

การคัดกรองไกลดิงแบบที่เรียที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ



นางสาวปิยรัตน์ หมื่นศรีชัย

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING OF BIOACTIVE COMPOUND-PRODUCING GLIDING BACTERIA



Miss Piyarat Muensrichai

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การคัดกรองไกลดิงแบบคทีเรียที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดย

นางสาวปิยรัตน์ หมั่นศรีชัย

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ ไผ่ชิตานนท์

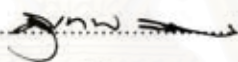
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

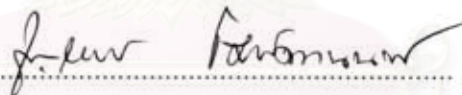
ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ ไผ่ชิตานนท์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

ปิยรัตน์ หมื่นศรีชัย : การคัดกรองไกลดิ้งแบคทีเรียที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.
(SCREENING OF BIOACTIVE COMPOUND-PRODUCING GLIDING BACTERIA)
อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ชาญวิทย์ ไชยदानนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์,
105 หน้า.

งานวิจัยนี้สามารถแยกไกลดิ้งแบคทีเรียได้ทั้งหมด 52 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดิน น้ำ ชากพืช วัตถุในทะเล และมูลสัตว์จำนวน 80 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บจาก 17 จังหวัดในประเทศไทย การทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะ พบว่าไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เป็นสายพันธุ์เดียวที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Enterococcus faecium* *Candida albicans* และ *Fusarium oxysporum* เมื่อนำไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ผลิตสารปฏิชีวนะโดยเลี้ยงในอาหารเหลว Casitone Yeast Extract Broth พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในน้ำหมักชั้นไดคลอโรมีเทน เมื่อนำสารสกัดมาทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography พบว่าได้สารสกัดหลัก 3 ชนิด ได้แก่ สาร A B และ C สาร C มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์มากที่สุดโดยยับยั้งแบคทีเรียทดสอบแกรมบวกที่ให้บริการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกกว้างที่สุดและมีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตสูงสุดที่ความยาวคลื่น 273 นาโนเมตร ซึ่งตรงกับสาร saramycetin ที่เคยพบใน *Streptomyces* sp. ที่สามารถยับยั้งราได้ เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography จะแยกสารได้ทั้งหมด 12 ส่วน ซึ่งพบว่าสารส่วนที่ 1 2 4 5 6 และ 7 (F1 F2 F4 F5 F6 และ F7) สามารถยับยั้ง *B. subtilis* และสารส่วนที่ 1 2 5 และ 6 (F1 F2 F5 และ F6) มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Corallocooccus*

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต..... ปิยรัตน์ หมื่นศรีชัย
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... LAW FABIANNAH
ปีการศึกษา...2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... อรุณไพโรจน์

4772377223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : GLIDING BACTERIA / BIOACTIVE COMPOUND / SCREENING

PIYARAT MUENSRICHAI : SCREENING OF BIOACTIVE COMPOUND-PRODUCING GLIDING BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., THESIS COADVISOR : VULLAPA ARUNPAIROJANA, Ph.D., 105 pp.

In the present study, 52 strains of gliding bacteria were isolated from 80 samples that collected from 17 provinces of Thailand. In bioactive compound testing experiment, only RD4 strain inhibited all tested microorganisms including *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, and *Fusarium oxysporum*. After culturing RD4 in CYEB medium for 7 days, the cultured broth was extracted by using acetone and then dichloromethane. By using PTLC, three major compounds, A, B, and C, were obtained from DCM fraction. Compound C showed the highest microbial inhibition activity, but only Gram's positive bacteria were inhibited. The maximum absorbance from UV-VIS spectrophotometer of compound C was 273 nm, the same wavelength as saramycetin, an antifungal, from *Streptomyces* sp.. After compound C was purified by using HPLC, 12 fractions were obtained. It was founded that fractions number 1, 2, 4, 5, 6, and 7 (F1, F2, F4, F5, F6, and F7) inhibited *B. subtilis*, while fractions number 1, 2, 5, and 6 (F1, F2, F5, and F6) inhibited *S. aureus*. From morphological characteristics and 16S rRNA sequence analysis studies, the strain RD4 belonged to the genus *Corallococcus*.



DepartmentMicrobiology..... Student's signature..... *Piyarat Muensrichai*
Field of study.....Industrial Microbiology..... Advisor's signature..... *C. Kositanont*
Academic year.....2007..... Co-advisor's signature..... *O. Arunpairojana*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร. วัลลภา อรุณไพโรจน์ ที่ได้ให้คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งได้ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และได้ให้ข้อคิดเห็นข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุงของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริวิรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และได้ให้ข้อคิดเห็นข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณพี่ลาวัลย์ พี่ฉัตรฤดี คุณปานวาด และบุคลากรในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ช่วยเหลือในด้านข้อมูลและให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนายไพฑูรย์ ทวีรุจิโรจน์ และน้องๆ ห้อง 453 ทุกคนที่คอยช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังใจและช่วยเหลือสนับสนุนตลอดการทำวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	3
2.2 สัณฐานวิทยาของไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	4
2.3 การเคลื่อนที่ของไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	9
2.4 การคัดแยกไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	11
2.5 สารปฏิชีวนะ.....	12
2.6 สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	17
3. อุปกรณ์สารเคมีและวิธีดำเนินงานวิจัย.....	22
3.1 อุปกรณ์.....	22
3.2 สารเคมีและชุดทดสอบสำเร็จ.....	24
3.3 ตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อ.....	25
3.4 การคัดแยกไกลดิ้งแบคทีเรียจากตัวอย่าง.....	25
3.5 การเก็บรักษาไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	26
3.6 การคัดกรองไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ....	27
3.7 การศึกษาการเจริญของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4.....	30
3.8 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักชั้นไดคลอโรมีเทนเพื่อ ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....	31
3.9 การแยกสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้ง	

แบบที่เรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC).....	31
3.10 การแยกสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC).....	31
3.11 การศึกษาการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยวิธี UV-VIS spectroscopy ของสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี PTLC.....	32
3.12 การแยกสาร C จากสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	32
3.13 การจำแนกไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4.....	33
4. ผลการทดลอง.....	37
4.1 ลักษณะของตัวอย่าง.....	37
4.2 การคัดแยกแบบที่เรียจากตัวอย่าง.....	37
4.3 การคัดกรองไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	37
4.4 การศึกษาการเจริญของไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4.....	56
4.5 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4 ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักชั้นไดคลอโรมีเทนเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ.....	57
4.6 แยกสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC).....	58
4.7 การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC).....	59
4.8 แยกสาร C จากสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจาก	

บทที่	หน้า
ไกลดิงแบบที่เรียสายพันธุ RD4 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี High Performance liquid Chromatography (HPLC).....	62
4.9 การจำแนกสายพันธุของไกลดิงแบบที่เรียสายพันธุ RD4.....	65
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	72
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	83
ภาคผนวก ก.....	84
ภาคผนวก ข.....	88
ภาคผนวก ค.....	89
ภาคผนวก ง.....	92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	105

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
3.1	จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	28
3.2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์.....	35
4.1	แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและไกลดิ้งแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	39
4.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไกลดิ้งแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษา.....	46
4.3	ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากน้ำหมัก และเซลล์ของไกลดิ้งแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์.....	54
4.4	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคอลลอโรมีเทน ที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี PTLC.....	62
4.5	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ชนิด C ที่ได้จากวิธี HPLC..	63
4.6	เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 และ <i>Corallocooccus</i> sp.....	67
4.7	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไกลดิ้งแบคทีเรีย สายพันธุ์ RD4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn).....	71

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะเซลล์แบบต่างๆ ของไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	4
2.2	รอยเมือกเป็นทางยาว (slime tracks) เนื่องจากการเคลื่อนที่ของไกลดิ้งแบคทีเรีย...	5
2.3	ลักษณะ swarm colony ของไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	5
2.4	วงชีวิตของมิกโซแบคทีเรีย.....	5
2.5	โครงสร้างสืบพันธุ์ที่เรียกว่าฟรุติงบอดีของไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	6
2.6	ฟรุติงบอดีรูปแบบต่างๆ ของมิกโซแบคทีเรีย.....	8
2.7	โครงสร้างทางเคมีของรงควัตถุชนิดต่างๆ ที่พบในไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	9
2.8	การเคลื่อนตัวของเซลล์บนพื้นผิวอาหารอย่างช้าๆ ตามแนวยาวของเซลล์.....	10
2.9	การแผ่ขยายบริเวณขอบโคโลนีเกิดจากการเคลื่อนที่ของเซลล์.....	10
2.10	ฟีโลจากหัวของเซลล์เกิดการยึดตัวช้าๆ กันจะส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่.....	11
2.11	ไกลดิ้งแบคทีเรีย (สีแดง) ขณะกินเซลล์ <i>E.coli</i> (สีเขียว).....	12
2.12	แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides.....	14
2.13	แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline	14
2.14	แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม chloramphenicol.....	15
2.15	แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide.....	15
2.16	แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene.....	16
2.17	แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin	17
2.18	แสดงตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม vancomycin.....	17
2.19	ambruticin สารยับยั้งการเจริญของรา ที่ผลิตจาก <i>Sorangium cellulosum</i>	19
2.20	โครงสร้างที่แตกต่างกันของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรีย.....	20
2.21	soraphen A สารยับยั้งการทำงานของ acetyl-CoA carboxylase ของรา.....	20
2.22	chondramide A จาก <i>Chondromyces crocatus</i>	21
2.23	epothilone A ช่วยรักษาสภาพไมโคทิวบูลและนำเซลล์ไปสู่การตายแบบอะพอพโทซิส.....	21
4.1	ลักษณะโคโลนีของไกลดิ้งแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ ที่ถูกคัดเลือกมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	47
4.2	ลักษณะ vegetative cell slime track ฟรุติงบอดี และมิกโซสปอร์ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ CD1.....	48

รูปที่	หน้า
4.3	ลักษณะ vetgetative cell slime track ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ TW2 49
4.4	ลักษณะ vetgetative cell slime track ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD2..... 50
4.5	ลักษณะ vetgetative cell slime track ฟรุตติงบอดี และมิกอโซสปอร์ ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4..... 51
4.6	ลักษณะ vetgetative cell slime track ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SN5..... 52
4.7	ลักษณะ vetgetative cell slime track ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ CP1..... 53
4.8	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อของไกลดิงแบคทีเรีย สายพันธุ์ RD4..... 56
4.9	ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ต่อการสร้างสารออก ฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ..... 57
4.10	โครมาโทแกรมของสารสกัดจากไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ที่แยกด้วยวิธี TLC. 58
4.11	โครมาโทแกรมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารสกัด A B และ C ที่ผลิตจาก ไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4..... 60
4.12	แสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ <i>B. subtilis</i> และ <i>S. aureus</i> ของสารสกัดน้ำหมัก จากชั้นไดคอลลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เมื่อแยกด้วยวิธี PTLC..... 61
4.13	โครมาโทแกรมการทำสารสกัด C จากน้ำหมักชั้นไดคอลลอโรมีเทนของไกลดิง แบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี reverse phase HPLC..... 64
4.14	รอยจากการเคลื่อนที่ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4..... 65
4.15	ฟรุตติงบอดีของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4..... 66
4.16	เซลล์หากินของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 และลักษณะของมิกอโซสปอร์..... 66
4.17	PCR product ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4..... 68
4.18	ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4..... 69
4.19	phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4..... 70

บทที่ 1

บทนำ

ไกลดิ้งแบคทีเรีย (gliding bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง พบทั้งรูปแท่งสั้นและเป็นสายยาวประกอบด้วยหลายเซลล์ แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีฟลาเจลลา จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ในอาหารเหลวได้ แต่จะเคลื่อนที่แบบไกลด์ (glide) ไปตามแนวยาวของเซลล์แทน (Alfred, 1999) โดยอาศัยการยึดเกาะกับวัตถุที่มีพื้นผิวแข็งหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว ได้แก่ ดินตามที่ขึ้น ซากใบไม้ผุ ผิวของพืชน้ำ รวมทั้งช่องปากและทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่นอีกด้วย (ดวงพร, 2537) ในขณะที่เซลล์เคลื่อนที่จะขับสารเมือกออกมาเป็นทางเรียกว่า slime tracks ซึ่งเป็นสารจำพวกพอลิแซคคาไรด์ สารนี้ทำหน้าที่เป็นสัญญาณที่ช่วยดึงดูดให้เซลล์เคลื่อนที่ไปด้วยกันเป็นกลุ่มได้ (Morikawa และคณะ, 1998) ลักษณะการรวมกลุ่มของเซลล์เช่นนี้ส่งผลให้ไกลดิ้งแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ต่างๆ ออกมาได้ในปริมาณมากเพียงพอที่จะต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่อยู่ในแหล่งอาหารของมันได้ (Reichenbach, 2001)

ไกลดิ้งแบคทีเรียพบได้ในสภาวะแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน ซากพืช วัตถุในน้ำ รวมทั้งมูลสัตว์เคี้ยวเอื้อง เป็นต้น บางชนิดมีการดำรงชีวิตแบบ saprophytic สามารถย่อยสลายสาร biopolymer ได้ เช่น สกุล *Sorangium* ย่อยสลายเซลลูโลสได้ ซึ่งเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชจึงมักพบตามเปลือกไม้ของพืชทั้งพืชที่มีชีวิตอยู่และตายแล้ว ไกลดิ้งแบคทีเรียบางชนิดจัดเป็นผู้ล่าเหยื่อ (predator) ที่ต้องการใช้สารประเภทเปปไทด์และกรดอะมิโนมาเป็นสารอาหาร สามารถย่อยสลายโปรตีนและกินจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ทั้งเซลล์ เช่น ยีสต์ และ *Escherichia coli* เป็นต้น (Reichenbach และ Dworkin, 1992) นอกจากนี้ไกลดิ้งแบคทีเรียบางชนิดยังมีประโยชน์ด้านการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lysobacter* sp. สามารถย่อยสลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช เนื่องจากจะผลิตทั้งสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ออกมาย่อยสลายผนังเซลล์ของราและหนอนตัวกลมได้ (Sullivan, 2003)

จากการศึกษาที่ผ่านมาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มักเป็นราแบคทีเรียกลุ่ม *Actinomyces* *Bacillus* และ *Pseudomonas* เป็นส่วนใหญ่ (Gaspari และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามปัจจุบันเชื้อโรคต่างๆ ได้มีการปรับตัวทำให้เกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะหรือตัวยาชนิดเดิมที่ใช้กันอยู่อย่างแพร่หลายเป็นระยะเวลาอันยาวนานได้ โรคใหม่จึงเกิดขึ้นตลอดเวลา รวมทั้งสารปฏิชีวนะหลายชนิดมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย จึงมีการมุ่งเน้นที่จะคัดแยกเชื้อกลุ่มใหม่สายพันธุ์ใหม่เพื่อเพิ่มโอกาสในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ มีการค้นพบไกลดิ้งแบคทีเรียที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างต่อเนื่อง ในปี 1999 Jansen และคณะได้ค้นพบว่า

สาร crocacin ที่ผลิตจาก *Chondromyces crocatus* มีสมบัติต้านราสายและยีสต์ได้ ปี 2000 Steinmetz และคณะ ค้นพบสาร myxothiazol ซึ่งผลิตจาก *Myxococcus fulvus* ด้านการเจริญของราสายโดยไปยับยั้งกระบวนการหายใจในไมโทคอนเดรีย และในระยะเวลาต่อมา ก็ได้มีการค้นพบสารชนิดใหม่อย่างต่อเนื่องทั้งที่มีฤทธิ์ต้านราและแบคทีเรียตลอดจนยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ ปัจจุบันไกลดิงแบคทีเรียผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาแล้วทั้งสิ้นจำนวน 80 สารที่เป็นโครงสร้างพื้นฐาน และ 450 สารที่เป็นโครงสร้างย่อย และ 40 เปปไทด์ของสารที่พบเป็นสารชนิดใหม่ ซึ่งบางชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากเดิมด้วย (Reichenbach, 2001)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าไกลดิงแบคทีเรียมีความสำคัญในหลายด้าน นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศน์ ซึ่งก่อให้เกิดการหมุนเวียนสารอินทรีย์ต่างๆ ในธรรมชาติแล้ว ยังผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์มากมาย ไกลดิงแบคทีเรียจึงเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหม่ที่น่าสนใจในการแยกเพื่อศึกษาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการรักษาโรคต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดกรองไกลดิงแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติที่มีความสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ไม่รวมถึงการสร้างเอนไซม์และการยับยั้งจากการกินจุลินทรีย์ทดสอบ

ขั้นตอนการวิจัย

1. คัดแยกไกลดิงแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ
2. ทดสอบความสามารถของไกลดิงแบคทีเรียในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ
3. ระบุสายพันธุ์และจำแนกไกลดิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมีและลักษณะทางพันธุศาสตร์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

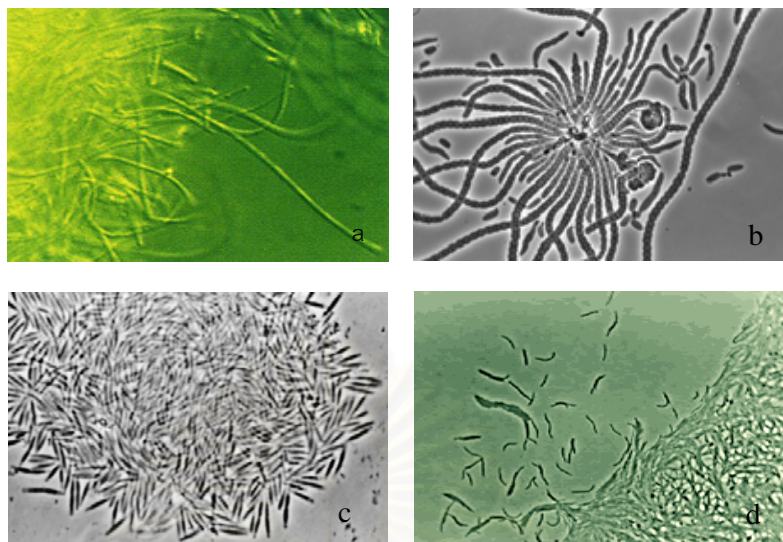
ได้ไกลดิงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ พร้อมทั้งจำแนกชนิดของเชื้อ เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของไกลดิ้งแบคทีเรีย

ไกลดิ้งแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นแท่ง มักต่อกันเป็นสายยาวหรืออยู่ในรูปโซ่ที่ประกอบด้วยหลายเซลล์ ดังรูปที่ 2.1 a และ 2.1 b บางชนิดมีรูปร่างเรียว หัวท้ายแหลม (รูปที่ 2.1 c) แต่มีไกลดิ้งแบคทีเรียบางกลุ่ม เช่น ไชโตฟากา (cytophagas) มักพบเป็นแท่งสั้นๆ หัวท้ายกลมมน แสดงในรูปที่ 2.1 d (Reichenbach และ Dworkin, 1982) ไกลดิ้งแบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้โดยปราศจากฟลาเจลลา แต่จะอาศัยการยึดเกาะกับพื้นผิวที่แข็งที่เหลวแทน (Siddiqui และ Burchard, 2001) จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ในอาหารเหลวได้ ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียที่มีแฟลเจลลาทั่วไป แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตสารเมือกซึ่งเป็นสารประเภทพอลิแซคคาไรด์ออกมาออกเซลล์ขณะเคลื่อนที่ ซึ่งช่วยเพิ่มแรงตึงผิวทำให้การยึดเกาะระหว่างพื้นผิวที่แข็งกับตัวเซลล์แบคทีเรียดีขึ้น (Burchard, 1982) แบคทีเรียจะเคลื่อนตัวไปตาม slime tracks ที่อยู่บนวัตถุหรืออาหารที่มันอาศัยอยู่ โดยจะสังเกตเห็นเป็นรอยทางเดินของเซลล์ ดังรูปที่ 2.2 ทำให้ไกลดิ้งแบคทีเรียเคลื่อนที่ได้โดยไม่ต้องใช้โครงสร้างที่ช่วยในการเคลื่อนที่ใดๆ (Dworkin, 1973) จึงเรียกการเคลื่อนที่แบบนี้ว่าการไถล (gliding หรือ creeping) ไกลดิ้งแบคทีเรียยังมีลักษณะเฉพาะตัวอื่นๆ อีก คือมีโครงสร้างของชั้นผนังเซลล์ส่วนเพปติโดไกลแคนที่เชื่อมต่อกับส่วนอื่นในลักษณะเป็นแผ่น ซึ่งทำให้เซลล์มีความยืดหยุ่นเป็นพิเศษขณะที่แบคทีเรียกลุ่มอื่นเป็นแบบถุง (White และคณะ, 1968) ผนังเซลล์ประกอบด้วย menaquinones และกรดไขมันที่มีกิ่งก้าน มีสเปกตรัมเป็นเลขคู่เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศทั่วไป ในบางกลุ่มพบน้ำตาลชนิด 3-O-methyl-D-xylose ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียอื่น (Rosenfelder และคณะ, 1974) นอกจากนี้ไกลดิ้งแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตตรงควัตถุได้ ส่งผลให้โคโลนีมีสีน้ำตาลแตกต่างกันออกไปในแต่ละสปีชีส์ (Brock, 1997)

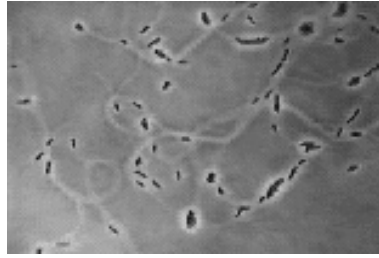


รูปที่ 2.1 ลักษณะเซลล์แบบต่างๆ ของไกลดิงแบคทีเรียที่ต่อกันเป็นสายยาวหรืออยู่ในรูปโซ่ที่ประกอบด้วยหลายเซลล์ ดังรูป a และ b (Brock, 1997) รูปร่างเรียว หัวท้ายแหลม (c) (Reichenbach, 2001) และรูปแท่งสั้นๆ ที่มีหัวท้ายของเซลล์กลมมน (d)

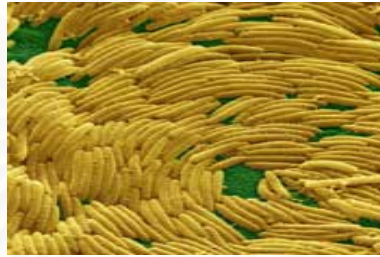
2.2 สันฐานวิทยาของไกลดิงแบคทีเรีย

2.2.1 การสร้างโคโลนีของไกลดิงแบคทีเรีย

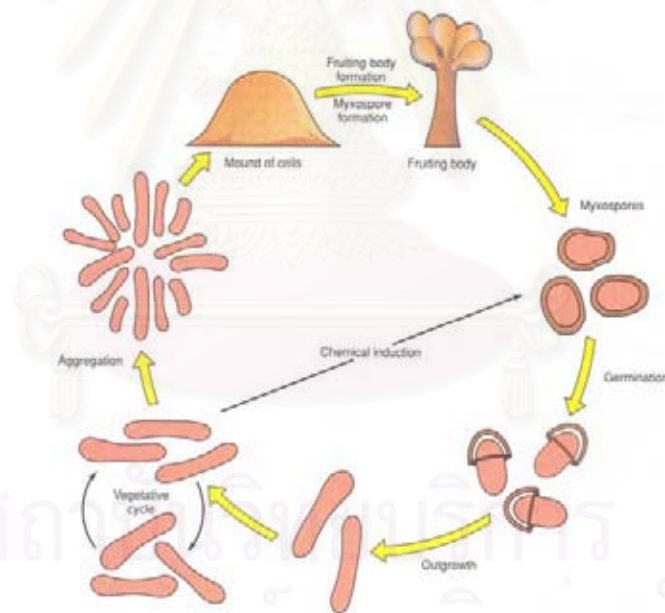
ในภาวะแวดล้อมปกติเซลล์จะมีการเจริญและแบ่งตัวตามปกติ ขณะที่เซลล์เจริญ (vegetative cell) เคลื่อนที่และขับสารเมือกออกมา โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งจะมีลักษณะเป็น slime tracks เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นเป็นโคโลนีจะเห็นสารเมือกของโคโลนีได้ชัดเจนยิ่งขึ้น (slime colony) (จรัสโณม, 2540) เมื่อภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น มีปริมาณอาหารจำกัด เซลล์เจริญจะเข้ารวมกลุ่ม (aggregation) ในแนวนอนกันเรียกลักษณะนี้ว่าสวอม (swarm) ดังรูปที่ 2.3 ไกลดิงแบคทีเรียบางกลุ่ม เช่น มิกโซแบคทีเรีย (myxobacteria) จะมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนกว่ากลุ่มอื่นๆ คือ เมื่อเกิดการสวอมของโคโลนีแล้วจะมีการตอบสนองทางเคมี ทำให้กลุ่มเซลล์เกิดการหนุนขึ้นเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์ที่เรียกว่าฟรุตติงบอดี (fruiting body) บริเวณส่วนใดส่วนหนึ่งของโคโลนีด้วย (Brock, 1997) ภายใต้นี้จะเกิดการลดรูปของเซลล์กลายเป็นเซลล์ระยะพักตัว ซึ่งอยู่ภายในฟรุตติงบอดี เรียกว่ามิกโซสปอร์ (myxospores) สามารถทนต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี จนกระทั่งภาวะแวดล้อมกลับมาเหมาะสมอีกครั้ง มิกโซสปอร์จะออกจากฟรุตติงบอดีโดยการแตกของแคปซูล เจริญกลายเป็น vegetative cell ต่อไป (จรัสโณม, 2540) วงชีวิตของมิกโซแบคทีเรียจะแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.2 รอยเมือกเป็นทางยาว (slime tracks) เนื่องจากการเคลื่อนที่ของไกลดิงแบคทีเรีย



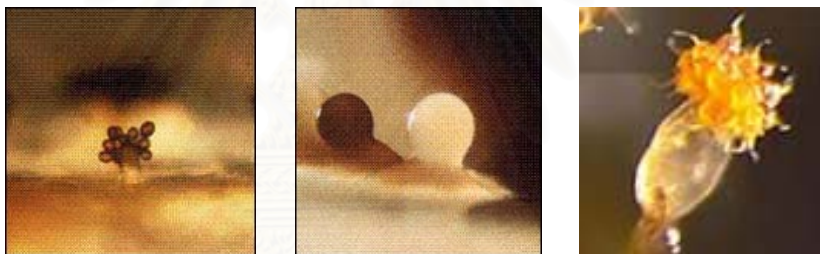
รูปที่ 2.3 ลักษณะ swarm colony ของไกลดิงแบคทีเรีย (Vos และ Velicer, 2006)



