: 10.1099/00221287-94-1-46. PMID: 819624.

Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. (2014). **Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for**

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งนี้ ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

species demarcation of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol. 346-351. doi: 10.1099/ijs.0.059774-0. Erratum in: Int J Syst Evol Microbiol. 2014 May;64(Pt 5):1825. PMID: 24505072.

Konta, E.M., Almeida, M.R., Amaral, C.L.d., Darin, J.D.C., de Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., Antunes, L.M.G. and Bianchi, M.L.P. (2014), **Evaluation of the Antihypertensive Properties of Yellow Passion Fruit Pulp (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.) in Spontaneously Hypertensive Rats**. Phytother. Res., 28: 28-32. https://doi.org/10.1002/ptr.4949

Kusari S, Verma VC, Lamshoeft M, Spiteller M. (2012). **An endophytic fungus from Azadirachta indica A. Juss. that produces azadirachtin**. World J Microbiol Biotechnol. 1287-94. doi: 10.1007/s11274-011-0876-2. Epub 2011 Sep 9. PMID: 22805849.

Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., & der Lelie, D. van. (2002). **Endophytic Bacteria and Their Potential Applications**. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *21*(6), 583–606. https://doi.org/10.1080/0735-260291044377

Ma, Y., et al. (2016). "**Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation.**" Journal of Environmental Management 174: 14-25.

Martín-Rodríguez JÁ, Ocampo JA, Molinero-Rosales N, Tarkowská D, Ruíz-Rivero O, García-Garrido JM. (2015). **Role of gibberellins during arbuscular mycorrhizal formation in tomato: new insights revealed by endogenous quantification and genetic analysis of their metabolism in mycorrhizal roots**. Physiol Plant. 66-81. doi: 10.1111/ppl.12274. Epub 2014 Oct 21. PMID: 25186107.

Medeot DB, Fernandez M, Morales GM, Jofré E. (2020). **Fengycins From *Bacillus amyloliquefaciens* MEP$_2$18 Exhibit Antibacterial Activity by Producing Alterations on the Cell Surface of the Pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeruginosa* PA01.** Front Microbiol. 10:3107. doi: 10.3389/fmicb.2019.03107. PMID: 32038550; PMCID: PMC6985098.

Nifakos K, Tsalgatidou PC, Thomloudi E-E, Skagia A, Kotopoulis D, Baira E, Delis C, Papadimitriou K, Markellou E, Venieraki A, et al. (2021). **Genomic Analysis and Secondary Metabolites Production of the Endophytic *Bacillus***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งนี้ ต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

***velezensis* Bvel1: A Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea* Causing Bunch Rot in Post-Harvest Table Grapes**. *Plants*. 2021; 10(8):1716. https://doi.org/10.3390/plants10081716

Ongena M, Jacques P. (2008). **Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol**. 115-25. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009. PMID: 18289856.

Rakotoniriana EF, Rafamantanana M, Randriamampionona D, Rabemanantsoa C, Urveg-Ratsimamanga S, El Jaziri M, Munaut F, Corbisier AM, Quetin-Leclercq J, Declerck S. **Study *in vitro* of the impact of endophytic bacteria isolated from Centella asiatica on the disease incidence caused by the hemibiotrophic fungus Colletotrichum higginsianum**. doi: 10.1007/s10482-012-9791-2.

Rani S, Kumar P, Dahiya P, Maheshwari R, Dang AS and Suneja P (2022) **Endophytism: A Multidimensional Approach to Plant–Prokaryotic Microbe Interaction**. *Front. Microbiol*. 13:861235. doi: 10.3389/fmicb.2022.861235

Romero-Tabarez M, Jansen R, Sylla M, Lünsdorf H, Häussler S, Santosa DA, Timmis KN, Molinari G. 7-O-malonyl macrolactin A, (2006). **a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of Burkholderia cepacia**. Antimicrob Agents Chemother. doi: 10.1128/AAC.50.5.1701-1709.2006. PMID: 16641438; PMCID: PMC1472237.

Rütten A, Kirchner T, Musiol-Kroll EM. (2022). **Overview on Strategies and Assays for Antibiotic Discovery**. Pharmaceuticals (Basel). 15(10):1302. doi: 10.3390/ph15101302. PMID: 36297414; PMCID: PMC9607151.

Scholz, R., et al. (2011). "**Plantazolicin, a Novel Microcin B17/Streptolysin S-Like Natural Product from Bacillus amyloliquefaciens FZB42**." Journal of bacteriology 193: 215-224 DOI: 10.1128/JB.00784-10

Scholz, R., et al. (2014). "**Amylocyclicin, a Novel Circular Bacteriocin Produced by Bacillus amyloliquefaciens FZB42.**" Journal of bacteriology 196. DOI: 10.1128/JB.01474-14

Seo, W.T., Lim, W.J., Kim, E.J. *et al.* (2010). **Endophytic Bacterial Diversity in the Young Radish and Their Antimicrobial Activity against Pathogens**. *J.*

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... ไปใช้

Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53, 493–503. https://doi.org/10.3839/jksabc.2010.075

Serra CR, Earl AM, Barbosa TM, Kolter R, Henriques AO. (2014) **Sporulation during growth in a gut isolate of Bacillus subtilis**. J Bacteriol. Dec;196(23):4184-96. doi: 10.1128/JB.01993-14. PMID: 25225273; PMCID: PMC4248874.