รูปที่ 2.4 วงชีวิตของมิกโซแบคทีเรีย (Brock, 1997)

2.2.2 การสร้างฟรุตติงบอดีในมิกโซแบคทีเรีย

ฟรุตติงบอดีเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์ที่พบในมิกโซแบคทีเรีย เกิดจากการที่เซลล์เคลื่อนที่มารวมกลุ่มกันเมื่อภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญ เซลล์นั้นบนเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโครงสร้างที่เป็นก้อน บางส่วนไปเป็นผนังของอับสปอร์ เซลล์จะเกิดการพักตัวเป็นมิกโซสปอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปแท่งหรือรูปไข่ก็ได้ และถูกห่อหุ้มด้วยแคปซูลอยู่ในฟรุตติงบอดี (Reichenbach และ Dworkin, 1982) ดังที่กล่าวใน 2.2.1 ทำให้ทนต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความร้อน ความแห้ง และแรงสั่นสะเทือนได้ดี ฟรุตติงบอดีส่วนใหญ่มีสีส้มที่สดใส เนื่องจากประกอบด้วยรงควัตถุชนิดต่างๆ ซึ่งรงควัตถุบางชนิดสามารถถูกกระตุ้นโดยแสงได้ ดังนั้นแสงจึงมีอิทธิพลต่อกระบวนการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ได้ (Brock, 1997) ฟรุตติงบอดีมักมีขนาดใหญ่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยมีลักษณะเป็นจุดภายในโคโลนี ทั้งนี้รูปแบบของฟรุตติงบอดีจะมีลักษณะแตกต่างกันได้ขึ้นกับสปีชีส์ของมิกโซแบคทีเรียเอง ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างสืบพันธุ์ที่เรียกว่าฟรุตติงบอดีของไกลคิงแบคทีเรีย (Brock, 1997)

2.2.3 รูปแบบต่างๆ ของฟรุตติงบอดีของมิกโซแบคทีเรีย (Reichenbach และ Dworkin, 1982)

ลักษณะของฟรุตติงบอดีจะมีความหลากหลายมาก ดังรูปที่ 2.6 พบตั้งแต่ที่มีรูปร่างเป็นทรงกลมง่ายๆ ซึ่งปราศจากเมือก ไม่มีก้านชู ไปจนถึงรูปแบบที่ซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยผนังฟรุตติงบอดีและมีก้านชู มีรายละเอียด ดังนี้

2.2.3.1 รูปร่างทรงกลม หรือเป็นหยดน้ำ นิ่มและมีเมือก ส่วนหัวมักติดกับฐาน พบได้ใน *Myxococcus* sp. ดังรูป 2.6 a

2.2.3.2 รูปร่างยาว หรือเป็นเกลียว บางครั้งมีโครงสร้างคล้ายเขายื่นออกมา มักพบได้หลายรูปแบบ ส่วนใหญ่มีรากฝังลึกลงไปใ้อาหารแข็ง พบได้ใน *Corallococcus* sp. ดังรูป 2.6 b

2.2.3.3 รูปร่างเป็นกระเปาะหลายอันที่มีผนังหุ้มชั้นนอกเพียงอย่างเดียว พบได้ใน *Angiococcus* sp. ดังรูป 2.6 c

2.2.3.4 เป็นอับสปอร์ ติดหรือฝังลงไปใ้อวัตถุ มักมีชั้นเมือกปกคลุม พบได้ใน *Cystobacter* sp. ดังรูป 2.6 d

2.2.3.5 เป็นอับสปอร์ขนาดเล็กหลายอันตั้งอยู่บนก้านชู มี 1 ฟรุตติงบอดี ต่อ 1 ก้านชู สีน้าตาลแก่ พบได้ใน *Melittangium* sp. ดังรูป 2.6 e

2.2.3.6 เป็นช่อประกอบด้วยก้านชูหลายอัน มีอับสปอร์รูปไข่ตั้งอยู่บนก้านชู พบได้ใน *Stigmatella* sp. ดังรูป 2.6 f

2.2.3.7 ประกอบด้วยอับสปอร์ขนาดเล็กอยู่ภายในเยื่อหุ้ม มักพบหลายรูปร่างมากกว่าทรงกลม มีสีเหลือง ส้ม แดง พบได้ใน *Sorangium* sp. ดังรูป 2.6 g

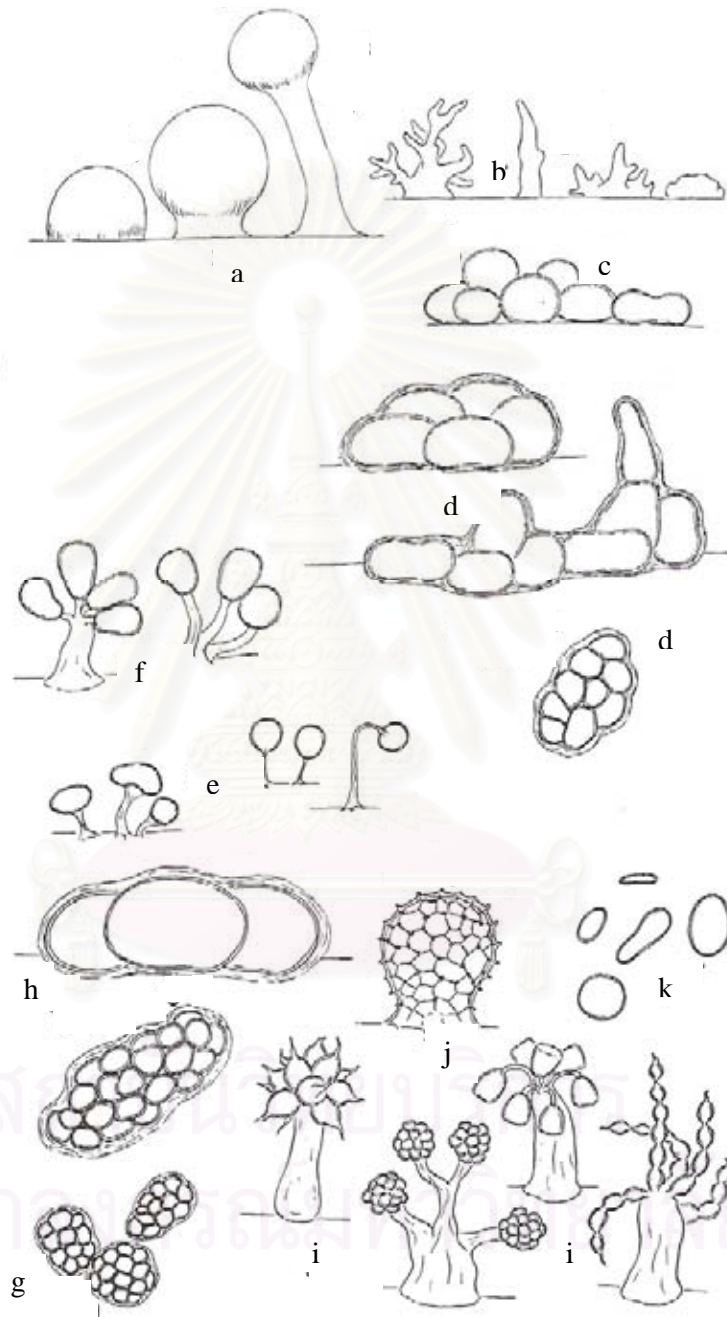
2.2.3.8 เป็นอับสปอร์กลม จำนวนมากหรือน้อยก็ได้ อยู่ในเยื่อหุ้ม ซึ่งฝังอยู่กับวัตถุ มีสีเหลือง ส้ม น้าตาล เทา พบได้ใน *Polyangium* sp. ดังรูป 2.6 h

2.2.3.9 มีลักษณะแตกกิ่งก้านที่ก้านชูหรือไม่ก็ได้ ประกอบด้วยกลุ่มอับสปอร์สีส้มสดใส พบได้ใน *Chondromyces* sp. ดังรูป 2.6 i

2.2.3.10 เป็นอับสปอร์ ขนาดใหญ่ สีเหลืองทอง ผิวมีรอยย่นหรือเป็นตาข่าย พบได้ใน *Haploangium* sp. ดังรูป 2.6 j

2.2.3.11 ฟรุตติงบอดีขนาดเล็ก ทรงกลมหรือรูปไข่ มีอับสปอร์จำนวนมากฝังลงในวัตถุ พบได้ใน *Nannocystis* sp. ดังรูป 2.6 k

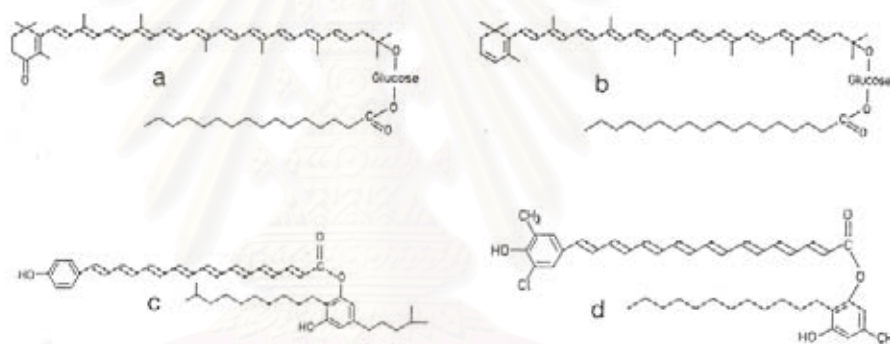
ในกรณีที่เซลล์เจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียทั่วไป ทำให้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ความสามารถในการสร้างฟรุตติงบอดีจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกมิใช่แบคทีเรียออกจากเซลล์โพรคาริโอตอื่นๆ ได้ (จรัสโณม, 2540)



รูปที่ 2.6 พืชดิงบอดีรูปแบบต่างๆ ของมิกโซแบคทีเรีย (Reichenbach และ Dworkin, 1982)

2.2.4 รงควัตถุที่พบในไกลดิ้งแบคทีเรีย

ไกลดิ้งแบคทีเรียมักมีสีเหลือง เหลืองอมเขียว ส้มหรือแดงเป็นส่วนใหญ่ หลายชนิดพบรงควัตถุ protoporphyrin และ bacteriochlorophylls เช่น ใน *Chloroflexus* sp. และพบ chlorophyll a และ phycobilins ได้ในไซยาโนแบคทีเรีย บางชนิดพบรงควัตถุที่เป็น carotenoids ที่มีความพิเศษ โดยจะประกอบด้วย glycoside-fatty acid esters ได้แก่ myxobacton palmitate และ myxobactin stearate ซึ่งพบได้ในมิกโซแบคทีเรีย (Kleinig และคณะ, 1971) รงควัตถุบางชนิดประกอบด้วย omega-phenyl poly-enic acid บริเวณของส่วนที่ทำให้เกิดสี (chromophore) เรียกรงควัตถุชนิดนี้ว่า flexirubins เนื่องจากถูกพบใน *Flexibacter* sp. (Achenbach และคณะ, 1978) นอกจากนี้ยังพบรงควัตถุจากไกลดิ้งแบคทีเรียอื่นๆ อีกมากซึ่งยังไม่มียารายงานถึงโครงสร้างทางเคมีออกมา สำหรับโครงสร้างของรงควัตถุชนิดต่างๆ ที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรียจะแสดงในรูปที่ 2.7

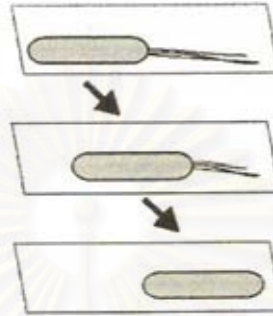


รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของรงควัตถุชนิดต่างๆ ที่พบในไกลดิ้งแบคทีเรีย รูป a คือ myxobacton palmitate รูป b คือ myxobactin stearate รูป c คือ flexirubin และรูป d คือ Chloroflexirubin

2.3 การเคลื่อนที่ของไกลดิ้งแบคทีเรีย

ได้มีการศึกษาการเคลื่อนที่ของไกลดิ้งแบคทีเรียตั้งแต่ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อ 200 ปีที่ผ่านมา โดยเบื้องต้นทราบว่า การเคลื่อนตัวของเซลล์บนพื้นผิวอาหารอย่างช้าๆ นั้นต้องอาศัยกระบวนการที่ใช้พลังงาน การเคลื่อนที่ลักษณะนี้จะไม่อาศัยฟลาเจลลา แต่เซลล์จะเคลื่อนที่ไปตามแนวยาวของเซลล์ ดังรูปที่ 2.8 ส่งผลให้เกิดโคโลนีที่มีขอบแผ่ขยายออกไป (รูปที่ 2.9) (McBride, 2001) การเคลื่อนที่แบบไกลดิ้งนี้มักพบในสายวิวัฒนาการของยูแบคทีเรีย (eubacteria) ซึ่งประกอบด้วย 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มมิกโซแบคทีเรีย กลุ่มไซโตฟากา-ฟลาโวแบคทีเรีย (Lapidus and Berg, 1982) และกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย (Castenholz, 1989) แม้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้

สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ แต่การศึกษาเกี่ยวกับการเคลื่อนที่นั้นมีน้อยมาก ได้มีการคิดค้นแบบจำลองเพื่ออธิบายการเคลื่อนที่ของไกลดิงแบคทีเรีย พบว่ากลไกการเคลื่อนที่ที่สามารถมีได้หลากหลาย เนื่องมาจากไกลดิงแบคทีเรียนั้นถูกจัดจำแนกไว้ได้หลายกลุ่ม



รูปที่ 2.8 การเคลื่อนตัวของเซลล์บนพื้นผิวอาหารอย่างช้าๆ ตามแนวยาวของเซลล์ (McBride, 2001)



รูปที่ 2.9 การแผ่ขยายบริเวณขอบโคโลนี เกิดจากการเคลื่อนที่ของเซลล์ (McBride, 2001)

ในปี 1979 Hodgkin และ Kaiser พบว่ามิกโซแบคทีเรียมีการเคลื่อนที่ 2 ระบบ คือ ระบบ S (Social gliding) ใช้ในการเคลื่อนที่แบบกลุ่ม และระบบ A (Adventurous gliding) สำหรับใช้ในการเคลื่อนที่เดี่ยว โดยทำการศึกษาใน *Myxococcus xanthus* สายพันธุ์ปกติ (A^+S^+) เซลล์จะมีการแผ่ขยายเป็นโคโลนี แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการเคลื่อนที่ปกติ เมื่อทำการกลายพันธุ์ยีนในระบบ S เซลล์เดี่ยวจะมีการเคลื่อนที่ปกติแต่จะสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่เป็นกลุ่ม จึงไม่สร้างฟรุตติงบอดีซึ่งต้องอาศัยการรวมกลุ่มกันของเซลล์ในช่วงหนึ่งของวงชีวิตได้ และเมื่อกลายพันธุ์ยีนในระบบ A (A^-S^+) พบว่าเซลล์จะเคลื่อนที่เป็นกลุ่มได้ดี ในขณะที่เซลล์เดี่ยวไม่สามารถเคลื่อนที่บนอาหารแข็งได้ โดยสังเกตได้จากการแผ่ขยายของโคโลนี แต่ไม่พบเซลล์เดี่ยวที่ขอบของโคโลนี

ต่อมาได้มีการศึกษาให้ลึกลงไปในระดับยีน พบว่าการเคลื่อนที่แบบ S ต้องอาศัยฟิลาซินิดที่ 4 (type IV pili) ซึ่งสร้างได้จากโปรตีนที่มาจากการแปลรหัสของกลุ่มยีน *pil* การที่ฟิลาซินิดของเซลล์เกิดการยึดตัวซ้ำๆ กัน เมื่อฟิลาซินิดสัมผัสกับพื้นผิวจะเกิดการหดตัว ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ในที่สุด ดังรูปที่ 2.10 (Kaiser, 1979)

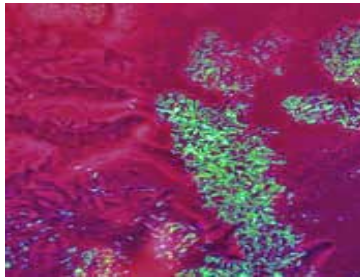


รูปที่ 2.10 ฟิลาซินิดของเซลล์เกิดการยึดตัวซ้ำๆ กัน จะส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่

การเคลื่อนที่แบบ A นั้นจะไม่อาศัยฟิลาในการเคลื่อนที่ แต่จะอาศัยยีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มยีน *cgl* ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่จำเป็นต่อการเคลื่อนที่ และกลุ่มยีน *agl* ซึ่งอาจทำหน้าที่สร้างไลโปโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารผ่านเข้าออกเซลล์ อย่างไรก็ตามกลไกการเคลื่อนที่ยังไม่ทราบแน่ชัด โปรตีน AglU จะช่วยในการขับสารเมือกที่เป็นพอลิแซคคาไรด์ออกจากเซลล์ ซึ่งขั้นตอนนี้ต้องอาศัยพลังงาน ทำให้เกิดแรงดึงผิวระหว่างตัวขับเคลื่อนและพื้นผิวของอาหาร กลุ่มยีนในระบบ A จึงเป็นตัวบ่งชี้สมบัติการเคลื่อนที่ของเซลล์เดี่ยวโดยตรง (McBride, 2001)

2.4 การตัดแยกไกลดิ้งแบคทีเรีย

มีประวัติการค้นพบไกลดิ้งแบคทีเรียมาเป็นเวลานานหลายร้อยปีมาแล้ว แต่การศึกษารายละเอียดต่างๆ ก็มีรายงานออกมาไม่กว้างขวางนัก เนื่องจากการตัดแยกเชื้อทำได้ยากและอยู่ในวงแคบ ในช่วงต่อมาก็จะมีการศึกษาและคิดค้นวิธีในการตัดแยกเชื้อแพร่หลายมากขึ้น ได้แก่ การใช้เยื่อล่อ เช่น *E. coli* ดังรูปที่ 2.11 (Hillesland, 2005) ในการแยกมิกโซแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ย่อยสลายเซลล์ ตลอดจนการแยกเชื้อที่ย่อยสลายเซลล์ได้โดยใช้กระดาษกรองในการแยก (Reichenbach และ Dworkin, 1992)



รูปที่ 2.11 ไกลดิงแบคทีเรีย (สีแดง) ขณะกินเซลล์ *E. coli* (สีเขียว) (Hillesland, 2005)

ไกลดิงแบคทีเรียบางชนิดแยกได้จากมูลสัตว์ที่อยู่ในป่า เช่น มูลกระทายป่า เนื่องจากมีความอุดมสมบูรณ์จากแร่ธาตุในดินมาก การแยกวิธีนี้จะทำให้สังเกตฟรูตติงไกลดิงแบคทีเรียได้ง่าย โดยจะเห็นเป็นก้อนกลม มีสีส้ม งอกออกมาจากมูลสัตว์อย่างชัดเจน (Reichenbach, 1999) การแยกเชื้อจากเปลือกไม้หรือซากพืชที่กำลังเน่าเปื่อยก็สามารถพบไกลดิงแบคทีเรียได้เช่นกัน (Dawid, 2000) เช่น พบ *Sorangium* sp. บนเปลือกไม้ซึ่งย่อยเซลลูโลสได้ (Reichenbach และ Dworkin, 1982) นอกจากนี้ในทะเลก็สามารถพบมิกโซแบคทีเรียได้ (Brockman, 1970) โดยเชื่อว่าเชื้อจะอยู่ในรูปสปอร์อาศัยในน้ำทะเล ซึ่งอยู่รอดในภาวะที่มีเกลือสูงได้เนื่องจากเซลล์เป็นเซลล์ในระยะพัก (Reichenbach และ Dworkin, 1992)

ในปี 2002 Li และคณะได้ทำการคัดแยกเชื้อจากทะเล โดยพบ *Myxococcus* sp. *Coralloccoccus* sp. *Cystobacter* sp. และ *Angiococcus* sp. จากน้ำทะเล ทราบ หอยนางรม และหญ้าทะเล ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าไกลดิงแบคทีเรียสามารถพบได้ในแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย ไม่ว่าจะพบในดิน เปลือกไม้ ซากพืช มูลสัตว์ หรือแม้กระทั่งในทะเลที่มีความเข้มข้นเกลือสูงมาก สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไกลดิงแบคทีเรียมีสมบัติเช่นนี้เพราะบางชนิดมีการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้โดยการสร้างฟรูตติงบอดี ซึ่งทำให้เซลล์ทนต่อภาวะต่างๆ ได้ดี (Li และคณะ, 2002) และการที่เซลล์สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอิสระส่งผลให้มีการหลีกเลี่ยงจากภาวะขาดแคลนอาหาร หรือภาวะกดดันอื่นๆ ได้ (Jiang และคณะ, 2007)

2.5 สารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะหมายถึงสามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีความเข้มข้นน้อย ๆ (Demain, 1999) สร้างโดยจุลินทรีย์ โดยส่วนมากจะเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ แต่จะไม่รวมถึงสารสกัดจากพืช หรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ เพราะสารเหล่านี้ใช้ความเข้มข้นสูงในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ ปัจจุบันสารปฏิชีวนะอาจ

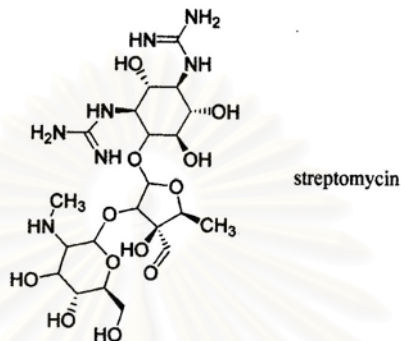
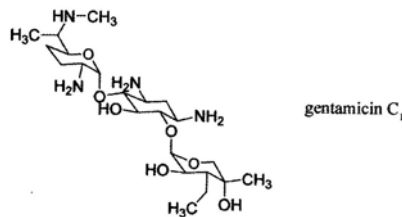
รวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้สารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากธรรมชาติเป็นต้นแบบ การทำงานของสารปฏิชีวนะแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbistatic และฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคเรียกว่า microbicidal ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbistatic ร่างกายจะกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้ระบบการป้องกันของร่างกายคือ phagocytosis การผลิตแอนติบอดี การผลิต interferon เมื่อมีการติดเชื้อจากไวรัส และกลไกการปฏิเสธรของลำไส้โดยการเกิดอาการท้องเสีย อาเจียน ถ้าสารปฏิชีวนะเป็นแบบ microbicidal จะฆ่าจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการทำให้เซลล์แตก แต่ร่างกายยังคงได้รับผลจากสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ปัจจุบันสารปฏิชีวนะในตลาดยาจำนวน 26% สกัดได้มาจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ, 38% เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่สารตั้งต้นมาจากธรรมชาติ, 4% มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยให้มีโครงสร้างเหมือนกับสารจากธรรมชาติ และ 31% มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี สารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากธรรมชาติ 63% นำมาใช้ยับยั้งแบคทีเรีย และ 61% นำมาใช้ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

2.5.1 ประเภทของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากจุลินทรีย์

2.5.1.1 สารปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides

Aminoglycosides เป็นสารปฏิชีวนะที่มักพบใน streptomycetes ได้แก่ streptomycin amikacin kanamycin gentamycin และ tobramycin เป็นสารที่ประกอบด้วย hexose nucleus ที่เรียกว่า aminocyclitol ring ซึ่งเชื่อมต่อกับ amino sugar จำนวน 2 โมเลกุลด้วย glycoside linkage เป็นสารมีขั้วจึงละลายน้ำได้ (Chambers และ Sande, 1996) มีกลไกการออกฤทธิ์แบบ bactericide ยับยั้งการแปลรหัส (translation) ของ mRNA เนื่องจากทำหน้าที่จับกับไรโบโซมของแบคทีเรียเป็นผลให้การสังเคราะห์โปรตีนถูกยับยั้ง ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides (Sneader, 2005) แสดงดังรูปที่ 2.12

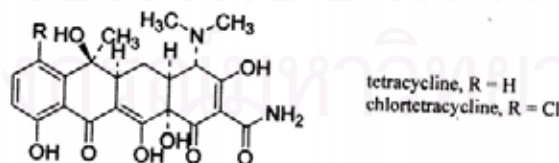
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.12 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides

4.5.1.2 สารปฏิชีวนะกลุ่ม Tetracycline

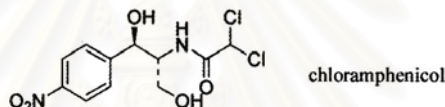
เป็นกลุ่มยากลุ่มใหญ่ที่ประกอบด้วยโครงสร้างพื้นฐานที่เหมือนกัน ประกอบด้วย polycyclic naphthacene carboxamide ที่มี 4 วงต่อกัน เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum) สามารถยับยั้ง rickettsiae และโปรโตซัวบางชนิดได้ด้วย กลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriostatic (Kapusnik-Uner และ คณะ, 1996) ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึงเป็น bactericide ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยจับกับ 30S subunit ของไรโบโซมของแบคทีเรีย โดยทำหน้าที่รบกวนการเข้ามาจับของ tRNA ทำให้การต่อสายเปปไทด์หยุดลง สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ได้แก่ tetracycline, methacycline, doxycycline, และ minocycline ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline (Sneider, 2005) แสดงดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม tetracycline

2.5.1.3 สารปฏิชีวนะกลุ่ม Chloramphenicol

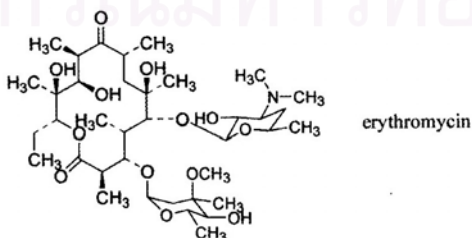
เป็นสารปฏิชีวนะตัวแรกที่สามารถสังเคราะห์ได้ เดิมใช้กันอย่างแพร่หลายเพราะออกฤทธิ์กว้างครอบคลุมเชื้อหลายชนิด แต่ปัจจุบันพบว่ามียาปฏิชีวนะอื่นที่รุนแรง จึงนำมาใช้เฉพาะการติดเชื้อระบบส่วนกลางที่รุนแรง เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เพราะ chloramphenicol สามารถผ่านผนังกันเส้นเลือดในสมองได้ดีมาก สารกลุ่มนี้จะละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ แต่ละลายได้น้อยมากในน้ำ (Kapusnik-Uner และ คณะ, 1996) สูตรโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยวงอะโรมาติกอยู่ปลายด้านหนึ่งและปลายอีกด้านหนึ่งเป็น acyl side chain ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนโดยจับกับ 50S ไรโบโซมของแบคทีเรีย จะไม่เกิดการต่อต้านของสายเปปไทด์เนื่องจากทำหน้าที่ในการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ peptidyl transferase ได้ ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม chloramphenicol (Sneider,2005) แสดงดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม chloramphenicol

2.5.1.4 สารปฏิชีวนะกลุ่ม Macrolide

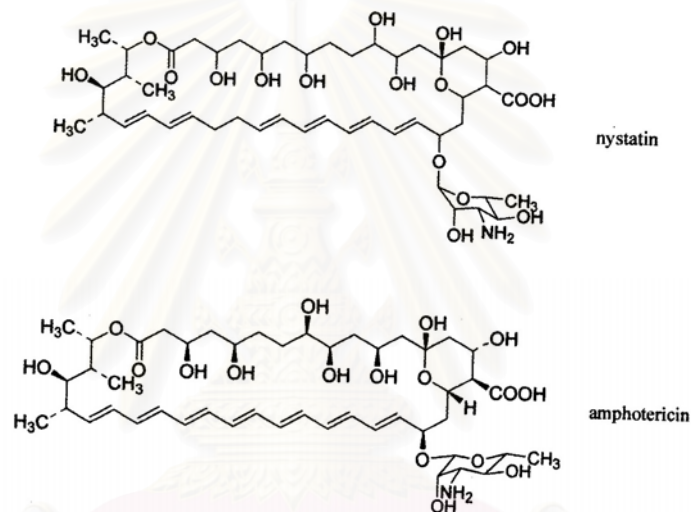
เป็นกลุ่มของสารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างหลักเป็น macrocyclic lactone ring ที่เชื่อมต่อกับ deoxy sugar ตัวหลักๆของยาในกลุ่มนี้ คือ erythromycin ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ sugar 2 หมู่ ต่อกับ lactone ring ที่มี 4 อะตอม อนุพันธ์อื่นๆ ของสารกลุ่มนี้ได้แก่ clarithromycin azithromycin roxithromycin และ dirithromycin (Chambers, 1998) กลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriostatic กับจุลินทรีย์ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยทำหน้าที่จับกับ 50S ไรโบโซมของแบคทีเรีย โดยจับอย่าง reversible ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide (Sneider, 2005) แสดงดังรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม macrolide

2.5.1.5 สารปฏิชีวนะกลุ่ม Polyene

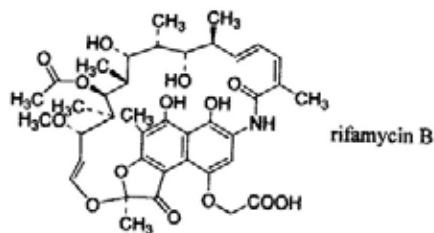
สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ เป็นสารประกอบขนาดใหญ่ ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำคือส่วน hydroxylate และส่วนที่เป็น lipophilic มีกลไกการออกฤทธิ์โดยรบกวนกระบวนการสร้าง ergosterol ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของรา ส่วนพลาสมาเมมเบรนของเซลล์คนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะมี cholesterol เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ (Carol และ Peggy, 1997) สารกลุ่มนี้ ได้แก่ nystatin และ amphotericin สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และราต่าง ๆ แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรีย ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene (Sneader, 2005) แสดงดังรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyene

2.5.1.6 สารปฏิชีวนะกลุ่ม Rifamycin

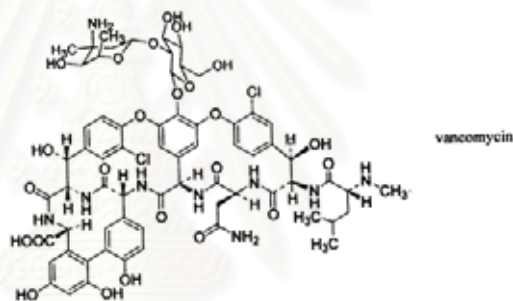
ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โดยจับกับ beta-subunit ของเอ็นไซม์ DNA-directed RNA polymerase ทำให้สาย RNA ที่ระบุรหัสโปรตีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนไม่ถูกสร้างขึ้น ยานี้จะไม่มีผลต่อเอ็นไซม์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยกเว้นกรณีที่ได้รับยาในขนาดสูงๆ การดื้อยาของเชื้อจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ beta-subunit ของเอ็นไซม์ DNA-directed RNA polymerase ยากลุ่มนี้ ได้แก่ rifamycin B (rifampin) สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิดที่สำคัญ คือ *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* และ *Mycobacterium avium* (Kapusnik-Uner และ คณะ, 1996) นอกจากนี้ยังยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้บางชนิด ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin (Sneader, 2005) แสดงดังรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม rifamycin

2.5.1.7 สารปฏิชีวนะกลุ่ม Vancomycin

ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยทำหน้าที่ขัดขวางการจับกันของ muramyl pentapeptides สารกลุ่มนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และ Staphylococci ที่ดื้อยาได้ ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะ (Sneider, 2005) แสดงดังรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 ตัวอย่างโครงสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่ม vancomycin

2.6 รายงานสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรีย

เมื่อประมาณ 200 ปีที่ผ่านมาได้มีการค้นหาไกลดิ้งแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ นักวิทยาศาสตร์ได้ลองเปลี่ยนกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยคาดว่าน่าจะมีจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่มีสมบัติดังที่กล่าวมา

ในปี 1947 มีการค้นพบว่า *Staphylococcus aureus* ถูกยับยั้งโดยสารบางอย่างที่หลั่งออกมาจาก *Myxococcus virescens* ได้ (Oxford, 1947) อีก 2 ปีต่อมาได้มีการศึกษาสารชนิดนี้ แต่ก็ไม่สามารถแยกสารหรือทราบโครงสร้างทางเคมีได้เลย

หลังจากนั้นมีการวิเคราะห์สมบัติของสารตัวแรกได้สำเร็จ ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีการแตกกิ่งก้าน เป็นสารจากมิกโซแบคทีเรีย สารชนิดนี้ยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Fusarium* sp. ได้ (Noren และ Odham, 1973)

ต่อมาได้ค้นพบสารตัวแรกที่มีการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีได้สำเร็จ คือ ambruticin (รูปที่ 2.19) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ สารชนิดนี้ถูกค้นพบใน *Sorangium cellulosum* ซึ่งเป็นไกลดิงแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสได้ และเป็นฟรุตติงไกลดิงแบคทีเรียเช่นเดียวกัน (Connor และคณะ, 1977)

ไกลดิงแบคทีเรียที่ไม่สร้างฟรุตติงบอดีก็สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้เช่นกัน มีการพบสาร myxin ซึ่งผลิตจาก *Lysobacter antibioticus* สารชนิดนี้เป็นสารประเภท phenazine dioxide (Weigle และ Leimgruber, 1967) นอกจากนี้ไกลดิงแบคทีเรียกลุ่มนี้มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พวก monobactam เป็นส่วนใหญ่ (Kato และคณะ, 1987)

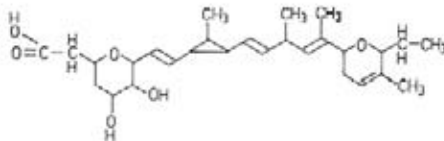
glycoprotein จาก *Cytophaga* สายพันธุ์ RB1057 สามารถยับยั้งการแผ่ขยายของโคโลนีของไกลดิงแบคทีเรีย *Cytophaga* สายพันธุ์ RB1058 ได้โดยการยับยั้งการเกาะติดระหว่างเซลล์กับพื้นผิวอาหาร จึงทำให้ *Cytophaga* สายพันธุ์ RB1058 ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารแข็ง (McBride และคณะ, 2003)

สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากไกลดิงแบคทีเรียที่ค้นพบเป็นส่วนใหญ่จัดเป็นสารชนิดใหม่ แม้บางชนิดจะเคยพบในเชื้ออื่น เช่น althiomycin (พบใน *Streptomyces* sp.) และ pyrrolnitrins (พบใน pseudomonads) แต่ก็มีบางหมู่ที่แตกต่างไปจากเดิม (Reichenbach และคณะ, 1988)

ต่อมาได้มีการคัดแยกไกลดิงแบคทีเรียมากขึ้น และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกค้นพบอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปี 1975 เป็นต้นมาได้มีการค้นพบไกลดิงแบคทีเรียที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทั้งสิ้น 1,100 สายพันธุ์ พบว่าเป็นฟรุตติงไกลดิงแบคทีเรีย 800 สายพันธุ์ และเป็นไกลดิงแบคทีเรียที่ไม่สร้างฟรุตติงบอดี เพียง 300 สายพันธุ์ (Reichenbach และคณะ, 1984) จึงสมควรที่จะคัดแยกไกลดิงแบคทีเรียที่ไม่สร้างฟรุตติงบอดีให้มากขึ้นด้วยนอกเหนือจากฟรุตติงไกลดิงแบคทีเรีย

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ผลิตจากไกลดิงแบคทีเรียมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 2.20 พบได้ทั้งสาร aromatics heterocycles quinines macrocycles lactones polyethers polyenes และ peptides (Reichenbach และคณะ, 1988)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.19 ambruticin สารยับยั้งการเจริญของรา ที่ผลิตจาก *Sorangium cellulosum* เป็นสารตัวแรกที่มีการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีได้สำเร็จ

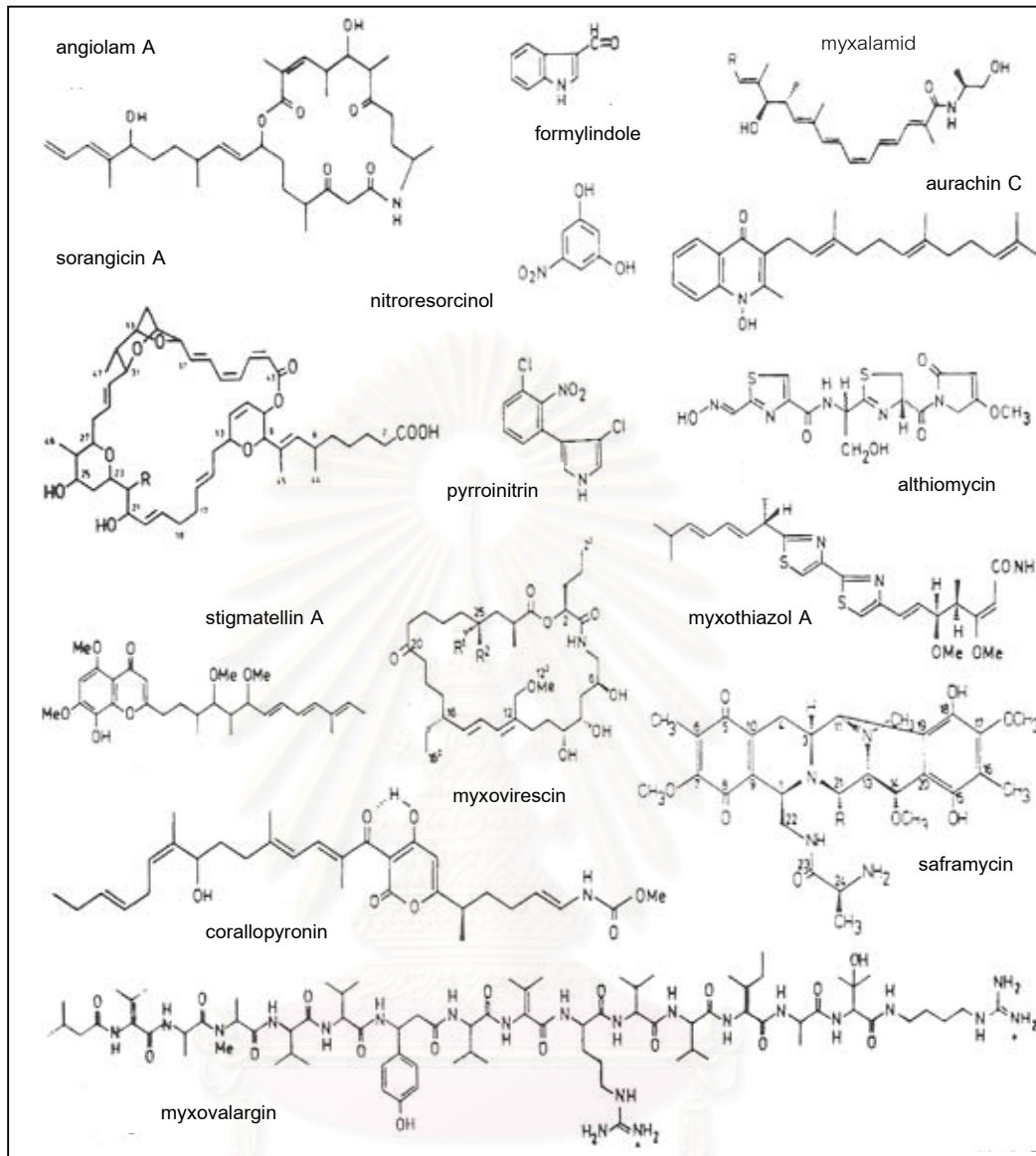
ล่าสุดได้มีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ชนิดใหม่ จากไกลดิ้งแบคทีเรีย และมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันมากมาย ดังนี้

crocacins พบในฟรุตติงไกลดิ้งแบคทีเรีย ได้แก่ *Chondromyces crocatus* และ *Chondromyces pediculatus* ยับยั้งการเจริญของยีสต์และราและได้โดยการยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจที่ cytochrome *bc*, complex III (Jansen และคณะ, 1999)

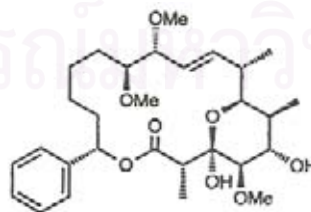
myxothiazol พบใน *Myxococcus fulvus* ยับยั้งการเจริญของราได้โดยการยับยั้งกระบวนการหายใจในไมโทคอนเดรียที่ cytochrome *bc*, complex III เช่นเดียวกับสาร crocacins (Steinmets และคณะ, 2000)

myxalamide พบใน *Cystobacter fuscus* ยับยั้งการเจริญของร่าอโรคในพืช โดยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH ในกระบวนการหายใจที่ไมโทคอนเดรีย (Kundim และคณะ, 2004)

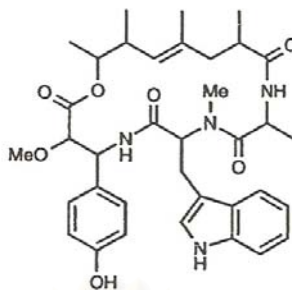
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



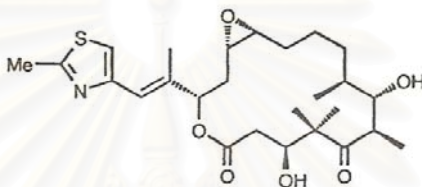
รูปที่ 2.20 โครงสร้างที่แตกต่างกันของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่ผลิตจากโกลดิงแบคทีเรีย (Reichenbach และคณะ, 1988)



รูปที่ 2.21 soraphen A สารยับยั้งการทำงานของ acetyl-CoA carboxylase ของรา ผลิตจาก *Sorangium cellulosum*



รูปที่ 2.22 chondramide A จาก *Chondromyces crocatus* มีสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็งได้



รูปที่ 2.23 epothilone A ช่วยรักษาสภาพไมโคทิวบูลและนำเซลล์ไปสู่การตายแบบอะพอพโทซิส

soraphen A (รูปที่ 2.21) พบใน *Sorangium cellulosum* ยับยั้งการทำงานของ acetyl-CoA carboxylase ของราได้อย่างจำเพาะเจาะจงและไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อพืชชั้นสูง จึงสามารถประยุกต์ทำเป็นยาฆ่าราที่ก่อโรคในพืชผลทางการเกษตรได้ ซึ่งปัจจุบันยังไม่ทำการค้า เนื่องจากต้องศึกษาถึงผลข้างเคียงอื่นๆ อีก (Reichenbach, 2001)

chondramide A (รูปที่ 2.22) จาก *Chondromyces crocatus* กระตุ้นการต่อสายของ แอกตินในเซลล์ยูคาริโอต สาร epothilone A (รูปที่ 2.23) ช่วยรักษาสภาพไมโคทิวบูลในเซลล์ไม่ให้สปีนเดิลไฟเบอร์ทำงาน ส่งผลให้การแบ่งตัวไม่เกิดขึ้น ซึ่งจะนำเซลล์ไปสู่การตายแบบอะพอพโทซิสได้ จึงสามารถนำไปประยุกต์เป็นยารักษามะเร็งในอนาคตได้ (Reichenbach, 2001)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าไกลดิ้งแบคทีเรียเป็นทั้งผู้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ รวมทั้งยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ ในปัจจุบันมีการค้นพบสารที่ผลิตได้จากไกลดิ้งแบคทีเรียทั้งสิ้น 80 โครงสร้างพื้นฐาน 450 โครงสร้างย่อย โดย 40 % ของสารที่พบจัดเป็นสารชนิดใหม่ (Reichenbach, 2001) ประกอบกับกลไกในการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้มีความพิเศษที่หาได้ยากในจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ไกลดิ้งแบคทีเรียจึงมีคุณค่าควรแก่การศึกษาในฐานะกลุ่มจุลินทรีย์ผู้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มใหม่ที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

บทที่ 3

อุปกรณ์สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น BE600 บริษัท Memmert, Germany
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น V3-4 บริษัท Triwork Ltd., Thailand
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) รุ่น UE600 บริษัท Memmert, Germany
- กล้องแยกเซลล์ (micromanipulator)
- HPLC รุ่น Alltima คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร
- เครื่องชั่งน้ำหนักหยาบ (Laboratory Balance) รุ่น PB3002 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด (Analytical Balance) รุ่น L2200p บริษัท Sartorius, Germany
- กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) Olympus รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus optical Co.,Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ60 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องถ่ายรูป Sony รุ่น DSC-T70 บริษัท Sony, Japan
- เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, USA
- เครื่องเขย่าแบบหมุน (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc.Edison, USA
- เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-100 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
- เครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) รุ่น 77520 บริษัท Labconco, U.S.A.
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo, Switzerland

- ชุดระเหยแห้งโดยการหมุน (centrivap) รุ่น Labconco บริษัท Becthai Bangkok Equipment and Chemical Co., Ltd., Thailand
- ซีมาไฮโตมิเตอร์ (haemocytometer) ขนาด 0.0025 mm^2 ยี่ห้อ Loptik Labor บริษัท Boeco
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA
- ชุดเครื่องเจลอิเล็กโทรฟอเรซิส (Electrophoresis chamber set) รุ่น Mupid-ex บริษัท Advance
- เครื่องตรวจจบบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น Spectrafuge บริษัท National Labnet, Co., Edison, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 6500 บริษัท Kubota Corp., Tokyo Japan
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 บริษัท Spectronic Unicam, USA ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80°C รุ่น ULT 1786 บริษัท FORMA Scientific, USA
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) Sharp อุณหภูมิ -20°C
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G560-E บริษัท Scientific Industries, Inc., NewYork, USA
- ไมโครปิเปต (automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2 μl), P10 (0.5-10 μl), P20 (2-20 μl), P100 (20-100 μl), P1000 (0.2-1ml) บริษัท Gilson, France
- ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 1-200 μl และ 1 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครทิวบ์ (microtubes) ขนาด 1.5 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 0.2 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 ml บริษัท Nipro(Thailand) Corp., LTD., Thailand
- กระดาษกรอง (cellulose acetate membrane filter) ขนาด $0.45 \mu\text{m}$ บริษัท Sartorius, Germany

- ตัวกรองชนิด Nylon ขนาด 0.45 μm บริษัท National Scientific
- มีดผ่าตัด (surgical blade) บริษัท Feather Safety Razor Co., Ltd., Japan
- ไม้พันสำลี (cotton swab) บริษัท Mfg. NTT Marketing Co., Ltd., Thailand
- ชุดสกัดแยกสาร (separating funnel) รุ่น NS29,2/32 ขนาด 250 ml บริษัท witeg, Germany
- แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F₂₅₄ บริษัท Merck, Germany
- หลอด TLC (capillary) ขนาด 20 μl บริษัท Blaubrand, Germany
- แผ่น PLC ขนาด 20x20 ซม. ความ 2 มม. บริษัท Blaubrand, Germany
- หลอดยูวี (UV lamp) ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร รุ่น V01 7887 บริษัท Vilber Lourmat, France
- UV-VIS spectrometer รุ่น Perkin-Elmer Lambda
- Paper disc เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. อย่างหนา บริษัท Toyo Rhoshi Kaisha, Ltd., Japan

3.2 สารเคมีและชุดทดสอบสำเร็จ

- สารสกัดจากเปปไทอน (Bacto peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
- สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
- สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Marine บริษัท Bio-Rad, USA
- เคซีโตน บริษัท Bio-Rad, USA
- กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organics, Inc., USA
- น้ำตาลกลูโคส บริษัท Merck, Germany
- กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต บริษัท AJEX Chemicals, Australia
- อะซีโตน (analytical grade) บริษัท Merck, Germany
- ไฮโซโพรพานอล บริษัท Merck, Germany
- เมทานอล (HPLC grade) บริษัท Merck, Germany
- เอทิลอะซิเตท (analytical grade) บริษัท Merck, Germany
- เฮกเซน (analytical grade) บริษัท Merck, Germany

- ไดคลอโรมีเทน (analytical grade) บริษัท Merck, Germany
- คลอแรมเฟนิคอล บริษัท Becton, Dickinson and Company, USA
- Lambda HindIII บริษัท Bio-Rad, UK
- 100 bp DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK
- Proteinase K บริษัท US.Biological, US
- Ribonuclease A (Rnase A) บริษัท Promega, USA
- ชุด PCR purification kit QIAquick PCR purification kit บริษัท Qiagen, Germany
- ชุดเอนไซม์ Taq DNA polymerase บริษัท New England Biolabs, USA
- อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAI, Japan อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บริษัท Bio-Rad, USA

3.3 ตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อ

เก็บตัวอย่างดิน น้ำ ปุ๋ย ชากใบไม้ วัตถุในทะเล รวมทั้งมูลสัตว์ตามแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัด นครปฐม กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี นครนายก พิษณุโลก ปราจีนบุรี กาญจนบุรี ตาก ระยอง กระบี่ สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช โดยเก็บตัวอย่างละประมาณ 20 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกซิปล็อค บันทึกชนิดของตัวอย่าง สถานที่เก็บ ลักษณะ และสีของตัวอย่าง ระหว่างที่ตัวอย่างถูกวิเคราะห์ เก็บใส่ถุงพลาสติกซิปล็อคไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากวิเคราะห์แล้ว เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C

3.4 การคัดแยกไกลดิ้งแบคทีเรียจากตัวอย่าง

3.4.1 การคัดแยกไกลดิ้งแบคทีเรียที่ไม่สร้างฟรุติติงบอดี

นำตัวอย่างดิน ปุ๋ย หรือชากใบไม้ วัตถุในทะเล หรือมูลสัตว์ปริมาณเล็กน้อยมาไปรยบนกลางจานอาหารแข็ง Water Cycloheximide Agar (WCX agar) สำหรับตัวอย่างที่เก็บจากทะเลใช้ marine agar ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวให้หยดตัวอย่างน้ำหรือสารละลายดินเจือจางจำนวน 1 หยดบริเวณริมจานอาหารแข็งเฉียง 45° ให้หยดน้ำไหลเป็นแนวผ่านตรงกลางจาน อาหารแข็ง WCX agar จะมีการเติม crystal violet 0.1% (w/v) เพื่อลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแกรมบวก และ cycloheximide 2.5 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งรา (Zhang และคณะ, 2002) ซึ่งจะต้องเตรียมอาหารไว้ล่วงหน้าประมาณ 2-3 วัน ให้ผิวหน้าของอาหารแห้งเพื่อป้องกันแบคทีเรียที่มีแฟลเจลลาเคลื่อนที่ปะปน นอกจากนี้การที่ผิวหน้าของอาหารแห้งจะทำให้

ให้สังเกตการเคลื่อนที่ของไกลดิงแบคทีเรียได้ชัดเจนขึ้นได้ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 28-30°C เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการเจริญของไกลดิงแบคทีเรีย ซึ่งสามารถจำแนกไกลดิงแบคทีเรียออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นโดยจะพบโคโลนีที่มีลักษณะแผ่ขยายออกอันเนื่องมาจากการเคลื่อนที่ ทำการแยกเชื้อโดยตัดชิ้นส่วนของโคโลนี ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อยังไม่แก่เมื่อเทียบกับกลางโคโลนีไปวางบนอาหารแข็ง Yeast Agar (Vy/2 agar) ซึ่งมีสารอาหารอุดมสมบูรณ์กว่า WCX agar ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 28-30°C กระทั่งเชื้อเติบโต จากนั้นใช้เครื่องมือ micromanipulator (Sly and Arunpairojana, 1987) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้แยกเซลล์จุลินทรีย์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวและบริสุทธิ์มาวางบนอาหารแข็ง Vy/2 agar อีกครั้ง

3.4.2 การคัดแยกไกลดิงแบคทีเรียที่สร้างฟรูตติงบอดีหรือมิโซแบคทีเรีย

นำตัวอย่างดิน ปุ๋ย หรือซากพืชที่ผู้ปริมาณเล็กน้อยมาวางเป็นกลุ่มบนจานอาหารแข็ง WCX agar บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 28-30°C เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตการปรากฏของฟรูตติงบอดีบนกองดิน โดยจะมีลักษณะกลมแบน หรือเป็นซ่อ และมีสีส้ม ทำการแยกเชื้อโดยใช้ปลายมีดผ่าตัดเชื้อ ฟรูตติงบอดีมาวางบนอาหารแข็ง Vy/2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 28-30°C กระทั่งเชื้อเจริญ (Sly and Arunpairojana, 1987) จากนั้นใช้เครื่องมือ micromanipulator แยกเซลล์เดี่ยวเช่นเดียวกับไกลดิงแบคทีเรียที่ไม่สร้างฟรูตติงบอดี