Srivastava, P., et al. (2024). "**Optimization of Sterilization Parameters for Isolation of Endophytes from Allium sativum and Exploring its Antibacterial Activity.**" Journal of Pure and Applied Microbiology 2024 DOI: 10.22207/JPAM.18.2.11

Tavarideh F, Pourahmad F, Nemati M. (2022). **Diversity and antibacterial activity of endophytic bacteria associated with medicinal plant, *Scrophularia striata***. Vet Res Forum. 409-415. doi: 10.30466/vrf.2021.529714.3174. Epub 2022 Sep 15. PMID: 36320307; PMCID: PMC9548236.

Teotia, P., et al. (2017). **Endophytic Probiotics and Plant Health: Toward a Balanced Accost.** 383-399. DOI 10.1007/978-981-10-3473-2_17

Thokchom R. and Mandal G. (2020). **Production Preference and Importance of Passion Fruit (Passiflora Edulis)**: A Review. Journal of Agricultural Engineering and Food Technology p-ISSN: 2350-0085; e-ISSN: 2350-0263; Volume 4, Issue 1; January-March, 2017 pp. 27-30

Um, S., Fraimout, A., Sapountzis, P. *et al.* (2013). **The fungus-growing termite *Macrotermes natalensis* harbors bacillaene-producing *Bacillus* sp. that inhibit potentially antagonistic fungi**. *Sci Rep* **3**, 3250 https://doi.org/10.1038/srep03250

Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, Jung G. (1986). **Fengycin--a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by Bacillus subtilis F-29-**3. J Antibiot (Tokyo).39(7):888-901. doi: 10.7164/antibiotics.39.888. PMID: 3093430.

Vendan RT, Yu YJ, Lee SH, Rhee YH. (2010). **Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion**. J Microbiol;48(5):559-65. doi: 10.1007/s12275-010-0082-1. Epub 2010 Nov 3. PMID: 21046332.

Viera, William, Takashi Shinohara, Iván Samaniego, Atsushi Sanada, Naoki Terada, Lenin Ron, Alfonso Suárez-Tapia, and Kaihei Koshio. (2022). "**Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Passiflora* spp**. Germplasm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grown in Ecuador" *Plants* 11, no. 3: 328. https://doi.org/10.3390/plants11030328

Wu, L., Wu, H., Chen, L. *et al.* (2015). **Bacilysin overproduction in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 markerless derivative strains FZBREP and FZBSPA enhances antibacterial activity**. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 4255–4263. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6251-0

Xu BH, Ye ZW, Zheng QW, Wei T, Lin JF, Guo LQ. (2018). **Isolation and characterization of cyclic lipopeptides with broad-spectrum antimicrobial activity from *Bacillus siamensis* JFL15**. 3 Biotech.8(10):444. doi: 10.1007/s13205-018-1443-4. Epub 2018 Oct 8. PMID: 30333946; PMCID: PMC6175734.

Yu, G. Y., et al. (2002). "**Production of iturin A by Bacillus amyloliquefaciens suppressing Rhizoctonia solani.**" Soil Biology and Biochemistry 34(7): 955-963.

Zimmerman SB, Schwartz CD, Monaghan RL, Pelak BA, Weissberger B, Gilfillan EC, Mochales S, Hernandez S, Currie SA, Tejera E, et al. (1987). **Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by Bacillus subtilis. I. Production, taxonomy and antibacterial activity**. J Antibiot (Tokyo).40(12):1677-81. doi: 10.7164/antibiotics.40.1677. PMID: 3123448.

Zúñiga A, Poupin MJ, Donoso R, Ledger T, Guiliani N, Gutiérrez RA, González B. (2013). **Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of Arabidopsis thaliana by Burkholderia phytofirmans PsJN**. Mol Plant Microbe Interact.;26(5):546-53. doi: 10.1094/MPMI-10-12-0241-R. PMID: 23301615.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ปริมาตร 1 ลิตร

Beef Extract Powder	2.0	กรัม
Acid Digest of Casein	17.5	กรัม
Soluble Starch	1.5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดัน ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาตร 1 ลิตร

Pancreatic Digest of Casein	17.0	กรัม
Papaic Digest of Soybean	3.0	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับให้ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 7.3 ± 0.2 จากนั้นฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดัน ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

3. การเตรียมแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 ลิตร

เตรียมโดยใช้สมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

จะได้ 95% x V_1 = 70% x 1,000 มิลลิลิตร

$V_1 = \left(\frac{70}{95}\right) \times 1{,}000$

V_1 = 737 มิลลิลิตร

ดังนั้นจึงชั่งสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95% 737 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นลงไป 263 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลายคริสตัลไวโอเลต

สารละลาย A	Crystal violet	2.0	กรัม
	Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนสีละลายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย B	Ammonium oxalate	0.8	กรัม
	น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนการใช้ และถ้าสีเข้มจนเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

5. การเตรียมสารละลายไอโอดีน (Gram's iodine solution)

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodine (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีนและ Potassium iodine ในน้ำกลั่นปริมาณน้อย ๆ ก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

6. การเตรียมสารละลายซาฟรานินโอ

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100.0	มิลลิลิตร

ถ้าจะใช้สีในการย้อม ให้เจือจางเป็น 1:10 (stock safranin 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร) ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง

7. การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v)

NaCl	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้