3.4.3 การตรวจสอบการเคลื่อนที่ของไกลดิงแบคทีเรีย

เชื้อที่คัดแยกได้จะถูกนำมาตรวจสอบว่าเป็นไกลดิงแบคทีเรียหรือไม่ โดยสังเกตจากการเคลื่อนที่ในอาหารเหลวด้วยวิธี hanging drop ซึ่งเป็นการตรวจดูแบคทีเรียในหยดน้ำแขวนลอยด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่าสามารถเคลื่อนที่ได้หรือไม่ โดยใช้สไลด์ที่มีหลุมตรงกลางปิดทับด้วย coverslip ไกลดิงแบคทีเรียไม่มีแฟลเจลลา ดังนั้นจึงไม่เคลื่อนที่ในอาหารเหลว

3.5 การเก็บรักษาไกลดิงแบคทีเรีย

ตัดชิ้นส่วนของโคโลนีหรือเชื้อฟรูตติงบอดีไปวางบนอาหารแข็ง Vy/2 agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30°C ประมาณ 3-5 วัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ได้เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ สำหรับการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานจะทำให้แห้งโดยวิธีเยือกแข็ง (lyophilization) แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C

3.6 การคัดกรองไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการคัดเลือกไกลดิ้งแบคทีเรียมาทดสอบจำนวน 10 สายพันธุ์ จาก 52 สายพันธุ์ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อไกลดิ้งแบคทีเรีย

การเตรียมเซลล์ไกลดิ้งแบคทีเรียจะตัดชิ้นรุ้นไกลดิ้งแบคทีเรียในข้อ 3.5 ขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ไปวางบนอาหารแข็ง $Vy/2$ agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ประมาณ 3-5 วัน จากนั้นทำการตัดชิ้นรุ้นจำนวน 4 ชิ้น ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว Casitone Yeast Extract Broth (CYE broth) 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อ

3.6.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

ถ่ายไกลดิ้งแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวในข้อ 3.6.1 ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว CYE broth 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เลี้ยงก่อนทำการทดสอบ 7-10 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายต่อไป

3.6.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (ภาคผนวก ค)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.6.2 มาปั่นแยกส่วนของเซลล์และน้ำหมักออกจากกัน ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำทั้งเซลล์และน้ำหมักมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การสกัดสารจากน้ำหมักทำได้โดยใช้อะซิโตน (acetone) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (V/V) (Jansen และคณะ, 1999) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัด เมื่อระเหยอะซิโตนออกด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (V/V) (Jansen และคณะ, 1999) ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วต่ำหรือไม่มีขั้วและมีน้ำหนักมากกว่าน้ำ จึงแยกชั้นกับน้ำโดยสารที่ไม่ละลายน้ำจะอยู่ส่วนล่างในชั้นไดคลอโรมีเทน และสารที่ละลายในน้ำได้จะอยู่ส่วนบน ในกรณีการสกัดสารจากเซลล์ให้ละลายเซลล์ด้วยอะซิโตนในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (W/V) โดยใส่เม็ดแก้วลง

ไปบดให้เซลล์แตก ทิ้งไว้ให้กากเซลล์ตกตะกอนจึงดูดส่วนใสไปสกัดด้วยไคคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (V/V) แล้วนำไประเหยแห้งด้วยชุดระเหยแห้งแบบหมุน ทำการเก็บสารจากชั้นไคคลอโรมีเทน (ส่วนล่าง) สารจากชั้นน้ำและอะซีโตน (ส่วนบน) และน้ำหมัก นำมาทำให้แห้งด้วยเครื่อง centrivap ส่วนน้ำหมักทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry ซึ่งน้ำหนักสารและเก็บสารสกัดไว้ในหลอดไมโครทิวบ์ ที่อุณหภูมิ -20°C ซึ่งจะนำไปทดสอบขั้นต้นกับจุลินทรีย์ก่อโรคต่อไป

3.6.4 การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี paper disc diffusion (Kundim และคณะ, 2004)

ตารางที่ 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (tested microorganisms)

กลุ่มจุลินทรีย์	ชื่อจุลินทรีย์	แหล่งที่มา	สาเหตุของอาการหรือโรค
แบคทีเรียแกรมบวก	<i>Staphylococcus aureus</i>	TISTR 118	ฝี อาหารเป็นพิษ
	<i>Bacillus subtilis</i>	TISTR 008	อาหารเป็นพิษ
แบคทีเรียแกรมลบ	<i>Escherichia coli</i>	TISTR 780	ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ ท้องร่วง
	<i>Enterococcus faecium</i>	TISTR 1283	ท้องร่วง โรคในช่องปาก
ยีสต์	<i>Candida albicans</i>	TISTR 5119	โรค Candidiasis
รา	<i>Fusarium oxysporum</i>	DOAC 0874	โรค Panama Disease ในพืช

3.6.4.1 จุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย

3.6.4.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำแบคทีเรียทดสอบขีด (streak) บนอาหาร Nutrient agar (NA) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว สำหรับ *Enterococcus faecium* ใช้อาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เขี่ยโคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) 5 มิลลิลิตร สำหรับ *Enterococcus faecium* ใช้อาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard ซึ่งเทียบเท่ากับการอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.1 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 3×10^8 CFU/ml

3.6.4.1.2 การเก็บรักษา

เขียนแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็งลาดเอียง NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C

3.6.4.2 จุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นยีสต์

3.6.4.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำยีสต์ทดสอบขีด (streak) บนอาหาร Yeast-Malt Extract Agar (YMA) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เขียนโคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Malt Extract Broth (YMB) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของยีสต์ทดสอบให้เทียบเท่า 0.5 McFarland Standard ซึ่งเทียบเท่ากับการอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ให้เท่ากับ 0.1 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 3×10^6 CFU/ml

3.6.4.2.2 การเก็บรักษา

เขียนยีสต์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งลาดเอียง YMA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C

3.6.4.3 จุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใย

3.6.4.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงราในอาหารแข็งลาดเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) 3-5 วัน หรือจนมีการสร้างสปอร์ เดิมสารละลาย 0.85% NaCl ใช้ลูป (loop) ขูดสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย กรองสปอร์ด้วยสำลีปลอดเชื้อ จากนั้นเจือจางสปอร์ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ 3×10^6 spore/ml โดยนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemocytometer)

3.6.4.3.2 การเก็บรักษา

เลี้ยงราเส้นใยบนอาหารแข็งลาดเอียง PDA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C

3.6.4.4 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

ใช้สำลีพันปลายไม้จุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.6.4.1-3.6.4.3 เกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วจาน (อาหารสำหรับแบคทีเรีย ยีสต์ และราทดสอบ ได้แก่ อาหาร NA MRS agar YMA และ PDA ตามลำดับ) จากนั้นเปิดสารทดสอบ ได้แก่ สารขึ้นอะซีโตน สารขึ้นไดคลอโรมีเทนจากเซลล์และน้ำหมักที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยหยดสารลงบนแผ่นกระดาษกลม (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ให้สารมีปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ปริมาณสาร 30 ไมโครกรัม) และ 50 ไมโครลิตร (ปริมาณสาร 50 ไมโครกรัม) สำหรับทดสอบแบคทีเรีย และรา ตามลำดับ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำ paper disc ไปวางบนจานทดสอบ สำหรับแบคทีเรียนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และราเส้นใยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 ถึง 5 วัน (ทำ 2 ซ้ำ) โดยชุดควบคุมบวมหมายถึงยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบจนเกิดบริเวณใส (inhibition zone) สำหรับแบคทีเรีย คือ chloramphenicol ยีสต์ คือ nystatin และราเส้นใย คือ cycloheximide ซึ่งยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ *B. subtilis* *En. faecium* *E. coli* *S. aureus* *C. albicans* และ *F. oxysporum* เส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 23 26 29 25 26 และ 27 มิลลิเมตร ตามลำดับ และชุดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อ ตัวทำละลายอะซีโตน และไดคลอโรมีเทน ทั้งนี้ขนาดของ inhibition zone จะวัดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ขอบของบริเวณใส จากด้านหนึ่งมายังอีกด้านหนึ่ง

3.7 การศึกษาการเจริญของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4

ศึกษาการเจริญของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 โดยถ่ายไกลดิ้งแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวในข้อ 3.6.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (2.5%) ลงในอาหารเหลว CYEB 50 มิลลิลิตร จำนวน 30 ขวด เขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จนกว่าเซลล์มีการเจริญคงที่ ปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเซลล์ออกจากน้ำหมัก และหาลำต้นแห้งเฉลี่ยของเซลล์ (ภาคผนวก ง)

3.8 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักชั้นไดคลอโรมีเทนเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

ศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 โดยถ่ายไกลดิงแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวในข้อ 3.6.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (2.5%) ลงในอาหารเหลว CYEB 200 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 9 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 3 5 7 และ 9 กรองแยกส่วนเซลล์และน้ำหมักออกจากกันแล้วนำน้ำหมักมาสกัดด้วยตัวทำละลายตามวิธีในข้อ 3.6.3 จากนั้นจึงนำสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนมาซึ่งน้ำหนัก และทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (ทำ 2 ซ้ำ) ด้วยวิธี paper disc diffusion ต่อไป

3.9 การแยกสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

ละลายสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่เลี้ยงได้จากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาเวลา 7 วัน จากข้อ 3.8 ด้วยเมทานอล แล้วหยดสารปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F254 โดยมีระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่ใช้เป็นตัวพาให้สารเคลื่อน ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ในอัตราส่วนเท่ากับ 55%:22.5%:22.5% ตามลำดับ เพื่อให้สารแยกออกจากกัน จากนั้นตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้โดยส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร

3.10 การแยกสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC)

เป็นวิธีการทำสารให้บริสุทธิ์โดยใช้หลักการเดียวกับข้อ 3.9 โดยใช้แผ่น PTLC รุ่น silica gel 60 F254 ซึ่งเป็นผงซิลิกาที่แนบติดกับแผ่นกระจกที่มีความหนา 2 มิลลิเมตร ขนาด 20x20 เซนติเมตร ในขั้นนี้ต้องการเพิ่มปริมาณสารสกัดในแต่ละองค์ประกอบเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไปว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ จึงเพิ่มปริมาณการเลี้ยงเชื้อให้มากขึ้น โดยเลี้ยงไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว CYEB 200 มิลลิลิตร (ปริมาตรทั้งหมด 5 ลิตร) เป็นเวลา 7 วัน นำน้ำหมักมาสกัดด้วยตัวทำละลายตามวิธีในข้อ 3.6.3 ระบายให้แห้งแล้วแบ่งสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนส่วนหนึ่งมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ (ทำ 2 ซ้ำ) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดก่อนทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ นำสารสกัดอีกส่วนหนึ่งมาละลายในเมทานอลแล้วฉีดเป็นทางยาวบนแผ่น PTLC นำไป develop ด้วยตัวทำละลายผสม

ระหว่าง เฮกเซน เอทิลแอลกอฮอล์ และเมทานอล ในอัตราส่วนเดียวกับ TLC คือ 55%:22.5%:22.5% ตามลำดับ ทิ้งไว้ให้แห้งจึงวิเคราะห์ตำแหน่งของสารบนแผ่น PTLC โดยส่องภายใต้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ทำการสกัดสารแต่ละองค์ประกอบโดยใช้สันของมีดคัตเตอร์ขูดผงซิลิกาออกจากแผ่นกระจก นำผงซิลิกาแต่ละส่วนมาละลายในเมทานอล เพื่อแยกเอาส่วนของสารสกัดออกจากส่วนของผงซิลิกา ทำการกรองเพื่อเก็บสารสกัดแต่ละองค์ประกอบที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอล ทำให้แห้งด้วยเครื่อง centrivap ซึ่งน้ำหนัก (ภาคผนวก ง) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารโดยวิธี TLC อีกครั้งเพื่อศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดแต่ละองค์ประกอบต่อไป

3.11 การศึกษาการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยวิธี UV-VIS spectroscopy ของสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคอลลอโรมีเทนที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี PTLC

นำสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคอลลอโรมีเทนที่ผ่านการแยกโดยวิธี PTLC ในข้อ 3.10 ทั้งสาร A B และ C มาละลายในเมทานอล ใส่ในหลอดที่มีฝาปิด เพื่อป้องกันการระเหยของเมทานอล จากนั้นนำมาหาค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-VIS spectrometer ที่ช่วงการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 ถึง 400 นาโนเมตร (ภาคผนวก ง) โดยใช้เมทานอลเป็น base line ซึ่งเท่ากับ 0

3.12 การแยกสาร C จากสารสกัดน้ำหมักชั้นไดคอลลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี High Performance liquid Chromatography (HPLC)

ละลายสารสกัดไดคอลลอโรมีเทนจากน้ำหมัก ที่ได้จากข้อ 3.10 ด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลายไปกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูป ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ลงในหลอดขนาดเล็กสำหรับฉีด HPLC เก็บที่อุณหภูมิ -20°C ทำสารให้บริสุทธิ์ด้วย Reverse Phase HPLC โดยแปรผันอัตราส่วนของตัวชะสาร (เมทานอล) ตั้งแต่ 0-100% เก็บสารที่ได้จากช่วงเวลา (retention time) ต่างๆ กัน นำสารแต่ละส่วนไปทดสอบความสามารถในการต้านจุลินทรีย์อีกครั้ง เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

รายละเอียดต่างๆ ในระบบ HPLC เป็นดังนี้

คอลัมน์ (column)	Alltima [®] C18 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร
ตัวชะสาร (Mobile phase)	เมทานอล 0-100%, 100 นาที
อัตราไหล (Flow rate)	0.7 มิลลิลิตร ต่อ นาที

อุณหภูมิโคคัลมันน์	25°C
ตัวตรวจวัดสาร (detector)	RI (ใช้หลักการกระเจิงแสง)
ความเข้มข้นสารที่ฉีด	6 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร
ปริมาตรสารที่ฉีด	100 ไมโครลิตร

3.13 การจำแนกไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4

ศึกษาการจัดจำแนกไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ลักษณะ slime track ลักษณะฟรูตติงบอดี และลักษณะทางพันธุศาสตร์

3.13.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Vy/2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เพื่อศึกษาการ slime track ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast (ภาคผนวก ค) ศึกษาสีและลักษณะของ ฟรูตติงบอดี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ ใช้แสง ใช้เทคนิค slide culture บันทึกลักษณะของเซลล์หากิน (vegetative cell) ลักษณะของ มิกโซสปอร์ โดยเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 9 (Reichenbach และ Dworkin, 1982)

3.13.2 วิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA

3.13.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ (Ausubel และคณะ, 1999) โดยเลี้ยงไกลดิงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Vy/2 broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 30°C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 4°C 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ละลายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 517 ไมโครลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน จึงเติมไลโซไซม์ (Lysozyme) เข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กัลบหลุดไปมาให้สารผสมกันแล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) เข้มข้น 10% ปริมาตร 30

ไมโครลิตร และโปรตีนเนสเค (protease K) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และ CTAB/NaCl ปริมาตร 220 ไมโครลิตร บ่มที่ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายชั้นบนมาเติมนอล/คลอโรฟอร์ม เท่ากับปริมาตรสารละลายสุดท้าย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที จึงนำสารละลายชั้นบนมาเติมไอโซโพรพานอล 0.6 เท่าของปริมาตรสุดท้าย กลับหลอดไปมาจนเห็นความขุ่นของดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นจึงระเหยเอทานอลให้แห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไรโบนิวคลีเอสเอ (RNase A) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.13.2.2 แยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE เกล่งในแม่พิมพ์ที่มีหัวเสียบอยู่ เมื่อเจลแข็งตัว วางชิ้นเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ แล้วเทบัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล ผสมผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกใช้กับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง ใช้เอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII จากนั้นทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนที่ได้ในระยะเวลาที่เหมาะสม ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 1 นาที ตระวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.13.2.3 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอไรเซชัน โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกิริยาและโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 27F และ 1492R ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้คือ 1,356 bp ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Forward primer 27F	GAGGTTGATCCTGGCTCAG
Forward primer 341F	TCCCCGTC AAGGTGCATCT
Reverse primer 1100R	AGGGTTGCGCTCGTTG
Reverse primer 1492R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT

ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละสารในปฏิกิริยามีดังนี้ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ $1 \times Taq$ DNA polymerase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ความเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี 3.11.1 ปริมาณ 1 พิโคกรัม ถึง 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermo Cycle) โดยให้มีสภาวะดังนี้

1. Initial denaturation ที่อุณหภูมิ $94^{\circ}C$ เป็นเวลา 5 นาที
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ $94^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 นาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ $55^{\circ}C$ เป็นเวลา 1.30 นาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ $72^{\circ}C$ เป็นเวลา 2 นาที
5. ทำขั้นตอน 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ
6. Final extension ที่อุณหภูมิ $72^{\circ}C$ เป็นเวลา 7 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% เพื่อตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.12.2.2

3.13.2.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยส่งวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part โดยบริษัทนี้ใช้ระบบ LI-COR® NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI® PRISM DNA Sequencers วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ 27F 341F 1100R และ

1492R (ตารางที่ 3.2) ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชนิดดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA จากแต่ละไพรเมอร์ (ภาคผนวก ง) นำไปเชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASIS-Mac software version 2.05 (Hitachi Software Engineering Co.Ltd) วิเคราะห์จัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

3.13.2.5 สร้าง phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่ผ่านการวิเคราะห์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกไว้แล้วมาปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal X จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ผ่านการปรับแนวมาคำนวณ distance matrix สร้าง phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining และ Bootstrap ด้วยโปรแกรม PHYLIP software package version 3.572c ได้แก่ DNADIST.EXE NEIGHBOR.EXE และ SEQBOOT.EXE ตามลำดับ นำเสนอ phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นด้วยโปรแกรม TREEVIEW (Felsenstein, 1993)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะของตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดิน น้ำ ปุ๋ย ซากใบไม้ วัตถุในทะเล รวมทั้งมูลสัตว์ตามแหล่งต่างๆ 17 จังหวัด ในประเทศไทย จำนวน 80 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.2 คัดแยกไกลดิ้งแบคทีเรียจากตัวอย่าง

จากการแยกไกลดิ้งแบคทีเรียจากตัวอย่าง 80 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง WCX agar สำหรับตัวอย่างทั่วไปและใช้ marine agar สำหรับตัวอย่างที่เก็บจากทะเล ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.4 พบว่าสามารถแยกไกลดิ้งแบคทีเรียได้จำนวน 52 สายพันธุ์ เป็นชนิดที่ไม่สร้างฟรูตติงบอดี 49 สายพันธุ์ และชนิดที่สร้างฟรูตติงบอดี 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.3 คัดกรองไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ไกลดิ้งแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 52 สายพันธุ์จากข้อ 4.2 นั้น มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันอยู่มาก พบว่ามีเพียง 10 สายพันธุ์เท่านั้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน ได้แก่ CD1 MG1 TW2 RD2 RD4 SA4 SN5 CP1 SW1 และ GR1 ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1 จึงนำไกลดิ้งแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์นี้มาศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อโดยเลี้ยงในอาหาร CYEB เป็นเวลา 7 วัน (3.6.2) แล้วทำการสกัดสารจากน้ำหมักและตัวเซลล์ตามวิธีในข้อ 3.6.3 เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 6 ชนิด ตามตารางที่ 3.1 ในข้อ 3.6.4 ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าจากไกลดิ้งแบคทีเรียจำนวน 10 สายพันธุ์ มีเพียง 6 สายพันธุ์เท่านั้น ได้แก่ CD1 TW2 RD2 RD4 SN5 และ CP1 ดังรูปที่ 4.2-4.6 ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากน้ำหมักชั้นไดคอลลอโรไมเทนที่สร้างจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด ส่วนสารสกัดจากชั้นอะซีโตนและน้ำจะยับยั้งได้เฉพาะ *F. oxysporum* เท่านั้น ในขณะที่สายพันธุ์ TW2 RD2 และ CD1 จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักชั้นไดคอลลอโรไมเทนเท่านั้น ซึ่งสารสกัดจากสาย

พันธุ์ TW2 จะยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ส่วนสายพันธุ์ RD2 ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก และสายพันธุ์ CD1 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *E. coli* และ ยีสต์ ในโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SN5 จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากน้ำหมักทั้งสารสกัดจากชั้นไดคลอโรมีเทนและชั้นอะซีโตนและน้ำได้เช่นเดียวกับสายพันธุ์ RD4 โดยสารสกัดจากชั้นไดคลอโรมีเทนจะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด ยกเว้น *C. albicans* และ *En. faecium* แต่ *En. faecium* จะถูกยับยั้งได้โดยสารสกัดจากชั้นอะซีโตนและน้ำ ทั้งนี้ไม่พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างจากโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ MG1 SA4 SW1 และ GR1 เลย ส่วนสารสกัดจากเซลล์นั้นจะพบในสายพันธุ์ CP1 เท่านั้น โดยยับยั้งได้เฉพาะ *B. subtilis* และ *C. albicans*

จากการคัดกรองโกลดิงแบคทีเรียจำนวน 10 สายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานทางวิทยาแตกต่างกัน พบว่ามีเพียงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด และมีบริเวณยับยั้งกว้างกว่าสายพันธุ์อื่นเป็นส่วนใหญ่ โกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 จึงถูกคัดเลือกมาทำการศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและไกลดิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับ ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของตัวอย่าง	สายพันธุ์ ไกลดิงแบคทีเรีย	ประเภท ไกลดิงแบคทีเรีย	จำนวน
1	ดินโคนต้นไม้	อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาลแดง	T1	ไม่สร้าง FB*	1
2	ดินโคนต้นไม้	อ. ไทรน้อย จ.นนทบุรี	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาล	-	-	0
3	ดินสวนผัก	อ. ไทรน้อย จ.นนทบุรี	เนื้อเหนียว สีน้ำตาล	T2	ไม่สร้าง FB	1
4	ปุ๋ยชีวภาพ	อ. ไทรน้อย จ.นนทบุรี	เม็ด สีน้ำตาลดำ	F1	ไม่สร้าง FB	1
5	มูลวัว	อ. ไทรน้อย จ.นนทบุรี	เม็ด แห้ง สีน้ำตาลอ่อน	CD1, CD2	สร้าง, ไม่สร้าง FB	2
6	ดินชายเลน	อ. กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร	เนื้อเหนียว สีน้ำตาลดำ	MG1	ไม่สร้าง FB	1
7	ดินโคนต้นไม้	อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	เนื้อร่วน ขึ้น สีดำ	T3	ไม่สร้าง FB	1
8	ดินโคนต้นไม้	อ.ชะเมา จ.ระยอง	เนื้อร่วน ขึ้น สีดำ	-	-	0
9	ดินริมผาน้ำตาล	อ.ชะเมา จ.ระยอง	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาล	-	-	0
10	ดินขุยไผ่	อ.ชะเมา จ.ระยอง	เนื้อร่วน แห้ง สีน้ำตาลแดง	T4	ไม่สร้าง FB	1
11	ดินน้ำตาล	อ.ชะเมา จ.ระยอง	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาลดำ	-	-	0
12	ซากใบไม้	อ.ชะเมา จ.ระยอง	กำลังย่อยสลาย เมื่อก สีน้ำตาลดำ	-	-	0
13	ดินสวนยางพารา	อ.ชำฝ่อ จ.ระยอง	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาลแดง	-	-	0
14	ดินทุ่งโล่ง	อ.ชำฝ่อ จ.ระยอง	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาล	-	-	0

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและโกลดิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับ ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของตัวอย่าง	สายพันธุ์ โกลดิงแบคทีเรีย	ประเภท โกลดิงแบคทีเรีย	จำนวน
15	ดินโคนต้นไม้	อ. เกาะสมุย จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน แห้ง สีน้ำตาลแดง	-	-	0
16	ดินริมทุ่งหญ้า	อ. เกาะสมุย จ.สุราษฎร์ธานี	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	-	-	0
17	ดินที่ระบายน้ำ	อ. จอมทอง กทม.	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	TW1, TW2	ไม่สร้าง FB	2
18	ปุ๋ย	อ. จอมทอง กทม.	น้ำ สีน้ำตาลเหลือง	-	-	0
19	มูลกระต่ายป่า 1	อ. เวียงสา จ.น่าน	เม็ดกลม แห้ง สีน้ำตาลอ่อน	RD1	ไม่สร้าง FB	1
20	มูลกระต่ายป่า 2	อ. เวียงสา จ.น่าน	เม็ดกลม แห้ง สีน้ำตาลอ่อน	RD2	ไม่สร้าง FB	1
21	มูลกระต่ายป่า 3	อ. เวียงสา จ.น่าน	เม็ดกลม แห้ง สีน้ำตาล	RD3	ไม่สร้าง FB	1
22	มูลกระต่ายป่า 4	อ. เวียงสา จ.น่าน	เม็ดกลม แห้ง สีน้ำตาล	RD4	สร้าง FB	1
23	สาหร่ายทะเล	อ. ชะอำ จ.เพชรบุรี	สีน้ำตาล	S1	ไม่สร้าง FB	1
24	น้ำทะเล	อ. ชะอำ จ.เพชรบุรี	ขุ่น ตะกอน สีน้ำตาลอ่อน	S2	ไม่สร้าง FB	1
25	ดินโคนต้นไม้	อ.นางรอง จ.นครนายก	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาล	-	-	0
26	ซากใบไม้ริมน้ำตก	อ.นางรอง จ.นครนายก	กำลังย่อยสลาย สีน้ำตาลเหลือง	NA1	ไม่สร้าง FB	1
27	เมือกบนโขดหิน	อ.นางรอง จ.นครนายก	เมือก สีน้ำตาลแดง	NA2	ไม่สร้าง FB	1
28	ดินริมน้ำตก	อ.นางรอง จ.นครนายก	เนื้อร่วน เปี้ยก สีน้ำตาล	-	-	0

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและโกลดิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับ ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของตัวอย่าง	สายพันธุ์ โกลดิงแบคทีเรีย	ประเภท โกลดิงแบคทีเรีย	จำนวน
29	ดินโคนต้นไม้	อ. สารีกา จ.นครนายก	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาลดำ	-	-	0
30	ซากใบไม้	อ. สารีกา จ.นครนายก	กำลังย่อยสลาย สีเขียวดำ	SA2	ไม่สร้าง FB	1
31	รากต้นไม้	อ. สารีกา จ.นครนายก	เมือก ขึ้น สีน้ำตาลดำ	SA3	ไม่สร้าง FB	1
32	เมือกบนโชดหิน	อ. สารีกา จ.นครนายก	เมือก สีน้ำตาล	SA4	ไม่สร้าง FB	1
33	ดินนาข้าว	อ. องครักษ์ จ.นครนายก	เนื้อเหนียว สีดำ	R1	ไม่สร้าง FB	1
34	เมล็ดข้าว	อ. องครักษ์ จ.นครนายก	เม็ดรี กำลังย่อยสลาย สีดำ	R2	ไม่สร้าง FB	1
35	เมือกบนโชดหิน น้ำตกไทรโยคน้อย	อ. ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เมือก สีน้ำตาลอ่อน	-	-	0
36	ดินโคนต้นไม้ น้ำตก ไทรโยคน้อย	อ. ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาลดำ	-	-	0
37	ซากใบไม้ น้ำตก ไทรโยคน้อย	อ. ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	กำลังย่อยสลาย เมือก สีเหลือง ดำ	-	-	0
38	ซากใบไม้ริมทาง น้ำตกไทรโยคน้อย	อ. ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	กำลังย่อยสลาย สีดำ	SN4	ไม่สร้าง FB	1

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและโกลดิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับ ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของตัวอย่าง	สายพันธุ์ โกลดิงแบคทีเรีย	ประเภท โกลดิงแบคทีเรีย	จำนวน
39	ดินริมน้ำตกไทรโยคน้อย	อ. ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาลแดง	SN5	ไม่สร้าง FB	1
40	ดินกอดต้นไม้ น้ำตก ไทรโยคใหญ่	อ. ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาล	-	-	0
41	ดินริมน้ำตกน้ำตก ไทรโยคใหญ่	อ. ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน เปียก สีน้ำตาลเข้ม	-	-	0
42	ดินโคนต้นไม้ น้ำตก ไทรโยคใหญ่	อ. ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	เนื้อร่วน ขึ้น สีน้ำตาลดำ	SNK8	ไม่สร้าง FB	1
43	ซากใบไม้ น้ำตก ไทรโยคใหญ่	อ. ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	กำลังย่อยสลาย สีดำ	SNK9	ไม่สร้าง FB	1
44	เศษปะการัง	อ. เกาะยาว จ.พังงา	สีน้ำตาลขาว	CP1, CP2	ไม่สร้าง FB	2
45	เปลือกหอย	อ. เกาะยาว จ.พังงา	สีขาว	S3	ไม่สร้าง FB	1
46	สาหร่ายทะเล	อ. เกาะยาว จ.พังงา	เมือก สีน้ำตาลดำ	SW1	ไม่สร้าง FB	1
47	ซากพืช	อ. เกาะยาว จ.พังงา	เมือก สีน้ำตาลเขียว	S4	ไม่สร้าง FB	1
48	ดินชายเลน	อ. เกาะยาว จ.พังงา	เนื้อเหนียว สีน้ำตาลดำ	-	-	0

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและโกลดิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับ ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของตัวอย่าง	สายพันธุ์ โกลดิงแบคทีเรีย	ประเภท โกลดิงแบคทีเรีย	จำนวน
49	ดินโคนต้นไม้	อ. พระนคร กทม.	เนื้อร่วนแห้ง สีน้ำตาล	-	-	0
50	ปุ๋ยคอกมูลวัว	อ. ประจันตคาม จ.ปราจีนบุรี	เนื้อร่วนชื้น สีน้ำตาลแดง	F2	ไม่สร้าง FB	1
51	น้ำทะเล	อ. ชนอม จ.นครศรีธรรมราช	มีตะกอน ชุ่มเล็กน้อย	S5	ไม่สร้าง FB	1
52	ดินโคนต้นไม้	อ. ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี	เนื้อร่วนชื้น สีน้ำตาล	-	-	0
53	ดินโคนต้นไม้	อ. ตาพระยา จ.กระบี่	เนื้อร่วนชื้น สีน้ำตาลดำ	T5	ไม่สร้าง FB	1
54	ดินริมน้ำตก	อ. พรหมโลก จ.พิษณุโลก	เนื้อร่วนชื้น สีน้ำตาลอ่อน	-	-	0
55	ดินชายเลน	อ. พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ	เนื้อเหนียว สีดำ	MG2	ไม่สร้าง FB	1
56	ดินคลองนาเกลือ	อ. พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ	เนื้อร่วนชื้น สีน้ำตาลแดง	MG3, MG4	ไม่สร้าง FB	2
57	ดินสนามหญ้า	อ. กำแพงแสน จ.นครปฐม	เนื้อร่วนชื้น สีดำ	GR1	ไม่สร้าง FB	1

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและโกลดิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับ ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของตัวอย่าง	สายพันธุ์ โกลดิงแบคทีเรีย	ประเภท โกลดิงแบคทีเรีย	จำนวน
58	ดินสวนผัก	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	เนื้อเหนียว สีดำ	T6	ไม่สร้าง FB	1
59	ดินริมคลอง	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	เนื้อเหนียว สีน้ำตาลดำ	-	-	0
60	ซากใบไม้	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	เมือก สีน้ำตาลเขียว	-	-	0
61	ดินโคนต้นจามจุรี	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	เนื้อร่วนแห้ง สีน้ำตาล	T7	ไม่สร้าง FB	1
62	ดินไร่อ้อย	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	เนื้อร่วนแห้ง สีน้ำตาล	-	-	0
63	ดินไร่ข้าวโพด	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	เนื้อร่วนแห้ง สีน้ำตาล	T8	ไม่สร้าง FB	1
64	ดินโคนต้นกระถิน	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	เนื้อร่วนชื้น สีน้ำตาลดำ	-	-	0
65	ปุ๋ยพืชสด	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	เนื้อร่วนชื้น สีดำ	F3, F4	ไม่สร้าง FB	2
66	ดินโคนต้นมะม่วง	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	เนื้อร่วนชื้น สีน้ำตาล	-	-	0
67	มูลม้า	อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม	สีเขียว	-	-	0
68	ดินสวนยางพารา	อ. ชนอม จ. นครศรีธรรมราช	เนื้อร่วนชื้น สีน้ำตาลแดง	-	-	0
69	ดินสวนมังคุด	อ. ชนอม จ. นครศรีธรรมราช	เนื้อร่วนชื้น สีน้ำตาลแดง	-	-	0

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างและไกลดิงแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ลำดับ ตัวอย่าง	ประเภทตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ลักษณะของตัวอย่าง	สายพันธุ์ ไกลดิงแบคทีเรีย	ประเภท ไกลดิงแบคทีเรีย	จำนวน
70	ดินสวนลونغกอง	อ. ชนอม จ. นครศรีธรรมราช	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลแดง	-	-	0
71	ดินโคนต้นมะขาม	อ. พระสมุทรเจดีย์ จ. สมุทรปราการ	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาล	-	-	0
73	ดินสีเทาโคนต้นเฟื่องฟ้า	อ. พระสมุทรเจดีย์ จ. สมุทรปราการ	เนื้อร่วน ชื้น สีเทา	T9, T10	ไม่สร้าง FB	2
74	ดินโคนต้นขนุน	อ. บางมด กทม.	เนื้อเหนียว สีดำ	TBK1, TBK2, TBK3	ไม่สร้าง FB	3
75	ดินต้นมะนาว	อ. บางมด กทม.	เนื้อร่วน ชื้น สีดำ	-	-	0
76	ดินปอน้ำ	อ. บางมด กทม.	เนื้อเหนียว สีน้ำตาลดำ	P1, P2	ไม่สร้าง FB	2
77	ดินสวนจำปี	อ. บางแค กทม.	เนื้อร่วน ชื้น สีน้ำตาลดำ	-	-	0
78	ดินสวนกล้วยไม้	อ. บางแค กทม.	เนื้อเหนียว สีดำ	T11	ไม่สร้าง FB	1
79	ดินต้นบานไม่รู้โรย	อ. บางแค กทม.	เนื้อร่วน แห้ง สีน้ำตาลอ่อน	-	-	0
80	ดินสวนมะละกอ	อ. บางแค กทม.	เนื้อร่วน แห้ง สีน้ำตาล	-	-	0

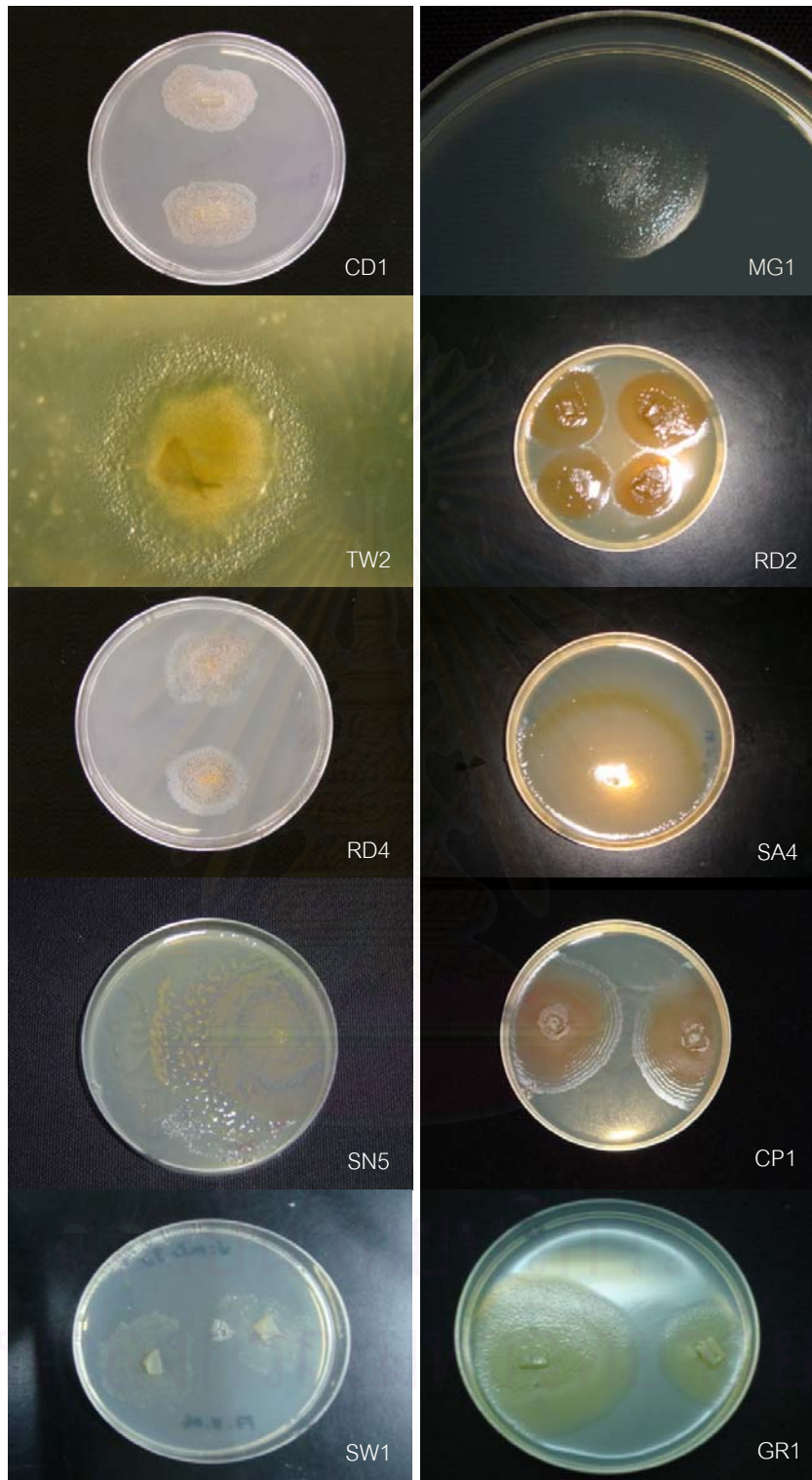
หมายเหตุ: * หมายถึง ฟรุติติงบอดี (Fruiting Body)

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไกลดิงแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษา

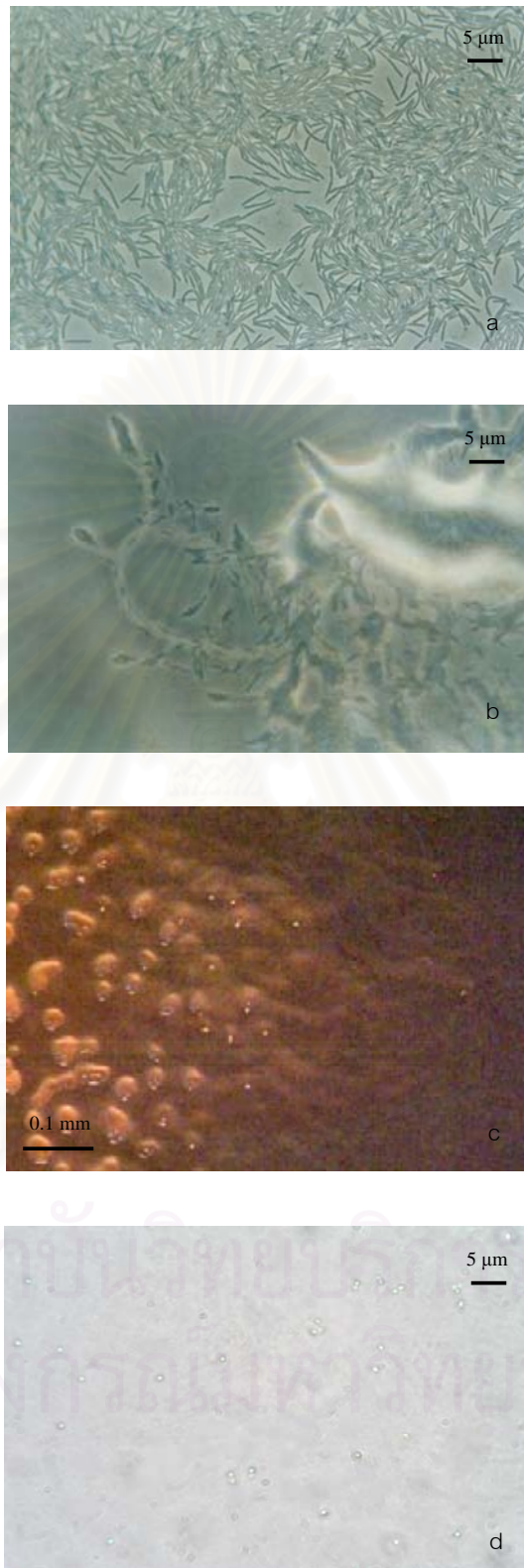
สายพันธุ์ ไกลดิงแบคทีเรีย	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ประเภท ไกลดิงแบคทีเรีย
CD1	โคโลนีสีส้ม ฟรุติติงบอดี้กลม	สร้าง FB*
MG1	โคโลนีสีขาวใส ผิวหน้าเรียบ บาง	ไม่สร้าง FB
TW2	โคโลนีสีเหลือง ขอบหยัก ผิวหน้าเป็นคลื่น หนา	ไม่สร้าง FB
RD2	โคโลนีสีส้ม ขอบขรุขระ	ไม่สร้าง FB
RD4	โคโลนีสีส้มออกน้ำตาล ฟรุติติงบอดี้ยาว หยัก เป็นคลื่น	สร้าง FB
SA4	โคโลนีสีเหลืองส้ม ผิวหน้าเรียบ บาง	ไม่สร้าง FB
SN5	โคโลนีสีขาวจนถึงน้ำตาล ผิวหน้า ขรุขระ ขอบหยัก หนา	ไม่สร้าง FB
CP1	โคโลนีสีส้ม ขอบเรียบ ผิวหน้า เรียบ บางเป็นชั้นๆ	ไม่สร้าง FB
SW1	โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก หนา	ไม่สร้าง FB
GR1	โคโลนีสีขาว เหลืองหรือส้ม ขอบเรียบ หนา	ไม่สร้าง FB

หมายเหตุ: * หมายถึง ฟรุติติงบอดี้ (Fruiting Body)

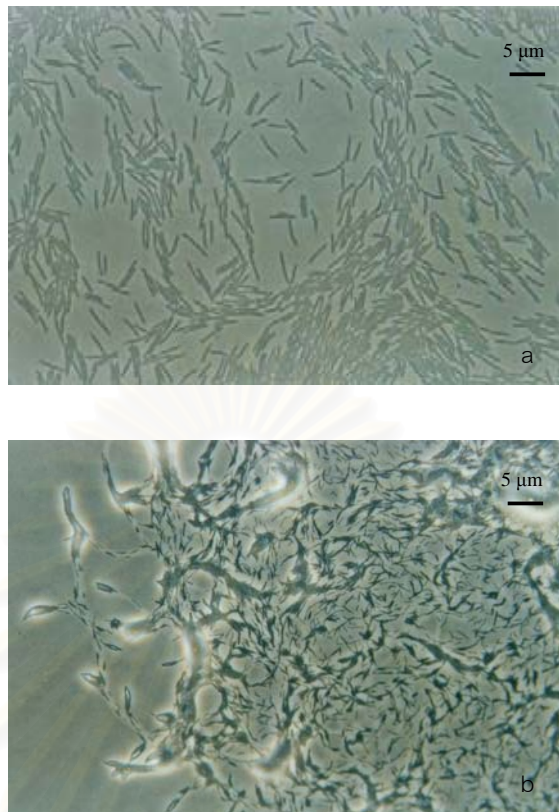
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของโกลดิงแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

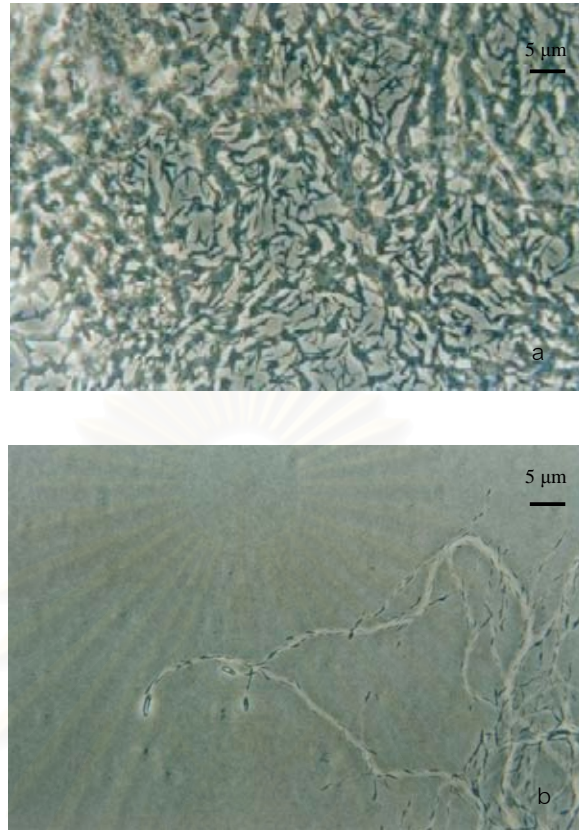


รูปที่ 4.2 ลักษณะ vegetative cell (1000 เท่า) (a) slime track (400 เท่า) (b) ฟรุติติงบอดี (80 เท่า) (c) และมิโครสปอร์ (1000 เท่า) (d) ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ CD1



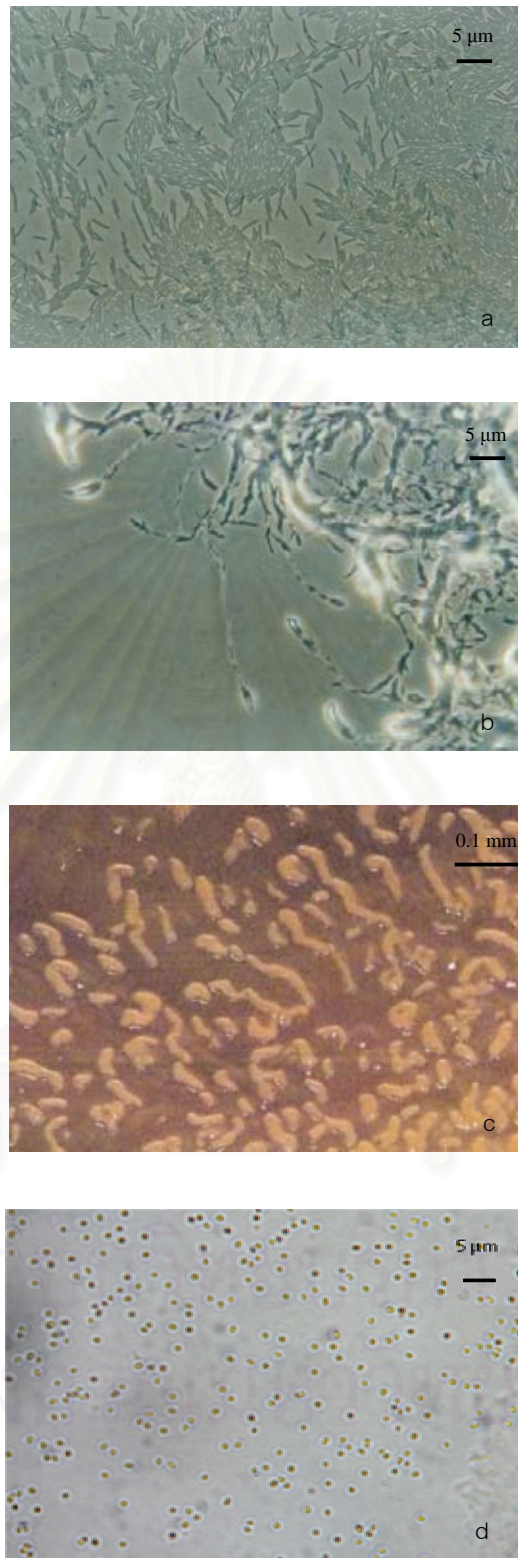
รูปที่ 4.3 ลักษณะ vegetative cell (1000 เท่า) (a) และ slime track (400 เท่า) (b) ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ TW2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

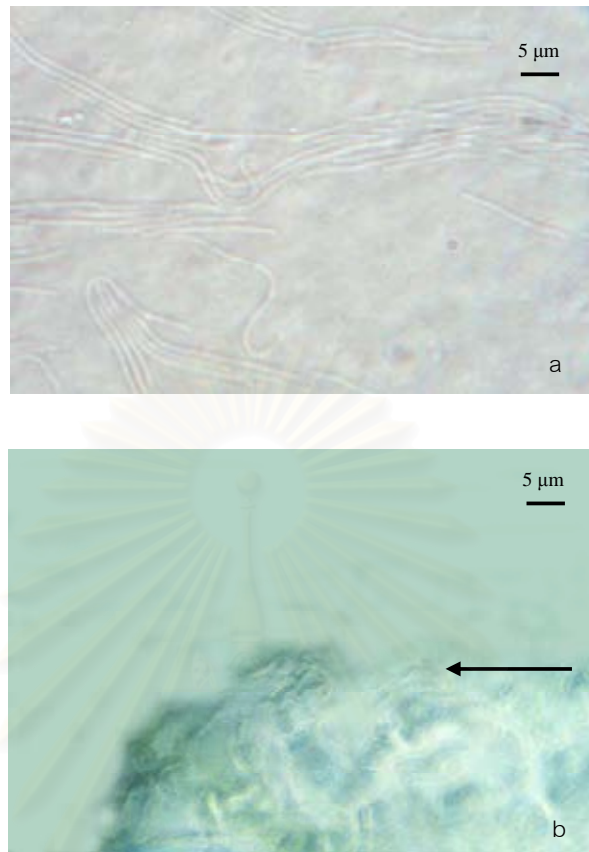


รูปที่ 4.4 ลักษณะ vegetative cell (400 เท่า) (a) และ slime track (200 เท่า) (b) ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

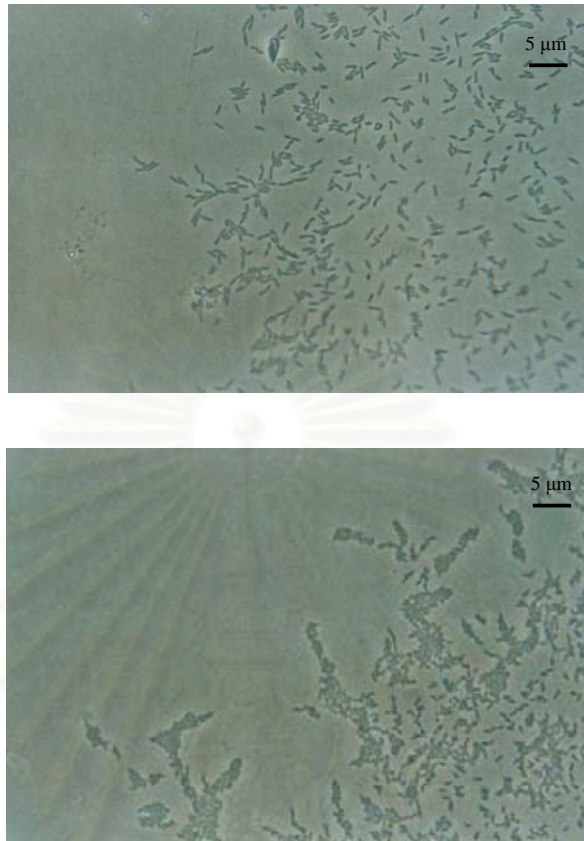


รูปที่ 4.5 ลักษณะ vegetative cell (1000 เท่า) (a) slime track (400 เท่า) (b) ฟรุติงบอดี (80 เท่า) (c) และมิโครสปอร์ (1000 เท่า) (d) ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4



รูปที่ 4.6 ลักษณะ vegetative cell (1000 เท่า) (a) และ slime track (400 เท่า) (b) ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ SN5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 ลักษณะ vegetative cell (1000 เท่า) (a) และ slime track (400 เท่า) (b) ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ CP1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากน้ำหมักและเซลล์ของโกลดิงแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์ โกลดิงแบคทีเรีย	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ					
	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>En.</i> <i>faecium</i>	<i>C.</i> <i>albicans</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>
MG1 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	-	-	-
DCM / C	-	-	-	-	-	-
DCM / B	-	-	-	-	-	-
TW2 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	-	-	-
DCM / C	-	-	-	-	-	-
DCM / B	+	+	++	+	-	-
RD2 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	-	-	-
DCM / C	-	-	-	-	-	-
DCM / B	++	++	-	-	-	-
RD4 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	-	-	+
DCM / C	-	-	-	-	-	-
DCM / B	+++	++	+	++	+	+
SA4 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	-	-	-
DCM / C	-	-	-	-	-	-
DCM / B	-	-	-	-	-	-
SN5 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	+	-	-
DCM / C	-	-	-	-	-	-
DCM / B	+	+	+	-	-	+
CP1 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	-	-	-
DCM / C	+	-	-	-	+	-
DCM / B	+	+	-	-	+	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดจากน้ำหมักและเซลล์ของโกลดิ้งแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์ โกลดิ้งแบคทีเรีย	ระดับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ					
	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>En.</i> <i>faecium</i>	<i>C.</i> <i>albicans</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>
SW1 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	-	-	-
DCM / C	-	-	-	-	-	-
DCM / B	-	-	-	-	-	-
CD1 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	-	-	-
DCM / C	-	-	-	-	-	-
DCM / B	+	+	+	-	+	-
GR1 Ace / C	-	-	-	-	-	-
Ace / B	-	-	-	-	-	-
DCM / C	-	-	-	-	-	-
DCM / B	-	-	-	-	-	-

+++ = Ø ของ Inhibition zone 19 - 24 มิลลิเมตร

++ = Ø ของ Inhibition zone 14 - 18 มิลลิเมตร

+ = Ø ของ Inhibition zone 9 - 13 มิลลิเมตร

- = ไม่แสดงการยับยั้ง

C = สารสกัดจากเซลล์

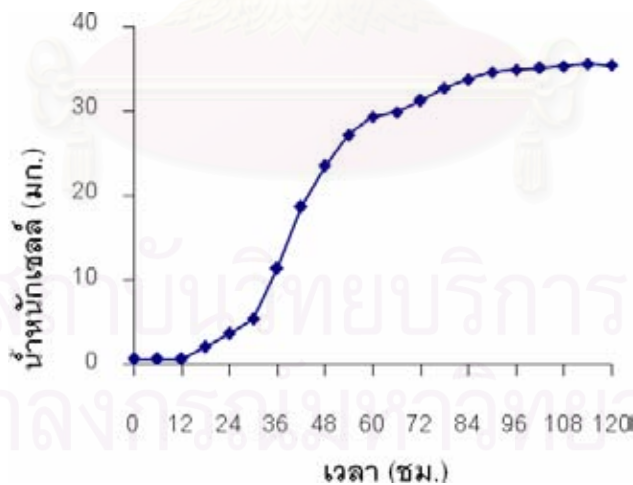
B = สารสกัดจากน้ำหมัก

Ace = สารสกัดที่ได้จากชั้นอะซีโตน

DCM = สารสกัดที่ได้จากชั้นไดคลอโรมีเทน

4.4 ศึกษาการเจริญของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4

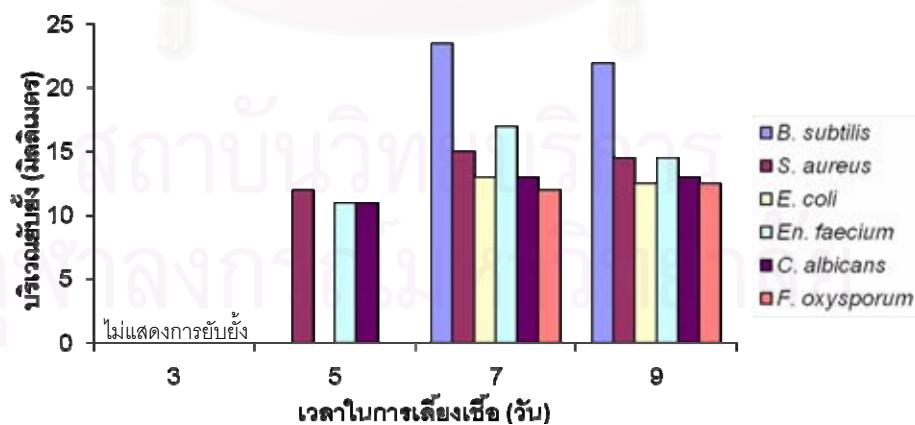
จากการคัดกรองไกลดิ้งแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำนวน 10 สายพันธุ์มาทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกับจุลินทรีย์ทดสอบในข้อ 4.3 พบว่าไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เป็นสายพันธุ์เดียวที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิดและส่วนใหญ่มีบริเวณยับยั้งกว้าง ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้มักถูกสร้างและหลั่งออกมาเมื่อเริ่มมีการเจริญคงที่หรืออยู่ในช่วง stationary phase การทดลองในขั้นนี้จึงศึกษาการเจริญของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เพื่อหาว่าเชื้อจะใช้เวลาเท่าใดในการเข้าสู่ stationary phase โดยศึกษาตามวิธีทดลองในหัวข้อ 3.7 พบว่าไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ใช้เวลา 12 ชั่วโมงแรกในการปรับตัวในอาหารใหม่ (lag phase) จากนั้นจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (log phase) ประมาณ ชั่วโมงที่ 48 (2 วัน) และมีเริ่มมีการเจริญคงที่ (stationary phase) เมื่อชั่วโมงที่ 102 จนถึงชั่วโมงที่ 120 (5 วัน) ดังรูปที่ 4.8 ไกลดิ้งแบคทีเรียบางชนิดจะมีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตั้งแต่ช่วงปลาย log phase ด้วย (Reichenbach, 2001) ดังนั้นการศึกษาขั้นต่อไปจะศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยจะใช้เวลาในการเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียเป็นเวลาตั้งแต่ 3 วันขึ้นไป ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์อยู่ในปลายระยะ log phase และกำลังเข้าสู่ stationary phase



รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4

4.5 ศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักชั้นไดคลอโรมีเทนเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

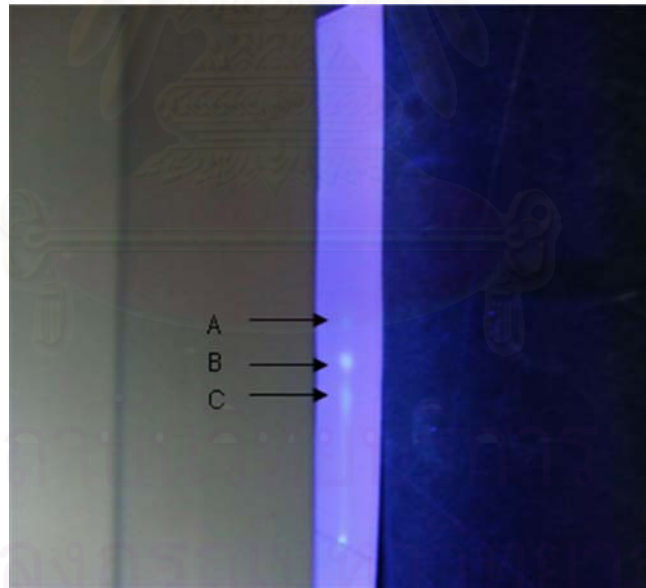
จากการเจริญของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เซลล์จะอยู่ในช่วงปลายของ log phase และเริ่มเข้าสู่ stationary phase การทดลองในขั้นนี้จึงทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเพื่อศึกษาว่าช่วงเวลาใดที่เซลล์สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดถ้าเซลล์เจริญอยู่ใน stationary phase เป็นระยะเวลานาน โดยเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียเป็นเวลา 3 ถึง 9 วัน ตามวิธีในข้อ 3.8 แล้วนำสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.3 พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อและความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อผลิตออกมา แสดงดังรูปที่ 4.9 สารสกัดจากน้ำหมักของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เริ่มออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* *En. faecium* และ *C. albicans* เมื่อเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งมีบริเวณการยับยั้งกว้างขึ้นในวันที่ 7 และจะคงที่หรือลดลงในวันที่ 9 ส่วน *B. subtilis* *E. coli* และ *F. oxysporum* จะถูกยับยั้งเมื่อเชื้อเจริญเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งมีการยับยั้งสูงสุด และค่าจะเปลี่ยนแปลงไม่มากนักเมื่อผ่านไป 9 วัน เช่นกัน โดยมีบริเวณการยับยั้งสูงที่สุดเมื่อทดสอบกับ *B. subtilis* ซึ่งวัดบริเวณใสได้เท่ากับ 23.5 มิลลิเมตร เนื่องจากประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดเมื่อเซลล์เจริญเป็นเวลา 7 วัน ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงควรเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด



รูปที่ 4.9 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

4.6 แยกสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคอลลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน การทดลองในขั้นนี้ จึงนำสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคอลลอโรมีเทนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ตามเวลาดังกล่าว มาทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี TLC ตามหัวข้อ 3.9 พบว่าอัตราส่วนของตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอลที่ทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพถูกแยกออกจากกันได้ดีที่สุด คือ 55%:22.5%:22.5% ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบแผ่น TLC ด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 356 นาโนเมตร จะปรากฏแถบของสารแยกออกมา 3 ตำแหน่งหลักๆ คือ A B และ C โดยมีความสามารถในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้แตกต่างกัน ซึ่งสาร A ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ทั้งสองความยาวคลื่น ได้แก่ 254 และ 356 นาโนเมตร มีค่า Rf เท่ากับ 0.42 ส่วนสาร B และ C ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 356 นาโนเมตร เท่านั้น มีค่า Rf เท่ากับ 0.33 และ 0.3 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 โคโรมาโทแกรมของสารสกัดจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ที่แยกด้วยวิธี TLC โดยแสดงค่า Rf ของแต่ละองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 356 นาโนเมตร

4.7 ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4 เมื่อทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC)

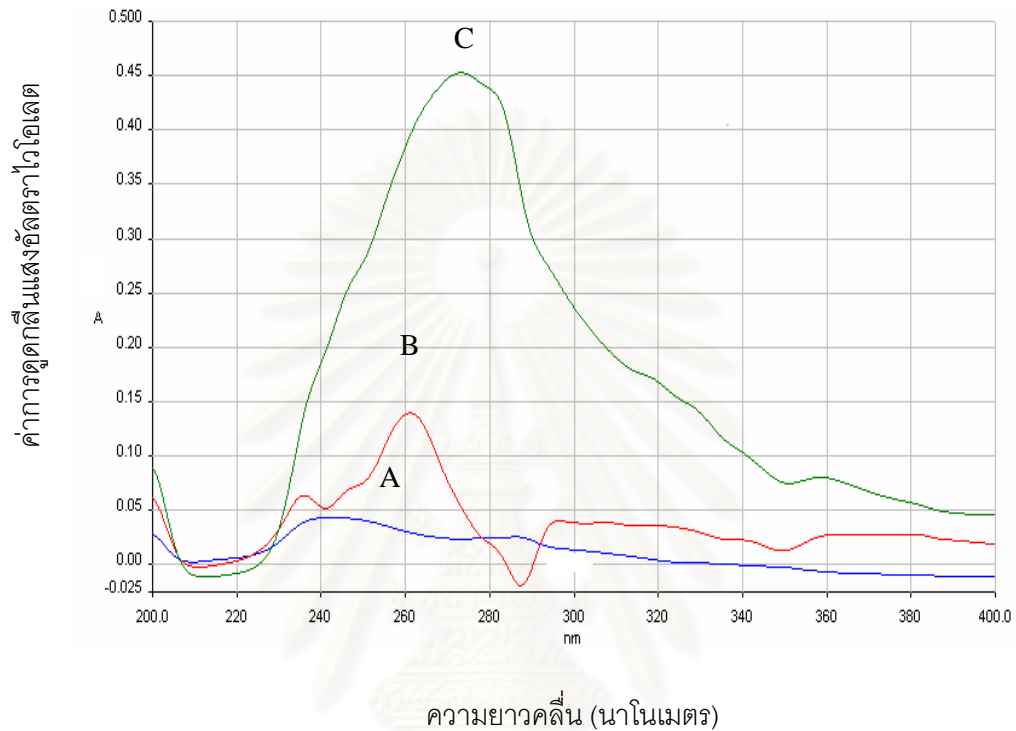
4.7.1 แยกสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4 โดยวิธี PTLC

จากการทดลองในข้อ 4.6 หลังจากทำสารให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี TLC แล้วจะได้สารในแต่ละองค์ประกอบในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์และการศึกษาอื่นๆ ในขั้นนี้จึงเพิ่มปริมาณสารสกัดในแต่ละองค์ประกอบเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไปว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ จึงเพิ่มปริมาณการเลี้ยงเชื้อให้มากขึ้น โดยเลี้ยงไกลดิ้งแบบที่เรียสายพันธุ์ RD4 ให้มีปริมาตร 5 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน ตามวิธีในข้อ 3.10 ซึ่งได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 62.51 กรัม และปริมาณสารทั้งหมด 462 มิลลิกรัม เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดตามวิธีในข้อ 3.6.4 พบว่าสารสกัดมีบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกับการศึกษาในขั้นต้น จึงนำสารสกัดมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี PTLC โดยใช้ระบบในการแยกสารเช่นเดียวกับวิธี TLC ในหัวข้อ 4.6 พบว่าเมื่อแยกสารสกัด A B และ C ออกจากกันแล้ว ตำแหน่งของสารแต่ละองค์ประกอบบนแผ่น PTLC ยังคงเหมือนเดิมเช่นเดียวกับวิธี TLC แต่สีของแต่ละองค์ประกอบหลังจากที่ใช้เมทานอลสกัดแยกสารออกมาจากแผ่น PTLC มีความแตกต่างกัน โดยสาร A B และ C มีสีเหลืองอ่อน สีฟ้าและสีเขียวตามลำดับ จึงนำสารแต่ละองค์ประกอบทั้ง A B และ C ไปวิเคราะห์สมบัติของสารโดยวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตเพื่อศึกษาต่อไป

4.7.2 การศึกษาการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยวิธี UV-VIS spectroscopy ของสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี PTLC

เมื่อนำสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี PTLC จากข้อ 4.7 ทั้งสาร A B และ C มาวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วย UV-VIS spectrophotometer ตามวิธี 3.11 ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.11 รูปดังกล่าวแสดงว่า สาร A มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตอยู่ในช่วงความยาวคลื่นกว้าง ไม่มีพีคชัดเจน (220-320 นาโนเมตร) และมีค่าสูงสุดที่ 242 นาโนเมตร สาร B ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ 3 ช่วง คือ 230-240 250-290 และ 290-400 นาโนเมตร มีค่าสูงสุดที่ 261 นาโนเมตร ส่วนสาร C มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 230-400 นาโนเมตร และมีค่าสูงสุดที่ 273 นาโนเมตร ซึ่งที่ความยาวคลื่น 273 ของสาร C นี้ ตรงกับสาร saramycetin ที่พบใน *Streptomyces* sp. เป็นสาร

ประเภท thiazol ที่มักพบในไกลดิ้งแบคทีเรีย สาร saramycetin นี้สามารถยับยั้งราได้ (Cooper และคณะ, 1990) จึงนำสารเหล่านี้ไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบต่อไปเพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง และมีสมบัติในการยับยั้งเหมือนเดิมหรือไม่

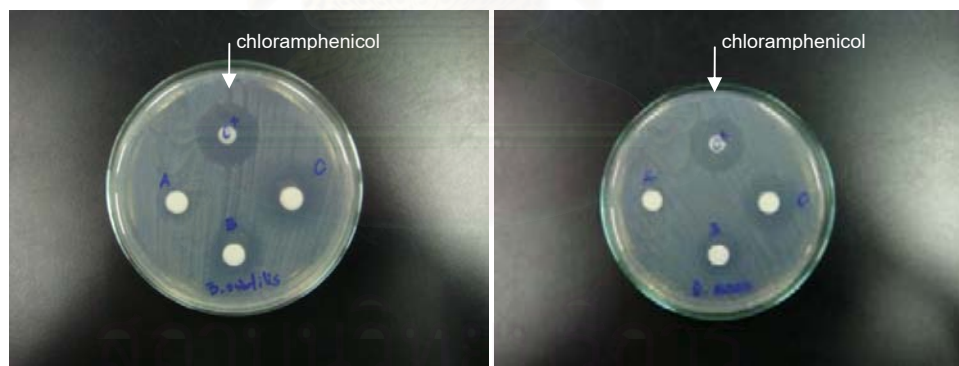


รูปที่ 4.11 โครมาโทแกรมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารสกัด A B และ C ที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.3 ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ที่ได้จากวิธี PTLC

จากการนำสารสกัด A B และ C ที่ได้จาก 4.7.1 มาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ ทั้ง 6 ชนิด ตามข้อ 3.6.4 ดังรูปที่ 4.12 พบว่า สาร A สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *B. subtilis* เท่านั้น โดยมีความกว้างของบริเวณใสเท่ากับ 15 มิลลิเมตร สาร B และ C สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกทั้งได้ทั้ง *B. subtilis* และ *S. aureus* โดยการยับยั้งจากสาร B มีความกว้างของบริเวณใสเท่ากับ 21 และ 18 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนสาร C จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์สูงที่สุด และมีบริเวณใสกว้างที่สุดเมื่อยับยั้ง *B. subtilis* โดยวัดได้เท่ากับ 25 และรองลงมา คือ *S. aureus* วัดได้เท่ากับ 23 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 ทั้งนี้เมื่อสารสกัดถูกแยกองค์ประกอบออกจากกันจะไม่พบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและรา ซึ่งเคยยับยั้งได้เมื่ออยู่ในรูปสารสกัดจากน้ำหมักก่อนทำการแยกสาร อย่างไรก็ตามแม้ว่าสาร A B และ C ที่ได้หลังจากแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากกันโดยวิธี PTLC จะมีจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งได้ลดลง แต่สาร C ก็มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้สูงสุด ซึ่ง *B. subtilis* มีความสำคัญในการก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ และ *S. aureus* ก่อให้เกิดโรคฝี หนอง และอาหารเป็นพิษได้ จึงนำสาร C ไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี HPLC ต่อไป



รูปที่ 4.12 แสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ *B. subtilis* และ *S. aureus* ของสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เมื่อแยกด้วยวิธี PTLC

ตารางที่ 4.4 การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบโดยสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี PTLC

ชนิดสารสกัด	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>En. faecium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>
A	15	-	-	-	-	-
B	21	18	-	-	-	-
C	25	24	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่แสดงการยับยั้ง

4.8 แยกสาร C จากสารสกัดน้ำหมักชั้นไดคลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี High Performance liquid Chromatography (HPLC)

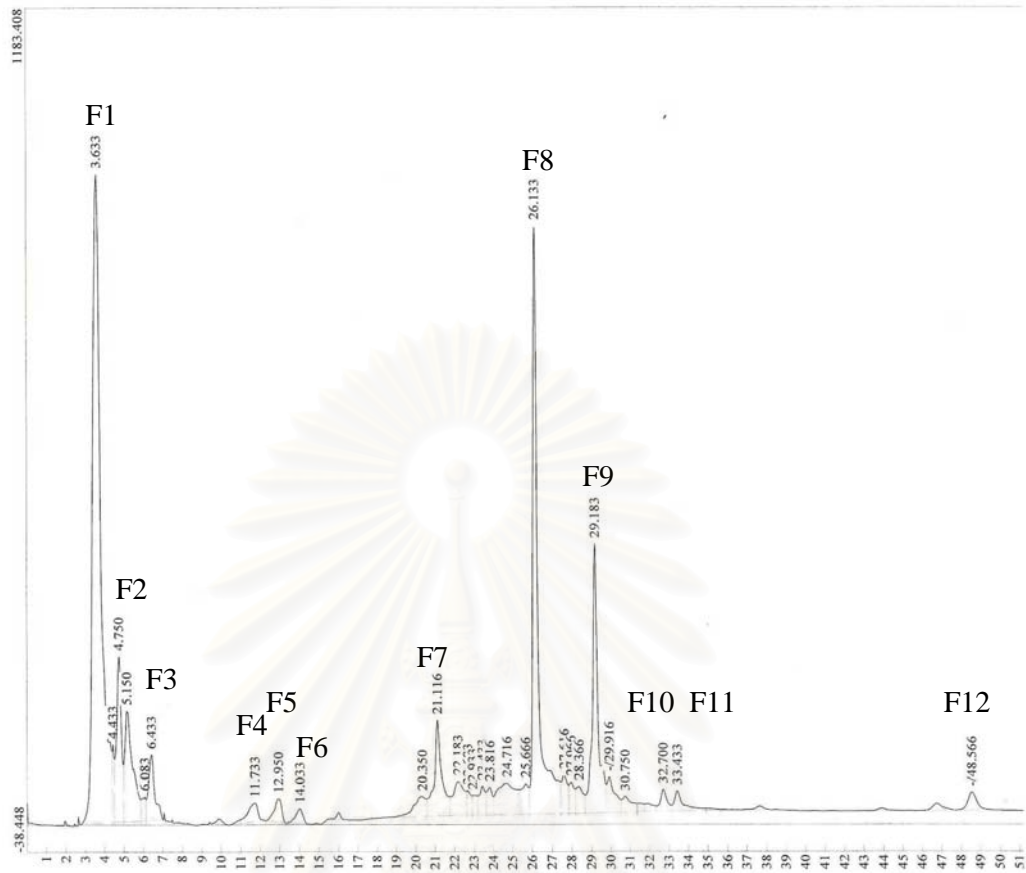
จากการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักในชั้นไดคลอโรมีเทน ที่สร้างจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 มาทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี PTLC ในข้อ 4.7 พบว่าสาร C ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบแกรมบวกได้สูงที่สุด และมีค่าดูดกลืนแสงตรงกับสาร saramycetin จาก *Streptomyces* sp. การศึกษาในขั้นนี้จึงนำสาร C มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Reverse Phase HPLC โดยใช้อัตราส่วนตัวชะสารตามวิธีในข้อ 3.12 พบว่าเมื่อเพิ่มเมทานอลตั้งแต่ 0 ถึง 100 % เป็นเวลา 100 นาที สารจะมีพีคติดกันเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งไม่สามารถเก็บสารได้ เมื่อปรับตัวทำละลายช่วง 20 นาทีแรกที่อัตราส่วนระหว่างเมทานอลและน้ำ DDW เท่ากับ 40% ต่อ 60% และนาทีที่ 21 ถึงนาทีที่ 40 เพิ่มเมทานอลจาก 60% จนถึง 100% จะทำให้สารแยกออกจากกันได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถเก็บสารที่ออกมาแต่ละช่วงเวลาได้จำนวน 12 พีค (F1-F12) ดังรูปที่ 4.13 เมื่อนำสารแต่ละพีคมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้ผลดังตารางที่ 4.5 การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบโดยสารสกัดเมื่อทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี HPLC แล้วให้ผลสอดคล้องกับข้อ 4.7.2 คือสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* และ *S. aureus* โดยพบบริเวณยับยั้ง *B. subtilis* จากสารพีคที่ 1 2 4 5 6 และ 7 (F1 F2 F4 F5 F6 และ F7) และพบบริเวณยับยั้ง *S. aureus* จากสารพีคที่ 1 2 4 และ 6 (F1 F2 F4 และ F6) ซึ่ง F5 จะมีการยับยั้งสูงที่สุด 13 มิลลิเมตร โดยยับยั้ง *B. subtilis* และ F6 ยับยั้ง *S. aureus* ได้สูงที่สุด คือ 12 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.5 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ C ที่ได้จากวิธี HPLC

ลำดับ สารสกัด	บริเวณยับยั้ง (มม.)					
	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>En.</i> <i>faecium</i>	<i>C.</i> <i>albicans</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>
F1	9.5	10	-	-	-	-
F2	11	10.5	-	-	-	-
F3	-	-	-	-	-	-
F4	11	10.5	-	-	-	-
F5	13	-	-	-	-	-
F6	11	12	-	-	-	-
F7	9.5	-	-	-	-	-
F8	-	-	-	-	-	-
F9	-	-	-	-	-	-
F10	-	-	-	-	-	-
F11	-	-	-	-	-	-
F12	-	-	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่แสดงการยับยั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

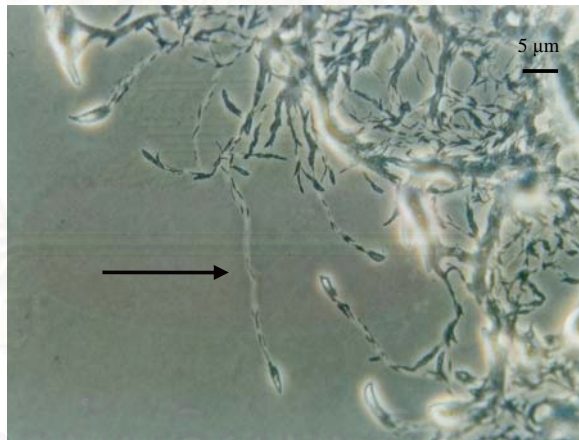


รูปที่ 4.13 โคโรนาโทแกรมการทำสารสกัด C จากน้ำหมักชั้นไดคลอโรมีเทนของไกลดิ้งแบบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี reverse phase HPLC อัตราส่วนระหว่างเมทานอลและน้ำ DDW เท่ากับ 40% ต่อ 60% และเวลาที่ 21 ถึงเวลาที่ 40 เพิ่มเมทานอลจาก 60% จนถึง 100%

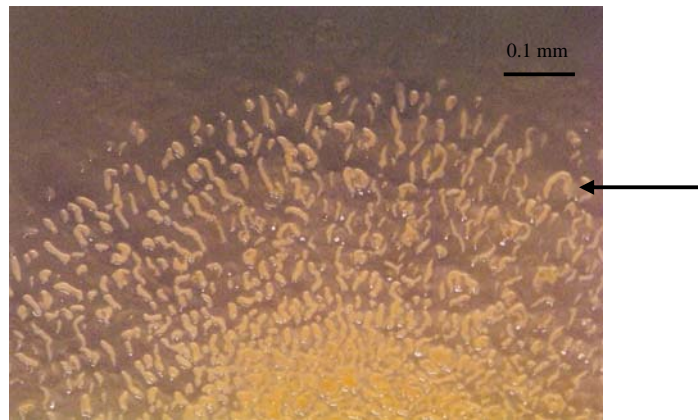
4.9 การจำแนกสายพันธุ์ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4

4.9.1 การจัดจำแนกไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 โดยการศึกษาพื้นฐานวิทยาของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4

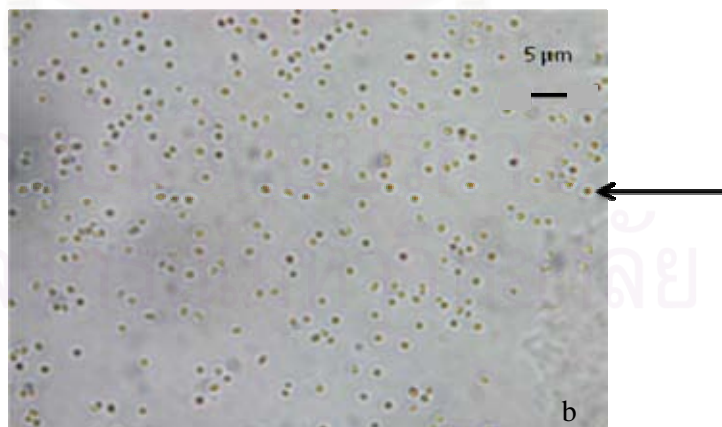
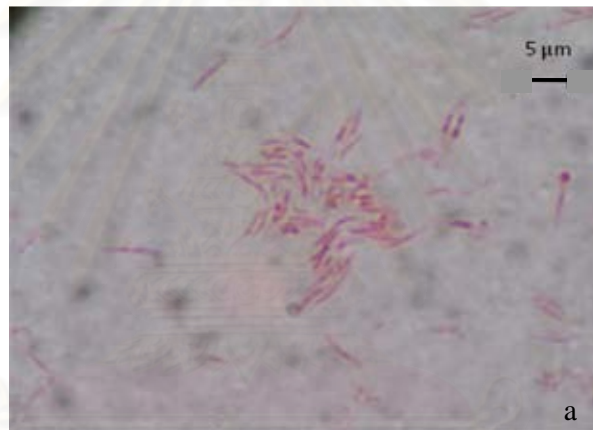
จากข้อ 3.13.1 เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Vy/2 agar ที่อุณหภูมิ 30°C ผลศึกษาการ slime track ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast พบว่าเซลล์มีการเคลื่อนที่ไปด้วยกัน โดยมีทิศทางแบบหัวเซลล์ติดกับท้ายเซลล์ (head-to-tail) ทำให้เห็นเป็นรอยทางของเมือก ดังรูปที่ 4.14 จากนั้นศึกษาสีและลักษณะของฟรูตติงบอดี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จะเห็นฟรูตติงบอดีสีส้ม มีลักษณะยาว โค้ง รูปร่างไม่แน่นอน (รูปที่ 4.15) ซึ่งสอดคล้องกับไกลดิ้งแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Corallococcus* sp. (Reichenbach และ Dworkin, 1982) การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยใช้เทคนิค slide culture จะพบลักษณะของเซลล์เจริญ (vegetative cell) มีรูปร่างยาว เรียว หัวและท้ายแหลม ติดสีแกรมลบ ดังรูปที่ 4.16 a และมิโกโซสปอร์ที่มีรูปร่างกลม ดังรูปที่ 4.16 b



รูปที่ 4.14 รอยจากการเคลื่อนที่ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 (บริเวณลูกศรชี้) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 4.15 พืชติงบอดีของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 (ตั้งลูกศรชี้) ภายใต้อ่างล้าง จุลทรรศน์แบบสเตอริโอ กำลังขยาย 80 เท่า



รูปที่ 4.16 เซลล์เจริญของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 (a) และลักษณะของมิโครสปอร์มี รูปร่างกลม (b) (ตั้งลูกศรชี้) กำลังขยาย 1,000 เท่า

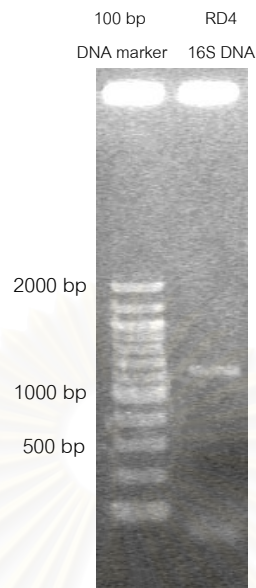
จากการจำแนกสกุลของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ตามวิธี 3.13.1 เมื่อศึกษาลักษณะเบื้องต้นเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 9 พบว่าไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 จัดอยู่ในสกุล *Corallococcus* เนื่องจากมีฟรูตติงบอดีหลากหลายรูปแบบตั้งแต่ ทรงกระบอก มีการแตกกิ่ง หรือ เป็นรูปเกลียวหยัก จากผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ที่แน่ชัดได้ จึงเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 กับ *Corallococcus* ที่อยู่ในสปีชีส์ต่างๆ ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 9 พบว่าไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Corallococcus coralloides* มากที่สุดดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 และ *Corallococcus* sp.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4	<i>Corallococcus coralloides</i>	<i>Corallococcus exiguus</i>	<i>Corallococcus macrosporus</i>
เส้นผ่านศูนย์กลางของมิกโรสปอร์ (µm)	1.4	1.3-1.9	1.5-1.8	1.8-2.5
สีของฟรูตติงบอดี	ส้ม แดงอิฐ	ขาว ชมพู แดงอิฐ	น้ำตาล	เหลืองส้ม
ฟรูตติงบอดีมีการเชื่อมต่อกัน	มี	มี	ไม่มี	มี
ประชากรของฟรูตติงบอดีบนอาหารแข็ง yeast agar	ค่อนข้างหนาแน่น	บางจนถึงหนาแน่น	หนาแน่นมาก	บางจนถึงหนาแน่น

4.9.2 การจัดจำแนกไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

เพื่อจำแนกสปีชีส์ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 อย่างแน่ชัดจึงได้ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (วิธี 3.13.2.1) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA (วิธี 3.13.2.3) เพื่อตรวจหาลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA โดยส่ง PCR product ของสายพันธุ์ RD4 (รูปที่ 4.17) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part ตามวิธี 3.13.2.4 พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA จำนวน 1,356 เบส



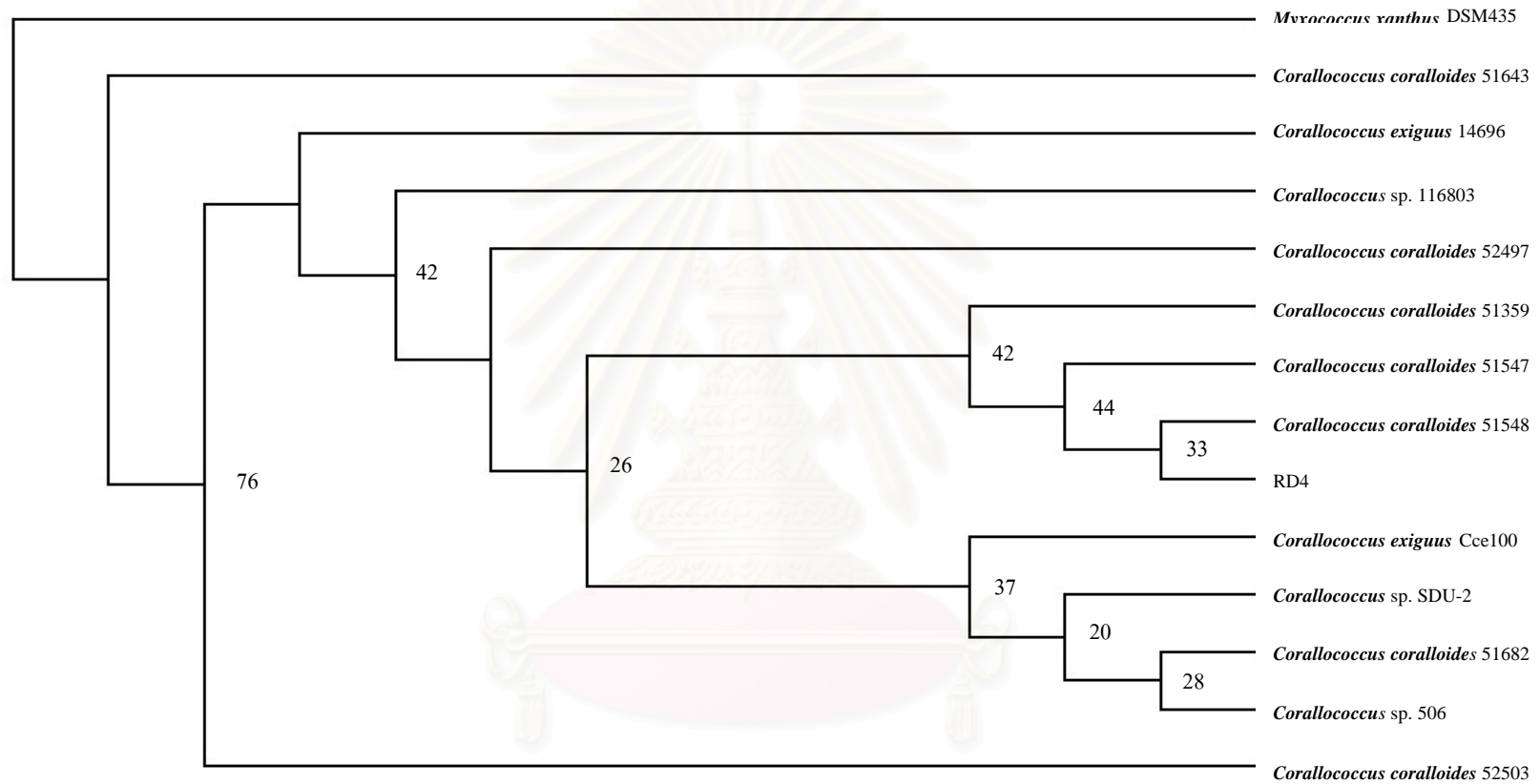
รูปที่ 4.17 PCR product ของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 จำนวน 1,356 เบส ดังรูปที่ 4.18 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่บันทึกและรวบรวมไว้ใน GeneBank DNA database ตามวิธี 3.13.2.4 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 (1,356 เบส) มีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Corallococcus* sp. 506 เท่ากับ 100% (1,457 เบส) (Mociardini และคณะ, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาก่อนหน้านี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 มีความคล้ายคลึงกับไกลดิงแบคทีเรียในสกุล *Corallococcus* 98-100% ดังแสดงในตารางที่ 4.7

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RD4 และแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกไว้จากตารางที่ 4.7 มาทำการปรับแนวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal X ตามวิธีในหัวข้อ 3.13.2.5 นำข้อมูลที่ผ่านมาการปรับแนวมาสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในรูปที่ 4.19 แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์บริสุทธิ์ RD4 จำแนกอยู่ในสกุล *Corallococcus*

GAGATGACTTCTGGAGCAATCGACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC
 CCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGCCTTCA
 TGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCTGAACTGAGACCGGTTTTCTGCGATTAGCTCCC
 CCTCGCGGGTTTTGCAGCGCTCTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTC
 ATAAAGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTAACACCGGCAG
 TCCCTCTAGAGATCCACTTGCGTGGCAACTAAAGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGG
 ACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCTC
 GGTTCCCTTGCGGGCACTCCCTCATCTCTGAAGGATTCCGAGGATGTCAAGACCAGG
 TAAGTTCTGCGCGTTGCGTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC
 CCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGTCTTGCGACCGTACTTCCCAGGCGGAGAACTTAATG
 CGTTAGCTACGGCACCGCGGGGTCAACTCCCACGACACCTAGTTCTCATCGTTTAC
 GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGCGTCTCAGCG
 TCAGTTACCGTCCAGGTGGCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCCATATCTACGAAT
 TTCACCTCTACTTGGGGAATTCCGCCACCCTCTCCGGCACTCAAGCTCTGCAGTTTCG
 GGCGCACTTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACACCCGACTTGCAAAGCCGCCTAC
 ACGCGCTTACGCCCAATAATTCCGAACAACGTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCT
 GCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTCCCGGTACCGTCAAGGCAAAGCGTATT
 AGGCTTACGGTTTCGTCCCGGTGCGAAAGTGCTTACAATCAAAGACCTTCATCACA
 CACGCGGCGTTGCTGCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGCAAAATTCGCCACTGCTGCC
 TCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCGTCTCTCAGAC
 CAGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGGGCCATTACCCCGCCAAGTACTAGCTGATGGGCCG
 CGGACTCATCTGGTTGTGATAGCTTGTATACAGAGGCCACCTTTCCCTCAGTCTCCG
 AAGAGACCGTGGGCTTATCCGGTATTAGCCAATCTTTCGACTGGTTATCCCAGGCATC
 CAGGCAGATTATCCACGTGTTACGCACCCGTGCGCCGCTCTACTAA

รูปที่ 4.18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของไกลดิ้งแบคทีเรียสาย
 พันธุ์ RD4



รูปที่ 4.19 phylogenetic tree ของ 16S rDNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 สกุล *Corallococcus* จำนวน 13 สายพันธุ์ โดยใช้ 16S rDNA ของ *Myxococcus xanthus* สายพันธุ์ DSM435 เป็น out-group (Stackebrandt and Pauker, 2005) และตัวเลขที่กิ่งสาขาแสดงถึงการนับที่ให้ผลซ้ำจากทั้งหมด 100 ครั้ง ด้วย bootstrap

ตารางที่ 4.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล (BLASTn)

ลำดับที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	Accession no.	Sequencing Identity (%)	เอกสารอ้างอิง
1	<i>Corallocooccus</i> sp. 506	AM489539	1457 bp / 100	Monciardini และคณะ, 2008
2	<i>Corallocooccus</i> sp. SDU-2	AY996785	1532 bp / 100	Wu และคณะ, 2005
3	<i>Corallocooccus exiguus</i> Cce100	AJ233932	1522 bp / 100	Sproer และคณะ, 1999
4	<i>Corallocooccus coralloides</i> DSM51682	AJ811596	1508 bp / 100	Swiderski, 2004
5	<i>Corallocooccus coralloides</i> DSM51548	AJ811593	1522 bp / 100	Swiderski, 2004
6	<i>Corallocooccus coralloides</i> DSM51547	AJ811592	1521 bp / 100	Swiderski, 2004
7	<i>Corallocooccus coralloides</i> DSM51359	AJ811579	1520 bp / 99	Swiderski, 2004
8	<i>Corallocooccus coralloides</i> DSM52497	AJ811597	1524 bp / 99	Swiderski, 2004
9	<i>Corallocooccus exiguus</i> DSM14696	DQ768121	1493 bp / 99	Park และคณะ, 2006
10	<i>Corallocooccus</i> sp. 116803	AM489538	1460 bp / 99	Monciardini และคณะ, 2008
11	<i>Corallocooccus coralloides</i> DSM51643	AJ811611	1517 bp / 98	Swiderski, 2004
12	<i>Corallocooccus coralloides</i> DSM52503	AJ811605	1524 bp / 98	Swiderski, 2004

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกไกลดิงแบคทีเรียจากแหล่งต่างในธรรมชาติ ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งไม่รวมถึงการยับยั้งอันเนื่องมาจากเอนไซม์และการกินจุลินทรีย์ จัดจำแนกกลุ่มและระบุสายพันธุ์ของไกลดิงแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของไกลดิงแบคทีเรียที่คัดเลือก

จากการคัดแยกไกลดิงแบคทีเรียจากตัวอย่างต่างๆ ได้แก่ ดิน น้ำ ปุ๋ย ชากพืชที่กำลังย่อยสลาย วัตถุในทะเล รวมทั้งมูลสัตว์ จำนวน 80 ตัวอย่าง จาก 17 จังหวัดในประเทศไทย สามารถแยกไกลดิงแบคทีเรียได้ทั้งหมด 52 สายพันธุ์ เป็นชนิดที่ไม่สร้างฟลูตติงบอดี 49 สายพันธุ์ และชนิดที่สร้างฟลูตติงบอดี (มิโซแบคทีเรีย) 3 สายพันธุ์ โดยมีเพียง 10 สายพันธุ์ เท่านั้นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เมื่อนำไกลดิงแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ นี้มาทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยการสกัดน้ำหมักและเซลล์ โดยก่อนหน้านี้ได้ให้น้ำหมักที่ยังไม่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายมาทดสอบ ซึ่งไม่พบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเลย เมื่อสกัดน้ำหมักและเซลล์ของไกลดิงแบคทีเรีย พบว่ามีไกลดิงแบคทีเรียเพียง 6 สายพันธุ์ เท่านั้นที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ ไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ TW2 RD2 RD4 SN5 CP1 และ CD1 โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่เป็นสารที่ไกลดิงแบคทีเรียขับออกมาออกเซลล์และเป็นสารไม่มีขั้วหรือมีความเป็นขั้วต่ำ เนื่องจากพบในชั้นโคคลอโรมีเทน มีเพียง RD4 และ SN5 เท่านั้นที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้วเนื่องจากพบในชั้นน้ำและอะซีโตน ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้วที่สร้างจากไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง *F. oxysporum* และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีขั้วที่สร้างจากไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ SN5 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง *En. faecium* ได้ ส่วนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากเซลล์จะพบในไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ CP1 เท่านั้น ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* และ *E. coli* ได้ ไกลดิงแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์นี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบและรา เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อสารปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งล้อมรอบเพปติโดไกลแคนไว้ ซึ่งทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นสารเคมีและเอนไซม์จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ (Reichenbach, 1993)

อย่างไรก็ตามไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เป็นสายพันธุ์เดียวที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา (Broad spectrum) จึง

นำโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 มาศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป ทั้งนี้เมื่อสกัดน้ำหมักและเซลล์ด้วยตัวทำละลายแล้ว สามารถพบการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากการใช้ตัวทำละลายในการสกัดจะทำให้สารสกัดมีความบริสุทธิ์และมีความเข้มข้นมากกว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักที่ไม่ได้ผ่านการสกัด

เมื่อนำโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 มาศึกษาการเจริญเพื่อหาระยะเวลาในการเข้าสู่ stationary phase ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เชื้อจะมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิพบว่าเชื้อเจริญเข้าสู่ stationary phase ตั้งแต่ 102 ชั่วโมง จนถึง 120 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามมีโกลดิงแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ตั้งแต่ปลาย log phase (Reichenbach, 2001) ในขั้นต่อไปจึงเลือกเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงวันที่ 9 ซึ่งสามารถพบฤทธิ์ของสารสกัดตั้งแต่เชื้อเจริญได้ 5 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้ออยู่ใน stationary phase แล้ว อย่างไรก็ตามจะพบฤทธิ์ของสารสกัดสูงที่สุดเมื่อเชื้อเจริญได้ 7 วัน อาจเป็นเพราะเมื่อเชื้อเจริญได้ 9 วัน ปริมาณของเสียจากเซลล์ถูกขับออกมามากขึ้น ทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเสียสภาพไปได้ โกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ที่เจริญเป็นเวลา 7 วัน จึงสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสูงสุด

เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำหมักชั้นไดคอลลอโรมีเทนของโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทุกชนิดที่ 30 ไมโครกรัม/disc 8 มิลลิเมตร และยับยั้งราทดสอบทุกชนิดที่ 50 มิลลิกรัม/disc 8 มิลลิเมตร จึงนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนนี้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธี TLC และ PTLC สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 3 ชนิดหลักๆ ได้แก่ สาร A สาร B และสาร C ซึ่งพบว่าเมื่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพถูกแยกออกจากกันจะมีสีของสารแตกต่างกัน จึงนำไปวิเคราะห์การดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตหลายช่วง เมื่อนำมาทดสอบสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่าการออกฤทธิ์ของสารยังเปลี่ยนไป โดยไม่พบการยับยั้ง *E. coli* *En. faecium* *C. albicans* และ *F. oxysporum* เลย มีเพียง *B. subtilis* และ *S. aureus* เท่านั้นที่ถูกระงับโดยสาร B และสาร C ได้ การที่ฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง ทำให้สันนิษฐานได้ว่าก่อนทำการแยกสารด้วย PTLC สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่ประกอบด้วยโครงสร้างย่อยหลายหน่วย เมื่อผ่านตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้แยกสาร ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล อาจทำให้โครงสร้างของโมเลกุลเดิมที่มีขนาดใหญ่แตกออกจากกัน จึงขาดหมู่ต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยา หรือจำเป็นในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ การยับยั้งจึงลดลง กรณีคล้ายกันนี้พบในรายงานของยูวดี (2546) ซึ่งได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอกติโนมัยซีส พบว่าสารสกัดจากน้ำหมักสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา แต่เมื่อนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี PTLC ได้สารทั้งหมด 1 ชนิด ซึ่งไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบใดได้เลย

อย่างไรก็ตามจากการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 โดยวิธี PTLC สาร C สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ โดยยับยั้ง *B. subtilis* ได้สูงสุด ซึ่ง *B. subtilis* มีความสำคัญทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ และยับยั้ง *S. aureus* รองลงมา ซึ่ง *S. aureus* เป็นจุลินทรีย์สำคัญในการก่อให้เกิดฝี หนอง และ อาหารเป็นพิษ (Kundim และคณะ, 2004) จึงนำสาร C มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอีกโดยวิธี HPLC เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบจากสาร C ที่บริสุทธิ์แล้วยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบหรือไม่ จากผลการศึกษาได้สารออกมาจำนวน 12 สาร ซึ่งมีเพียง F1 F2 F4 และ F6 เท่านั้นที่ยับยั้ง *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ ส่วน *E. coli* *En. faecium* *C. albicans* และ *F. oxysporum* ไม่พบการยับยั้งและอาจมีสาเหตุเช่นเดียวกับการแยกสารโดยวิธี PTLC ที่ได้กล่าวไว้ ข้างต้น ซึ่งมีรายงานว่าสารที่สร้างจากไกลดิ้งแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่ ได้แก่ สารกลุ่ม macrolides polyenes และ aromatics เป็นต้น ส่วนสารที่เป็น peptides เล็กๆ สามารถพบได้น้อย (Reichenbach และคณะ, 1988) ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ไม่น่าจะเป็น peptides เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้นำสาร A สาร B และสาร C ไปทดสอบกับ ninhydrin (Boudjella และคณะ, 2005) ซึ่งใช้ในการทดสอบหมู่ อะมิโน โดยใช้ BSA เป็นตัวควบคุมบวก พบว่า สาร A สาร B และสาร C ไม่เกิดสีกับ ninhydrin เลย

ในการจำแนกสายพันธุ์ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *Corallococcus coralloides* (Reichenbach และ Dworkin, 1982) อย่างไรก็ตามการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 นำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่รวบรวมไว้ใน GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 มีความเหมือน (%identity) กับ *Corallococcus* sp. 506 เท่ากับ 100% ซึ่งเคยมีรายงานการจำแนกไว้ว่าถูกคัดแยกมาจากดินในประเทศอิตาลี (Mociardini และคณะ, 2008) แสดงให้เห็นว่าไกลดิ้งแบคทีเรียโดยเฉพาะฟรุตติงไกลดิ้งแบคทีเรีย สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย เนื่องจากการสร้างฟรุตติงบอดีจะช่วยทำให้เซลล์ทนต่อภาวะกดดันต่างๆ ได้ จึงทำให้ฟรุตติงไกลดิ้งแบคทีเรียมีการกระจายตัวของประชากรได้ดี (Li และคณะ, 2002) จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 มีความคล้ายคลึงกับไกลดิ้งแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Corallococcus* 98-100% อย่างไรก็ตามความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกมาวิเคราะห์ไม่เท่ากัน จึงไม่สามารถบอกถึงสปีชีส์ของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ได้แน่ชัด

จากงานวิจัยนี้แม้ว่าสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 จะเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเกิดจากความไม่เสถียรของสารอันเนื่องมาจาก การทำสารให้บริสุทธิ์ไม่

ว่าจะโดยวิธี PTLC หรือ HPLC ก็ตาม แต่งานวิจัยนี้สามารถบอกได้ถึงส่วนที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ คือ F1 F2 F4 และ F6 และจากรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ *Corallococcus* sp. ที่ผ่านมาพบว่ามีน้อยมากเช่น สาร corallopyronin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Reichenbach และ Hofle, 1993) เช่นเดียวกับโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 และในรายงานของ Gaspari และคณะ (2005) ที่คัดแยก *Corallococcus* sp. ได้ทั้งหมด 17 สายพันธุ์นั้น ไม่พบว่ายับยั้ง *S. aureus* En. faecium และ *C. albicans* เลย แต่พบในโกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 งานวิจัยนี้จึงได้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวไว้ข้างต้นแล้ว



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงระยะเวลาและวิธีในการเก็บสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพว่ามีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบหรือไม่
2. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และการให้อากาศ เพื่อให้เหมาะสมกับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้มีปริมาณมากได้
3. ควรศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่คัดเลือกได้นอกจาก 10 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาศึกษา
4. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี HPLC ควรจะนำมาแต่ละส่วนมารวมกันเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์
5. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี PTLC ควรจะนำบริเวณที่หยดสารมาตรวจสอบมาตรฐานตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย เนื่องจากส่วนที่ไม่ได้ถูกแยกออกมาอาจเป็นส่วนที่มีฤทธิ์ได้
6. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 ที่บริสุทธิ์แล้ว ควรนำไปศึกษาต่อว่าเป็นสารกลุ่มใด โดยการใช้ infrared spectrophotometry เพื่อตรวจสอบหมู่ฟังก์ชัน
7. ควรทดสอบความเสถียรของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพก่อนการทำให้บริสุทธิ์เพื่อป้องกันการถูกทำลายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์
8. จากไกลดิ้งแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 52 สายพันธุ์ น่าจะนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ทั้งหมด แล้วทำการจัดกลุ่มเพื่อศึกษาว่า ในตัวอย่างประเภทใดที่พบไกลดิ้งแบคทีเรียสปีชีส์ใดมากหรือน้อย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จรัสโฉม ทองเหลือง. 2540. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะของ *Myxococcus virescens* และ *Myxococcus macrosporus*. วิทยานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 10-21.
- ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ:โอเดียนสโตร์. หน้า 34-41.
- ยุวดี มหาศักดิ์สิริ. 2546. การแยกแอกติโนมัยซีดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจากดินร่วนปนในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 134-135.

ภาษาอังกฤษ

- Achenbach-Richter, L., Gupta, R., Stetter, K. O. and Woese, C. R. 1987, Were the original eubacteria thermophiles. Syst. Appl. Microbiol. 9: 34–39.
- Alfred, M. S. 1999. Gliding motility in bacteria: Insights from studies of *Myxococcus xanthus*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 621-641.
- Ausubel, F.M., Brent, R.E., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. 1999. Current protocol in molecular biology. New York. John Wiley and Sons.
- Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrini, A., and Sabaou, N. 2005. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. Microbiological Research. 161:288-298.
- Brock, D. 1997. Biology of Microorganism (8th edition). New Jersey. Prentice Hall, p. 689-696.
- Brockman, E. R. 1970. Isolation and distribution of fruiting myxobacteria in Atlantic coastbeaches. Bacteriology Proceedings. 27:211.
- Burchard, R. P. 1982. Trail following by gliding bacteria. Journal of Bacteriology. 152:495-501.

- Carol, A. K. and Peggy, L. C. 1997. Antifungal agents in the 1990s:current status and future developments. Drugs. 53:539-549.
- Castenholz, R.W. 1989. Genus *Chloroflexus* , In: Bergey's manual of systematic bacteriology:Stanley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. & Holt, J.G. (eds). Baltimore 3. Williams & Wilkins, p. 1698-1702.
- Chambers, H. F. 1998. Chloramphenicol, tetracyclines, macrolides, clindamycin, and strptogramins, In:Basic and clinical pharmacology, 7th edition:Katsung, B. G. (eds). New Jersey. Prentice Hall, p. 752-760.
- Chambers, H. F. and Sande, M. A. 1996. The aminoglycosides, In:Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 9th edition:Hardman, J. G. and Limbird, L. E. (eds). New York. McGraw Hill, p. 1103-1122.
- Chiang, Y., Yang, C., Lic, C., Ho, Y., Chien-Ku Lin, C., and Tsen, H. 2006. Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Sa monella* spp., *Staphylococcus* spp. and *vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. International Journal of Food Microbiology. 107:131-137.
- Connor, D. T., Greenough, R. C., and Strandtmann, M. 1977. A unique antifungal antibiotic Journal of Organic Chemistry. 42:3664-3669.
- Dawid, W. 2000. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. FEMS Microbiology Reviews. 24:403-427.
- Demain, A. J. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Applied. Microbiology. Biotechnology. 52:455-463.
- Dworkin, M. 1973. The Myxobacterales (fruiting) myxobacteria, In:Organismic Microbiology:Laskin, A. I. and Lechevalier, H. A. (eds). Ohio. CRC Press, p. 191-202.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies:an approach using the bootstrap. Evolution. 39:783-791.
- Gaspari, F., Paitan, Y., Mainini, M., Losi, D., Ron, E. Z., and Marinelli, F. 2005. Myxobacteria isolated in Israel as potential source of new anti-infectives. Journal of Applied Microbiology. 98:429-439.
- Hillesland, K. L. and Velicer, G. J. 2005. Resource level affects relative performance of the two *Myxococcus xanthus* motility systems. Microbial Ecology. 49: 558-66. .

- Hodgkin, J. and Kaiser, D. 1979. Genetic of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (myxobacterales):two gene systems control movement. Molecular General Genetic. 171:177-191.
- Jansen, R., Washausen, P., Kunze, B., Reichenbach, H., and Hofle, G. 1999. Antibiotics from gliding bacteria, LXXXIII the crocacins, novel antifungal and cytotoxic antibiotics from *Chondromyces crocatus* and *Chondromyces pediculatus* (myxobacteria):isolation and structure elucidation. European Journal of Organic Chemistry. 1085-1089.
- Kaiser, D. 1979. Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. Proceeding Natural Academic Sciences. 76:5952-5956.
- Kapusnik-Uner, J. E., Sande, M. A., and Chambers, H. F. 1996. Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. In: Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edition:Hardman, J. G. and Limbird, L. E. (eds). New York. McGraw Hill, p. 1123-1154.
- Kleinig, H., Reichenbach, H., Achenbach, H., and Stadler, J. 1971. Carotenoid pigments of *Sorangium compotisum* (myxobacterales) including two new carotenoid glycoside esters and two new carotenoid rhamnosides. Archive for Microbiology. 78:224-233.
- Kundim, B. A., Itou, U., Sakagami, Y., Fudou, R., Shigeru, Y., and Ojika, M. 2004. Novel antifungal polyene amides from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*:isolation, antifungal activity and absolute structure determination. Tetrahedron. 60:10217-10221.
- Lapidus, I. R., and Berg H. C. 1982. Gliding motility of *Cytophaga* sp. strain U67. Journal of Bacteriology. 151:384-398.
- Li, Y. Z., Hu, W., Zhang, Y. Q., Qiu, Z. J., Zhang, Y. and Wu, B. H. 2002. A simple method to isolate salt-tolerant myxobacteria from marine samples. Journal of Microbiological Methods. 50:205-209.
- McBride, M. J. 2001. Bacterial gliding motility:multiple mechanisms for cell movement over surface. Annual Review Microbiology. 55:49-75.

- McBride, M. J., Braun, T. F., and Brust, J. L. 2003. *Flavobacterium johnsoniae* GldH is a lipoprotein that is required for gliding motility and chitin utilization. Journal of Bacteriology. 185:6648-6657.
- Morikawa, Y., Takayama, S., Fudo, R., Yamanaka, S., Mori, K., and Isogai, A. 1998. Absolute chemical structure of the myxobacterial pheromone of *Stigmatella aurantiaca* that induces the formation of its fruiting body. FEMS Microbiology Letter. 165:29-34.
- Noren, B. and Odham, G. 1973. Antagonistic effects of *Myxococcus xanthus* on fungi: II. isolation and characterization of inhibitory lipid factors. Lipids. 8:573-583.
- Oxford, A. 1947. Observations Concerning the Growth and Metabolic Activities of Myxococci in a Simple Protein-free Liquid Medium. Journal of Bacteriology. 53:129-138.
- Reichenbach, H. 2001. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 27:149-156.
- Reichenbach, H., and Dworkin, M. 1982. The order Myxobacteriales, In:Starr, M. P. (eds). The Prokaryotes. New York. Springer-Verlag, p. 328-355.
- Reichenbach, H., and Dworkin, M. 1992. The myxobacteria, In:The Prokaryotes :Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. (eds). New York. Springer-Verlag, p. 3416-3487.
- Reichenbach, H., Gerth, K., Irschik, H., Kunze, B., and Hofle, G. 1988. Myxobacteria:a source of new antibiotics. Tibtech. 6:115-121.
- Reichenbach, H. and Hofle, G. 1999. Myxobacteria as producers of secondary metabolites, In:Drug discovery from nature:Grabley, S. and Thiericke, R. (eds). Berlin . Springer, p. 149-179.
- Reichenbach, H., Kleinig, H. 1984. In:Myxobacteria, development and cell interactions:Rosenberg, E. (eds). New York. Springer-Verlag, p. 127-137.
- Rhee, K. H. 2004. Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and anti-mutagenic properties. International Journal of Antimicrobial Agents. 24:423-427.

- Rosenfelder, G., Luderitz, O., and Westphal, O. 1974. Composition of lipopolysaccharides from *Myxococcus fulvus* and other fruiting and non-fruiting gliding bacteria. European Journal of Biochemistry. 44:411-420.
- Siddiqui, A. M. and Burchard, R. P. 2001. An undulating surface model for the motility of bacteria gliding on a layer of non-newtonian slime. International Journal of Non-Linear Mech. 36:743-761.
- Sly, L. I. and Arunpairojana, V. 1987. Isolation of Manganese-oxidizing Pedomicrobium culture from water by micromanipulation, Journal of Microbiological Methods. 6:177-182
- Stackebrandt, E. and Pauker, O. 2005. Gene sequence heterogeneity of *Corallococcus coralloides* strain isolated from geographically diverse locations. Environmental Microbiology. 7:1017-1023.
- Sneader, W., 2005. Drug discovery a history. John Wiley and Sons, Ltd. UK.
- Sproer, C., Reichenbach, H., and Stackebrandt, E. 1999. The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria International Journal of Systematic Bacteriology. 3:1255-1262.
- Steinmetz, H., Forche, E., Reichenbach, H., and Hofle, G. 2000. Biosynthesis of myxothiazol Z, the ester-analog of myxothiazol A in *Myxococcus fulvus*. Tetrahedron. 56:1681- 1684.
- Sullivan, R. F. and Holtman, M. A. 2003. Taxonomic positioning of two biological control agents for plant diseases as *Lysobacter enzymogenes* based on phylogenetic analysis of 16s rDNA, fatty acid composition and phenotype characteristics. Journal of Applied Microbiology. 94:1079-1086.
- Vos, M. and Velicer, G. J. 2006. Genetic population structure of the soil bacterium *Myxococcus xanthus* at the centimeter scale. Applied and Environmental Microbiology. 72: 3615-3625.
- Weigle, M. and Leimgruber, W. 1967. Tetrahedron Letter. 715-718.
- White, D., Dworkin, M., and Tipper, D. J. 1968. Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: structure and relation to morphogenesis. Journal of Bacteriology. 95:2186-2197.
- Wu, Z. H., Jiang, D. M., Li, P., and Li, Y. Z. 2005. Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes. Environmental

Microbiology. 7:1602-1610.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Water Cycloheximide Agar (WCX Agar)

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	1	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

ไซโคลเฮกซิมายด์ (Cycloheximide)	25	กรัม
---------------------------------	----	------

คริสตัลไวโอเล็ต (crystal violet)	1	มิลลิลิตร
----------------------------------	---	-----------

สารปฏิชีวนะและคริสตัลไวโอเล็ตทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 50 °C

2. Yeast Agar (Vy/2 Agar)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	1	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

3. Casitone Yeast Extract broth (CYE Broth)

เคซีโตน (Casitone)	3	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	1	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2
 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

4. Nutrient Agar (NA)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3	กรัม
แบคโตเปปโตเน (Bacto peptone)	5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2
 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

5. MRS Agar (MRSA)

ผงอาหารสำเร็จรูป MRS	55.5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2
 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

6. Yeast-Malt Extract Agar (YMA)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	4	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt Extract)	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (glucose)	4	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7

7. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	20	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือดประมาณ 20 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.6

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

8. Nutrient Agar (NA)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3	กรัม
แบคโตเปปโตเน (Bacto peptone)	5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

9. MRS Agar (MRSA)

ผงอาหารสำเร็จรูป MRS	55.5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

10. Yeast-Malt Extract Agar (YMA)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	4	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt Extract)	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (glucose)	4	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร
ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7		

11. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร
ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือดประมาณ 20 นาที กรองเอาส่วนน้ำใสมาใช้		
ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.6		
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน		

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 0.5 McFarland Standard

BaCl ₃ .2H ₂ O	1.175	กรัม
--------------------------------------	-------	------

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

ละลาย BaCl₃.2H₂O 1.175 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลาย

BaCl₃.2H₂O ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย 1% H₂SO₄ ปริมาตร 99.5 มิลลิลิตร

จะได้สารแขวนลอยที่มีลักษณะขุ่น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

2. Chloroform/isoamyl alcohol (24:1 v/v)

Chloroform	192	มิลลิลิตร
------------	-----	-----------

Isoamyl alcohol	8	มิลลิลิตร
-----------------	---	-----------

3. Tris-EDTA buffer (TE buffer)

1 M Tris-HCl; pH 7.4, 7.5 หรือ 8	10	มิลลิลิตร
----------------------------------	----	-----------

0.5 M EDTA; pH 8.0	2	มิลลิลิตร
--------------------	---	-----------

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

วิธีการทดลอง

1. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Dry cell weight)

1.1 นำกระดาษฟอลด์ไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส แล้วทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง (desicator) นำมาชั่งน้ำหนักจนกว่าจะได้น้ำหนักคงที่

1.2 ปั่นเหวี่ยงเพื่อทำการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแล้วทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อเก็บเซลล์

1.3 ใช้ปิเปตต์ดูดเซลล์มาใส่ในกระดาษฟอลด์ที่เตรียมไว้ ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วชั่งน้ำหนัก

1.4 นำค่าน้ำหนักของกระดาษฟอลด์มาหักออกจากค่าน้ำหนักรวม ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์

2. การหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด

3.1 ใช้ปิเปตต์ดูดเมททานอลมาละลายสารสกัดที่ผ่านการระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator หรือ lyophilizer ใส่ในหลอดหลอดไมโครทิวป์ที่ชั่งน้ำหนักไว้

3.2 นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง centrivap ชั่งน้ำหนักสารสกัดแต่ละส่วนแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

3. การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Jansen และคณะ, 1999)



4. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาเซลล์บริเวณขอบโคโลนีด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast (Reichenbach และ Dworkin, 1992)

4.1 วางสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในจานอาหารเปล่า ปิดฝาไว้

4.2 ตูดอาหารแข็ง Vy/2 agar ในขณะที่เหลวอยู่ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์อาหารจะเป็นแผ่นบางที่วมสไลด์พอดี

4.3 ตัดชิ้นวุ้นไกลดิงแบคทีเรียมาวางบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 28-30°C จนกว่าเชื้อจะเจริญจึงนำสไลด์มาสองภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะเซลล์บริเวณขอบโคโลนีและ slime track



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
ตารางผลการทดลอง

1. น้ำหนักเซลล์แห้งของไกลดิ้งแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 เมื่อเลี้ยงใน CYEB 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน

เวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัม)
0	0.7
6	0.7
12	0.7
18	2.1
24	3.7
30	5.4
36	11.4
42	18.7
48	23.5
54	27.2
60	29.3
66	29.9
72	31.2
78	32.7
84	33.7
90	34.6
96	34.9
102	35.1
108	35.3
114	35.6
120	35.4

2. ตารางแสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคอลลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบบคที่เรียสายพันธุ์ RD4 ณ เวลาในการเลี้ยงต่างๆ กันเป็นค่าเฉลี่ย

เวลาในการเลี้ยง เชื้อ (วัน)	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	<i>E. coli</i>	<i>En. Faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>
3	0	0	0	0	0	0
5	0	11	0	12	11	0
7	13	17	23.5	15	13	12
9	12.5	14.5	22	14.5	13	12.5

3. ตารางแสดงน้ำหนักสารสกัดน้ำหมักจากชั้นไดคอลลอโรมีเทนที่ผลิตจากไกลดิ้งแบบคที่เรียสายพันธุ์ RD4 หลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี PTLC

ชนิดสารสกัด	น้ำหนักของสารสกัด (มิลลิกรัม)
A	274.6
B	102.5
C	26.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ตารางแสดงค่าการดุดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร ของสารสกัด A B และ C จากน้ำหมักชั้นไดคอลลอโรมีเทน หลังทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี PTLC

ความยาวคลื่น(นาโนเมตร)	ค่าการดุดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต		
	สาร A	สาร B	สาร C
200	0.0286	0.0616	0.0892
201	0.0257	0.0559	0.0817
202	0.0217	0.0473	0.0691
203	0.0171	0.0367	0.0529
204	0.0126	0.0258	0.0359
205	0.0087	0.0161	0.0206
206	0.0058	0.0085	0.0083
207	0.0039	0.0033	0
208	0.0029	0.0002	-0.005
209	0.0025	-0.001	-0.008
210	0.0025	-0.001	-0.01
211	0.0028	-0.002	-0.01
212	0.0032	-0.001	-0.011
213	0.0036	-0.001	-0.011
214	0.0041	-0.001	-0.01
215	0.0045	0	-0.01
216	0.0049	0.0003	-0.01
217	0.0053	0.0011	-0.009
218	0.0056	0.0019	-0.009
219	0.006	0.0027	-0.008
220	0.0063	0.0036	-0.008
221	0.0068	0.0046	-0.007
222	0.0074	0.006	-0.006
223	0.0082	0.0076	-0.004
224	0.0091	0.0097	-0.002
225	0.0103	0.0122	0

226	0.0117	0.015	0.0033
227	0.0134	0.0184	0.0079
228	0.0155	0.0224	0.014
229	0.018	0.0271	0.0224
230	0.0209	0.0328	0.0334
231	0.0242	0.0394	0.0476
232	0.0278	0.0465	0.0646
233	0.0312	0.0534	0.0837
234	0.0345	0.0592	0.1037
235	0.0372	0.0628	0.1229
236	0.0394	0.064	0.1402
237	0.0409	0.0627	0.1548
238	0.042	0.0597	0.1668
239	0.0427	0.056	0.1769
240	0.0432	0.0529	0.1862
241	0.0435	0.0518	0.1959
242	0.0437	0.0528	0.2066
243	0.0437	0.0559	0.2183
244	0.0435	0.0601	0.2302
245	0.0433	0.0644	0.2415
246	0.0429	0.0679	0.2514
247	0.0425	0.0703	0.2594
248	0.0421	0.0719	0.2661
249	0.0416	0.0733	0.2722
250	0.041	0.0753	0.2788
251	0.0403	0.079	0.2868
252	0.0394	0.0844	0.2965
253	0.0384	0.0917	0.3077
254	0.0374	0.1	0.3197
255	0.0362	0.1088	0.3319
256	0.0351	0.1172	0.3436

257	0.034	0.1247	0.3548
258	0.0329	0.131	0.3655
259	0.0318	0.1356	0.3757
260	0.0308	0.1386	0.3855
261	0.0298	0.1398	0.3947
262	0.0289	0.1389	0.4033
263	0.028	0.1359	0.4111
264	0.0273	0.1306	0.4179
265	0.0266	0.1231	0.424
266	0.026	0.1142	0.4295
267	0.0255	0.1044	0.4346
268	0.025	0.0946	0.4394
269	0.0246	0.0853	0.4436
270	0.0242	0.0766	0.4473
271	0.024	0.0687	0.4501
272	0.0238	0.0614	0.4519
273	0.0237	0.0545	0.4527
274	0.0238	0.0477	0.4523
275	0.0239	0.0412	0.4509
276	0.0241	0.0351	0.4486
277	0.0243	0.0298	0.4457
278	0.0244	0.0255	0.4427
279	0.0244	0.0222	0.4401
280	0.0244	0.0195	0.4377
281	0.0244	0.0166	0.4348
282	0.0245	0.0127	0.4301
283	0.0247	0.007	0.4218
284	0.0251	0	0.4093
285	0.0255	-0.008	0.3921
286	0.0257	-0.015	0.372
287	0.0256	-0.019	0.3508

288	0.025	-0.018	0.331
289	0.0239	-0.012	0.3147
290	0.0224	-0.002	0.302
291	0.0207	0.0088	0.2928
292	0.019	0.0201	0.2857
293	0.0176	0.0293	0.2796
294	0.0165	0.0357	0.2738
295	0.0157	0.0391	0.2676
296	0.0151	0.0403	0.2612
297	0.0147	0.0402	0.2547
298	0.0144	0.0397	0.2484
299	0.0141	0.0391	0.2424
300	0.0138	0.0386	0.2366
301	0.0134	0.0383	0.231
302	0.0131	0.0382	0.2256
303	0.0127	0.0382	0.2205
304	0.0123	0.0382	0.2156
305	0.0118	0.0384	0.211
306	0.0114	0.0386	0.2066
307	0.0109	0.0388	0.2023
308	0.0104	0.0387	0.1982
309	0.0099	0.0385	0.1943
310	0.0095	0.038	0.1905
311	0.009	0.0374	0.1869
312	0.0085	0.0367	0.1837
313	0.0081	0.036	0.181
314	0.0076	0.0356	0.1788
315	0.007	0.0355	0.1772
316	0.0064	0.0356	0.1758
317	0.0058	0.0359	0.1745
318	0.0052	0.0361	0.1729

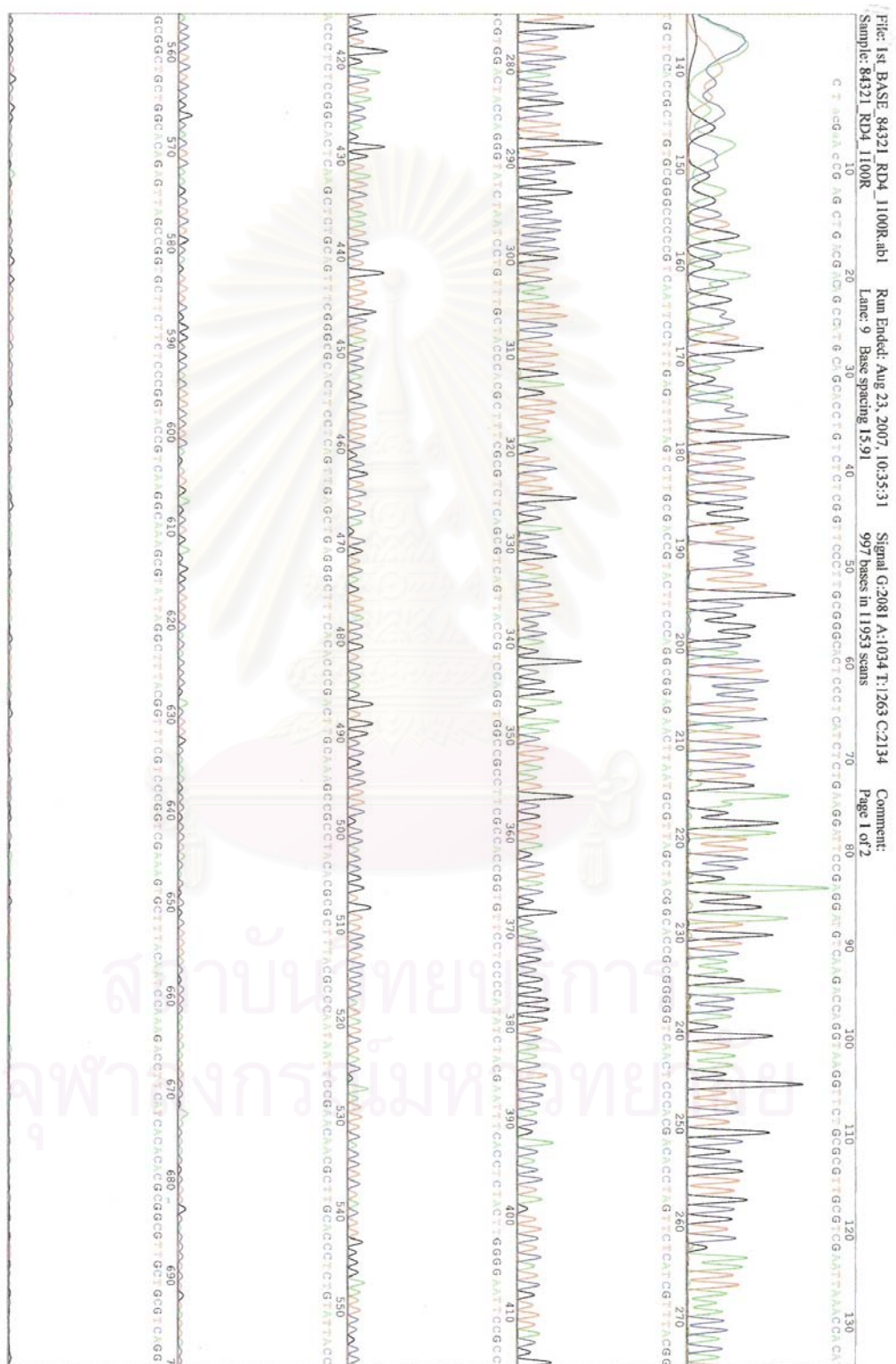
319	0.0046	0.0362	0.1709
320	0.0041	0.0361	0.1683
321	0.0036	0.0359	0.1651
322	0.0031	0.0355	0.1617
323	0.0027	0.035	0.1583
324	0.0024	0.0345	0.1552
325	0.0022	0.034	0.1525
326	0.002	0.0333	0.1502
327	0.0018	0.0326	0.1481
328	0.0018	0.0318	0.1459
329	0.0016	0.0307	0.1432
330	0.0015	0.0296	0.1397
331	0.0015	0.0283	0.1356
332	0.0013	0.027	0.131
333	0.0012	0.0258	0.1263
334	0.001	0.0247	0.1217
335	0.0008	0.024	0.1176
336	0.0006	0.0235	0.1141
337	0.0003	0.0232	0.1111
338	0.0001	0.0232	0.1083
339	0	0.0231	0.1058
340	0	0.0229	0.1032
341	0	0.0224	0.1005
342	0	0.0216	0.0976
343	-0.001	0.0205	0.0944
344	-0.001	0.0191	0.091
345	-0.001	0.0175	0.0875
346	-0.001	0.016	0.0841
347	-0.001	0.0146	0.081
348	-0.001	0.0136	0.0784
349	-0.001	0.0131	0.0765

350	-0.002	0.0131	0.0753
351	-0.002	0.0138	0.0749
352	-0.003	0.0151	0.0751
353	-0.003	0.0168	0.0759
354	-0.004	0.0187	0.077
355	-0.004	0.0208	0.0781
356	-0.005	0.0227	0.0792
357	-0.005	0.0244	0.0799
358	-0.005	0.0257	0.0804
359	-0.006	0.0267	0.0803
360	-0.006	0.0273	0.0799
361	-0.006	0.0276	0.0792
362	-0.007	0.0278	0.0782
363	-0.007	0.0277	0.077
364	-0.007	0.0277	0.0757
365	-0.007	0.0275	0.0743
366	-0.007	0.0274	0.0729
367	-0.007	0.0273	0.0715
368	-0.008	0.0272	0.0701
369	-0.008	0.0272	0.0687
370	-0.008	0.0271	0.0673
371	-0.008	0.0271	0.066
372	-0.008	0.0271	0.0648
373	-0.008	0.0271	0.0636
374	-0.008	0.0272	0.0625
375	-0.008	0.0272	0.0615
376	-0.009	0.0274	0.0605
377	-0.009	0.0276	0.0596
378	-0.009	0.0279	0.0588
379	-0.009	0.0281	0.058
380	-0.009	0.0283	0.0572

381	-0.009	0.0282	0.0562
382	-0.009	0.0278	0.0551
383	-0.009	0.0272	0.0539
384	-0.009	0.0262	0.0527
385	-0.01	0.0252	0.0514
386	-0.01	0.0243	0.0504
387	-0.01	0.0236	0.0495
388	-0.01	0.0232	0.0488
389	-0.01	0.0228	0.0483
390	-0.01	0.0226	0.0478
391	-0.01	0.0224	0.0475
392	-0.01	0.0221	0.0471
393	-0.01	0.0216	0.0468
394	-0.01	0.0212	0.0465
395	-0.011	0.0207	0.0462
396	-0.011	0.0204	0.046
397	-0.011	0.02	0.0458
398	-0.011	0.0197	0.0456
399	-0.011	0.0194	0.0455
400	-0.011	0.0192	0.0454

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของไกลดิงแบคทีเรียสายพันธุ์ RD4 จากไพรเมอร์ 1100R



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยรัตน์ หมั่นศรีชัย เกิดเมื่อวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสตรีวิทยา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตร จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547

การเสนอผลงานทางวิชาการ

ได้เข้าร่วมเสนอและได้รับรางวัลการเสนอผลงานทางวิชาการแบบโปสเตอร์ในการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 15 ประจำปี 2550 “ The 15th Academic Conference, the Annual 2007 ” ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในหัวข้อ “ SCREENING OF BIOACTIVE COMPOUNDS-PRODUCING GLIDING BACTERIA ร่วมกับผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ และ ดร. วิมลภา อรุณไพโรจน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย